

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

DETEÇÃO DE BIOMARCADORES DE
RESISTÊNCIA À METICILINA EM *STAPHYLOCOCCUS*
***AUREUS* (MRSA) POR MALDI-TOF MS**

Mestrando: Pedro Miguel Ildfonso Santos

Orientadora: Doutora Edna Soraia Ribeiro – Escola Superior de Saúde de Lisboa / Instituto Politécnico de Lisboa / Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia - H&TRC

Orientadora: Doutora Irina Alho Duarte – Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2025

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE DE LISBOA

**DETEÇÃO DE BIOMARCADORES DE
RESISTÊNCIA À METICILINA EM *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* (MRSA) POR MALDI-TOF MS**

Mestrando: Pedro Miguel Ildefonso Santos

Orientadora: Doutora Edna Soraia Ribeiro – Escola Superior de Saúde de Lisboa / Instituto Politécnico de Lisboa / Centro de Investigação em Saúde e Tecnologia - H&TRC

Orientadora: Doutora Irina Alho Duarte – Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Carina Alexandra Fernandes Ladeira – Escola Superior de Saúde de Lisboa / Instituto Politécnico de Lisboa

Arguente: Doutora Carla Maria Amorim Carneiro – Escola Superior de Tecnologia de Setúbal / Instituto Politécnico de Setúbal

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2025

Direitos de cópia

Autorizo a Escola Superior de Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa o direito de arquivar e publicar a presente dissertação e de a divulgar em repositórios científicos para fins educacionais ou de pesquisa não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao autor e ao editor.

Copyright© 2025 – Pedro Miguel Ildefonso Santos

Agradecimentos

Com esta dissertação pretendo agradecer a todos os envolvidos que contribuíram direta ou indiretamente para a minha conquista e a superar os meus limites.

Principalmente, quero agradecer as minhas orientadoras, Prof^{as}. Edna Ribeiro e Irina Alho que fizeram um trabalho excelente, acompanhando-me desde o início, acreditaram em mim quando mais precisei e exigiram de mim tudo o que podia dar. Sem a sua presença este estudo não seria possível.

À minha família e amigos que me apoiaram e não me deixaram desistir. E que me privei de ver porque sabem tanto como eu que sem grandes sacrifícios não há grandes conquistas. Ao meu gato que me fez companhia e me deu alguns momentos de distração quando mais precisava.

Ao serviço de Patologia Clínica da Unidade Local de Saúde do Alentejo Central, principalmente aos meus colegas que toleraram a minha privação de sono e frustração.

Ao Celso que não pode presenciar o fim desta etapa e que tenho a certeza que ficaria orgulhoso por mim.

Gostaria de finalizar com uma citação do autor George Bernard Shaw, que me inspirou durante o último ano:

“This is the true joy in life, being used for a purpose recognized by yourself as a mighty one. Being a force of nature instead of a feverish, selfish little clod of ailments and grievances, complaining that the world will not devote itself to making you happy. I am of the opinion that my life belongs to the whole community and as long as I live, it is my privilege to do for it what I can. I want to be thoroughly used up when I die, for the harder I work, the more I live. I rejoice in life for its own sake. Life is no brief candle to me. It is a sort of splendid torch which I have got hold of for the moment and I want to make it burn as brightly as possible before handing it on to future generations.”

Obrigado!

Resumo

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) é um método rápido de identificação de isolados microbiológicos e tem o potencial de detetar biomarcadores para discriminar a resistência à meticilina em isolados de *S. aureus*.

Com o objetivo de identificar biomarcadores discriminativos de resistência à meticilina para *S. aureus*, foi realizada uma revisão sistemática da literatura com recurso às bases de dados Pubmed e Web of Science, onde foram extraídos todos os estudos até ao final de julho de 2024, e selecionados com foco na deteção de biomarcadores de MRSA por MALDI-TOF MS.

Neste estudo, foram selecionados 15 estudos focados na identificação de biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina, como também em métodos de preparação da amostra e utilização de modelos de Inteligência Artificial (IA). O PSM-mec e a toxina delta servem como biomarcadores informativos, detetáveis a 2414 ± 2 Da e 3006 ± 2 Da, respetivamente. Alguns estudos utilizaram modelos de IA para selecionar biomarcadores específicos para isolados sensíveis e resistentes à meticilina que apresentam diferenças nas intensidades dos picos ou que não coexistem em ambas os isolados. Além disso, foram selecionados dois estudos que utilizam a deteção de MRSA em baixas concentrações a partir de amostras biológicas e outro que utiliza uma solução de matriz otimizada.

Em conclusão, MALDI-TOF MS revela um forte potencial para a deteção rápida da resistência à meticilina em *S. aureus* através da análise de biomarcadores. Adicionalmente, a conjugação com ferramentas de IA pode contribuir para a sua implementação sem custos adicionais.

Palavras-chave: MALDI-TOF MS; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; biomarcadores; discriminação; Inteligência Artificial.

Abstract

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a rapid microbial identification method and has the potential to detect biomarkers to distinguish methicillin resistance in *S. aureus* isolates.

With the aim to identify discriminatory biomarkers of methicillin resistance for *S. aureus*, a systematic review of the literature was carried out with Pubmed and Web of Science databases, where all studies up to the end of July 2024 were extracted and selected focused on the detection of biomarkers MRSA with MALDI-TOF MS.

In this study we selected 15 studies focused on methicillin resistance and sensibility biomarkers, as well sample preparation and Artificial Intelligence (AI) models. PSM-mec and delta toxin served as informative biomarkers, detectable at 2414 ± 2 Da and 3006 ± 2 Da, respectively. Some studies (n=8) used AI models to select specific biomarkers to methicillin-resistant and sensitive strains that have differences in peak intensities or do not coexist in both strains. Moreover, we selected two studies that employ detection of MRSA in low concentrations from biological samples and other employed an optimized matrix solution.

In conclusion, MALDI-TOF MS shows strong potential for rapidly detecting methicillin resistance biomarkers in *S. aureus*. Furthermore, combining it with AI tools could contribute to the implementation of this approach without further expenses.

Keywords: MALDI-TOF MS; *Staphylococcus aureus*; Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; biomarkers; discrimination; Artificial Intelligence.

Índice Geral

1. Introdução.....	1
2. Estado de arte	3
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>).....	3
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina (MRSA).....	4
2.2.1. Epidemiologia europeia de MRSA	5
2.2.2. Mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos em <i>S. aureus</i>	6
2.2.3. <i>Healthcare-acquired</i> MRSA vs <i>Community-acquired</i> MRSA.....	6
2.3. Métodos convencionais de identificação de MRSA.....	6
2.3.1. Identificação fenotípica através de microbiologia clássica	6
2.3.2. Identificação através de metodologias de Biologia Molecular	7
2.4. Aplicação da tecnologia MALDI-TOF MS em microbiologia	7
2.4.1. Fundamento teórico da análise por MALDI-TOF MS	7
2.4.2. Identificação microbiológica por MALDI-TOF MS	8
2.4.3. Equipamentos MALDI-TOF MS na rotina laboratorial	8
2.4.4. Protocolos para análise MALDI-TOF MS.....	9
2.4.5. Detecção de Resistência a Antimicrobianos por MALDI-TOF MS	11
3. Objetivos.....	13
4. Metodologia	14
4.1. Critérios P.I.C.O.....	14
4.2. Estratégia de pesquisa.....	14
4.3. Critérios de elegibilidade	14
4.3.1. Critérios de inclusão e exclusão	14
4.4. Gestão de dados.....	15
4.4.1. Processo de seleção	15
4.4.2. Processo de recolha.....	15
4.4.3. Avaliação de qualidade	15
4.4.4. Análise dos Dados e Síntese.....	16
4.5. Informações adicionais	16
5. Resultados.....	17
5.1. Resultados da avaliação crítica da qualidade pelas ferramentas do <i>Joanna Briggs Institute</i>	18
5.2. Síntese dos dados	20
5.3. Características dos estudos selecionados	25
5.4. Equipamentos e protocolo de análise MALDI-TOF MS	26

5.5. Biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina	27
5.6. Utilização de ferramentas de IA	30
6. Discussão	32
6.1. Identificação de PSM-mec e toxina delta	34
6.2. Biomarcadores “adicionais” e contributo das ferramentas de IA.....	36
6.3. Protocolos alternativos para a deteção de MRSA	39
6.4. Aplicação prática dos biomarcadores de resistência e sensibilidade por MALDI-TOF MS... ..	41
7. Conclusão.....	43
8. Limitações do estudo e perspetivas futuras	44
9. Referências bibliográficas	45
10. Anexos.....	I
11. Apêndices	VIII
Apêndice 1 - Tabela síntese dos artigos incluídos na revisão sistemática da literatura... VIII	
Apêndice 2 – Tabela de avaliação crítica da qualidade de estudos transversais - Joanna Briggs Institute	XII

Índice de anexos

Anexo 1 – Ilustração do funcionamento da tecnologia MALDI-TOF MS	I
Anexo 2 – Registo no Prospero	II
Anexo 3 – Certificado de apresentação do poster “Deteção de Biomarcadores de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina por MALDI-TOF MS no III Congresso BioMedLab	VI
Anexo 4 – Certificado de melhor poster apresentado no III Congresso BioMedLab	VII

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Classificação das identificações segundo os sistemas de diagnóstico MALDI-TOF MS	9
Tabela 2 – Protocolos de tratamento da amostra pré-análise MALDI-TOF MS	10
Tabela 3 – Fundamento teórico das metodologias de detecção de resistência a antimicrobianos por MALDI-TOF MS	11
Tabela 4 – Critérios de inclusão e exclusão segundo o tipo das publicações	15
Tabela 5 – Critérios de inclusão e exclusão para a seleção de artigos em estudo	15
Tabela 6 – Tabela síntese dos artigos incluídos	21
Tabela 7 – Resultados dos testes de desempenho para o PSM-mec.....	28
Tabela 8 – Testes de desempenho da identificação e discriminação de MRSA e MSSA utilizando os biomarcadores adicionais	30

Índice de Figuras

Figura 1 – Fatores de virulência expressos por <i>S. aureus</i> e a sua contribuição para infecção	4
Figura 2 – Distribuição Europeia de isolados de MRSA em percentagem	5
Figura 3 – Fluxograma PRISMA detalhado dos estudos incluídos	18
Figura 4 – Representação gráfica (A) e resumo da avaliação do risco de viés (B).	19
Figura 5 – Origem geográfica dos artigos selecionados em frequência absoluta.....	25
Figura 6 – Descrição em frequência absoluta dos protocolos utilizados nos estudos incluídos.	26
Figura 7 - Distribuição dos biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina em <i>S. aureus</i>	29
Figura 8 - Distribuição dos biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina em <i>S. aureus</i> (Diagrama de caixa).	29

Abreviaturas

agr: *accessory gene regulator*

AMP-MB: Partículas magnéticas conjugadas com ampicilina

ATCC: *American Type Culture Collection*

BM: Biologia Molecular

CA-MRSA: *Community-acquired MRSA*

CC: Complexo clonal

CFU/ml: Unidades formadoras de colónias por mililitro

CHCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

CMBT: 5-Cloro-2-mercaptobenzotiazol

Da: Daltons

DSMZ: Leibniz Institute DSMZ

FA: Ácido fórmico

HA-MRSA: *Healthcare-acquired MRSA*

IA: Inteligência Artificial

ICM: Método *intact-cell*

I-PEM: Método de extração proteica *in-tube*

kDa: KiloDaltons

LCR: Líquido cefalorraquidiano

LightGBM: *Light Gradient Boosting Machine*

m/z: Razão massa-carga

MALDI-TOF MS: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

MGE: Elemento genético móvel

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina

NCIMB: *National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria*

NL-SVM: *Non-linear Support Vector Machine*

OMS: Organização Mundial da Saúde

O-PEM: Método de extração proteica *on-target*

PBP2a: Proteína de ligação a penicilina 2a

PBS: Solução tampão de fosfato salino

PCA: *Principal Component Analysis*

PMF: *Peptide Mass Fingerprint*

PRISMA: *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

PSM-mec: Péptido *phenol-soluble modulin*

RT-PCR: *Real-Time Polimerase Chain Reaction*

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

SCCmec: *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*

TSA: Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

1. Introdução

As infecções por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) mantêm-se no topo da lista dos agentes bacterianos prioritários, definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), por continuar a ser um agente bacteriano desafiante, responsável por infecções que acarretam elevados encargos financeiros para os serviços de saúde (1-3). O MRSA surge da resistência adquirida do *S. aureus* a antimicrobianos β -lactâmicos (3, 4). O MRSA é maioritariamente uma preocupação como agente responsável por infecções nosocomiais, no entanto as infecções associadas à comunidade têm emergido com mais frequência, gerando reservatórios em ambos os meios (2-5).

As infecções por MRSA estão associadas a maior mortalidade e morbidade comparando com infecções por *S. aureus* sensível à metilina (MSSA) (2-4, 6). Como tal, a deteção e diferenciação de MRSA de MSSA torna-se uma prioridade para a determinação do tratamento adequado com antimicrobianos, reduzindo o risco de aquisição de resistências a antimicrobianos e o período de suscetibilidade, evitando as complicações associadas e promover o Programa *Antimicrobial Stewardship* (3, 7-9).

Atualmente, são utilizados procedimentos convencionais para a deteção de resistências a antimicrobianos, que se inicia com a sementeira das amostras, seguida da identificação microbiológica e de testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) (10, 11). Este processo até à identificação do antimicrobiano mais adequado, pode ter um tempo de resposta entre 48 a 72 horas (10, 11). Para reduzir o tempo de resposta são utilizadas técnicas de Biologia Molecular (BM), como a *Real time-Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), que permitem disponibilizar um diagnóstico laboratorial da resistência à metilina em *S. aureus* em menos de 2 horas (10-12). Contudo, estas técnicas apresentam algumas limitações e são dispendiosas (10, 13). Como tal, é importante a contínua procura de metodologias alternativas (10, 11).

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) é uma metodologia que tem sido utilizada para identificação de isolados microbiológicos, através da análise do *Peptide Mass Fingerprint* (PMF) (13-15). O PMF é originado pelas macromoléculas, nomeadamente proteínas ribossomais, que por sua vez são comparados com os espectros de massa arquivados em base de dados (13-15). O MALDI-TOF MS tem sido considerado um avanço significativo no âmbito dos métodos de identificação microbiológica na prestação de cuidados de saúde, pela sua conveniência, fiabilidade, redução do tempo de resposta e do custo financeiro (14, 16).

Estudos recentes têm sugerido que MALDI-TOF MS tem o potencial para a deteção de resistências a antimicrobianos (13, 14, 17). Em particular, um dos métodos é a deteção de

biomarcadores específicos presentes no PMF, podendo ser aplicado na discriminação da resistência à metilina, devido à presença de divergências no PMF entre os isolados de MRSA e MSSA, sem preparação adicional da amostra ou custos (13, 14, 17-21).

Em alguns isolados de MRSA é possível verificar a presença do gene *mecA*, através da expressão do péptido *phenol-soluble modulin* (PSM-mec) que gera uma massa/carga (m/z) com cerca de 2414 Daltons (Da) (14, 16, 17). Apesar da elevada especificidade de PSM-mec, este apresenta baixa sensibilidade (14, 17). Por outro lado, a expressão de PSM-mec é regulada pelo *accessory gene regulator* (*agr*) (16, 22, 23). Por sua vez, a expressão deste gene produz a toxina delta que tem m/z com cerca de 3006 Da (16, 22, 23). Estes biomarcadores podem ser úteis na deteção de isolados de MRSA, mas surge a necessidade de determinar biomarcadores adicionais presentes no PMF de MRSA e MSSA para a sua discriminação (14, 16, 17). Adicionalmente, a combinação de MALDI-TOF MS com modelos matemáticos e computacionais avançados tem sido apoiada em vários estudos como uma ferramenta importante para recolher informações genéticas para a discriminação rápida de MRSA e MSSA no diagnóstico laboratorial (13, 17).

Neste sentido, o intuito do presente estudo é determinar quais os biomarcadores que podem ser utilizados para a deteção e discriminação de isolados de MRSA e MSSA utilizando a tecnologia MALDI-TOF MS.

2. Estado de arte

2.1. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

O *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram-positiva, coagulase positiva que se apresenta com formato de cocos e que geralmente se agrupa em cachos (2, 3, 10, 24). Esta é uma bactéria comensal que coloniza a pele e membranas mucosas, nomeadamente as da nasofaringe de indivíduos saudáveis, sendo estimado que cerca de um terço da população mundial seja portadora desta bactéria (3, 24).

A dinâmica da colonização por este microrganismo aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de infeção (3, 6). Esta pode ocorrer por ruptura da barreira da pele ou das membranas mucosas, gerada pela sua lesão, quer de forma inadvertida ou por intervenções médicas (intervenções cirúrgicas, cateteres vasculares, entre outras), permitindo a sua entrada nos tecidos adjacentes, ou disseminar-se pela corrente sanguínea, causando bacteriemia (3, 6, 24, 25). O *S. aureus* pode causar infeções de variado nível de gravidade, como infeções na pele e tecidos moles, pneumonia, síndrome de choque tóxico e septicémia (2-4, 24, 26-28). Ao contrário de muitas outras bactérias que dependem de um ou poucos fatores de virulência, a gravidade das infeções por *S. aureus* devem-se em grande parte à expressão de variados fatores de virulência, que promovem a adesão, destruição dos tecidos adjacentes, disseminação e imunomodulação, o que se reflete na variedade de infeções que pode causar (3, 6, 25-27). A formação de biofilmes, cápsula associada a fatores anti-fagocíticos, produção de toxinas, inibição da produção de citocinas e de elementos de fatores do complemento (*staphylococcal complement inhibitor*), são alguns exemplos dos fatores que promovem o processo de instalação da infeção (Figura 1) (3, 6, 26, 29).

Muitos dos fatores de virulência estão associados a determinados clones, que são regulados por elementos genéticos, como o gene *agr*, ou são típicos em determinados locais de infeção (3, 6, 25, 29). Além disso, o *S. aureus* apresenta fatores com elevada antigenicidade, como a leucocina Pantón-Valentine, proteína A (α -hemolisina) e o *phenol-soluble modulín* (2, 3, 6, 26). A leucocina Pantón-Valentine é considerada um dos fatores mais relevantes, uma vez que tem especificidade com os leucócitos, provocando a sua lise, o que promove a inflamação (2, 3, 26, 29). Por outro lado, tem afinidade com o complexo histocompatibilidade *major* tipo II de células apresentadoras de antígeno, o que exacerba o processo inflamatório, responsável por infeções graves (Figura 1) (2, 3, 26, 29).

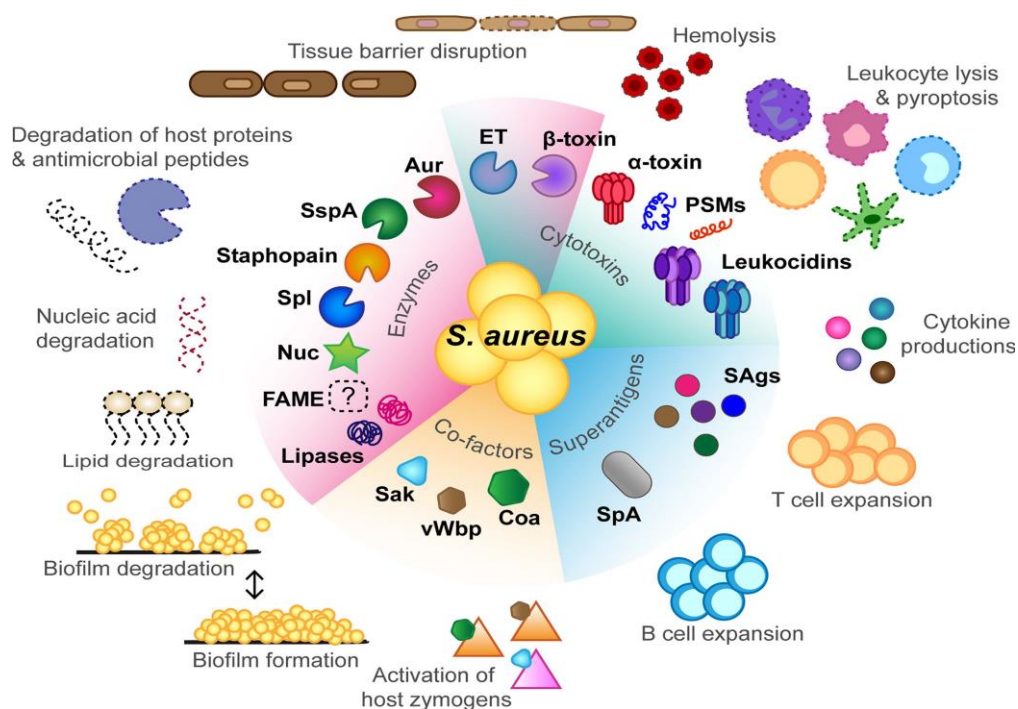


Figura 1 – Fatores de virulência expressos por *S. aureus* e a sua contribuição para infecção, retirado de Tam et al, 2019 (29).

Legenda: ET - toxinas exfoliativas; PSM - *phenol soluble modulins*; Sags - superantigênicos; SpA - proteína A estafilocócica; Coa - coagulase; vWbp - proteína de ligação ao fator von Willebrand; Sak - estafiloquinase; FAME - *fatty acid methyl esters*; Nuc - nuclease; Spl - serino proteases; SspA - protease V8; Aur - aureolisina.

2.2. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA)

O uso recorrente de antimicrobianos para a terapêutica de infecções bacterianas tem contribuído para aquisição de resistências em variados microrganismos, o que se tem tornado um problema mundial de Saúde Pública (3, 25). Poucos anos após a introdução da penicilina, o *S. aureus* adquiriu resistência a este agente antimicrobiano através da produção de β -lactamases, capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico (2, 4, 30).

Ao contrário da resistência à penicilina, a resistência à meticilina não é nativa (3, 4). Com a introdução da meticilina, a sua resistência surgiu da aquisição por transferência horizontal do elemento genético móvel (MGE) *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) que contém o gene *mecA*, conferindo a capacidade de produzir a proteína de ligação a penicilina (PBP) 2a (PBP2a) (3, 4, 30). Esta apresenta baixa afinidade para os antimicrobianos com anel β -lactâmico, resultando na resistência de largo espectro, à maioria dos antimicrobianos desta família (3, 4, 27, 30, 31). Adjacente ao gene *mecA*, a SCCmec possui também o gene *psm-mec* que codifica para a proteína a PSM-mec, produzida em isolados com SCCmec tipo II, III e VIII, e é diretamente controlado pelo gene *agr* (23, 32, 33). Mais tarde, foi também descoberta uma PBP2a distinta, que é codificada pelo gene *mecC*, que é predominante em isolados de MRSA na Europa (2-4).

Além da aquisição da resistência à metilina, um dos maiores desafios no tratamento de infecções por *S. aureus* é a aquisição de resistências múltiplas, principalmente pela incorporação nos MGE's que expressam proteínas de resistências a outros antimicrobianos, conduzindo à emergência de estirpes multirresistentes (2, 3, 25).

Desta forma, o MRSA está na lista dos agentes prioritários da OMS de 2024, como elevado risco, pela sua dificuldade no tratamento e prevenção, causando um *burden of disease* substancial (1, 34). Apesar de atualmente não se enquadrar no nível crítico, pode tornar-se em determinados grupos populacionais e áreas geográficas, sendo um encargo financeiro para os serviços de saúde (1, 28, 34).

2.2.1. Epidemiologia europeia de MRSA

A epidemiologia do MRSA na Europa é diversificada, o que está relacionado com as diferenças nas medidas de Controlo de Infecção e uso de antimicrobianos. Segundo o relatório de vigilância de 2023 da *European Centre for Disease Prevention and Control*, tem sido verificada uma tendência estável ou mesmo decrescente na incidência de MRSA nos países europeus. Pode-se ainda verificar que os países com maior prevalência de MRSA se situam a sul e leste do continente, sendo Portugal um desses países (Figura 2) (34).

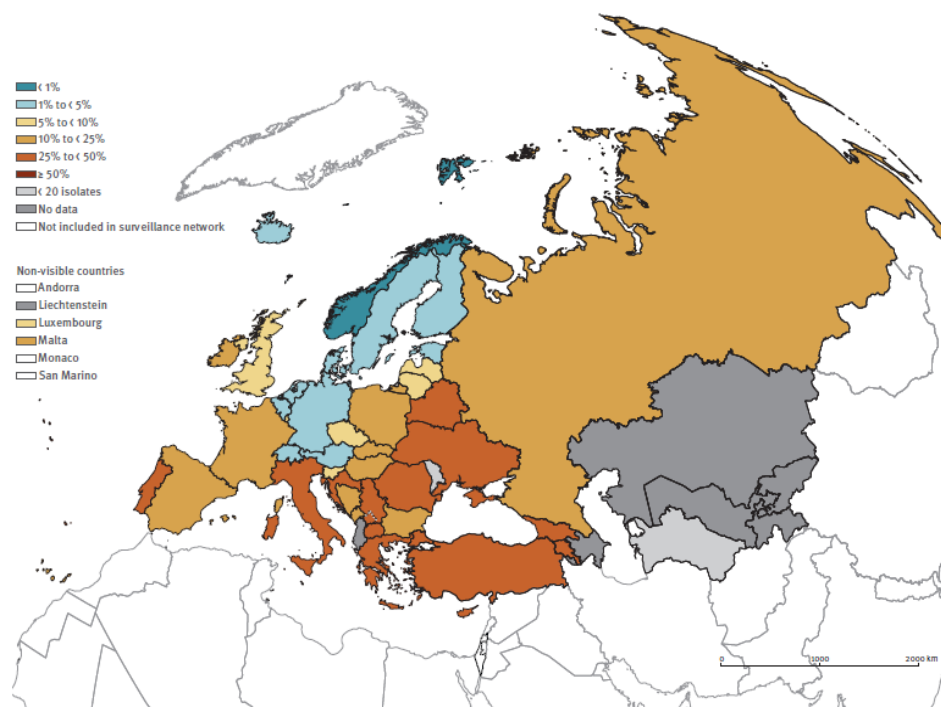


Figura 2 – Distribuição Europeia de isolados de MRSA em percentagem, retirado de ECDC & WHO, 2023 (34).

2.2.2. Mecanismo de ação dos antimicrobianos β -lactâmicos em *S. aureus*

As PBP's estão presentes na cápsula de *S. aureus* com a função de manutenção da biossíntese de peptidoglicano, contribuindo para a sua integridade. Os antimicrobianos β -lactâmicos ligam-se aos PBP's bloqueando a enzima a si associada, responsável pela síntese de peptidoglicano, destabilizando a integridade da cápsula, provocando a lise. A PBP2a é codificada pelo gene *mecA* que confere o mecanismo de resistência à meticilina por diminuição da acessibilidade do local ativo da transpeptidase ligada à PBP2a, reduzindo afinidade da ligação, mantendo assim capacidade de biossíntese de peptidoglicano e manutenção da integridade bacteriana (4, 35).

2.2.3. *Healthcare-acquired* MRSA vs *Community-acquired* MRSA

Inicialmente, o MRSA surgiu como um agente nosocomial (HA-MRSA) associado a infecções por intervenções médicas, internamentos prolongados e à terapêutica com antimicrobianos (3, 4, 28). Os clones de HA-MRSA apresentam elementos da *SCCmec* de elevado tamanho, com sacrifício nos fatores de virulência em favor da aquisição de multirresistência a antimicrobianos (3, 4, 28). Por outro lado, o MRSA emergiu também em contexto comunitário (CA-MRSA), em indivíduos aparentemente saudáveis sem associação a fatores de risco típicos de HA-MRSA. Os clones de CA-MRSA apresentam elementos da *SCCmec* de menor tamanho, sem multirresistência a antimicrobianos e tipicamente com menores níveis de resistência a β -lactâmicos, mas dando lugar à expressão de fatores de virulência que apresentam uma forte regulação pelo sistema *agr* (3, 4, 28). Apesar de existir esta distinção, progressivamente estão a ser observadas infecções associadas a CA-MRSA em meio nosocomial (3).

2.3. Métodos convencionais de identificação de MRSA

2.3.1. Identificação fenotípica através de microbiologia clássica

A identificação fenotípica de microrganismos pressupõe que as amostras recebidas nos serviços de microbiologia sejam semeadas em meio sólido e/ou meio líquido, o que implica a incubação por um período entre 24 e 48 horas, e simultaneamente a realização de lâminas para coloração (10, 36). Apenas após o isolamento de colónias de interesse poder-se-á proceder à execução de testes de identificação e em paralelo de TSA, que permitem a seleção de um painel de antimicrobianos adequado ao tratamento (10). Este é o processo geral para a pesquisa de agentes infecciosos, sendo este aplicado à cultura e TSA de *S. aureus* (10).

Na detecção da resistência à meticilina, um dos métodos de referência é o teste de Kirby-Bauer (difusão em disco) que utiliza a oxacilina e/ou cefoxitina, no qual a resistência à meticilina é reportada como resistente à oxacilina (37, 38). Atualmente, os laboratórios de microbiologia têm disponíveis equipamentos automáticos para a identificação e TSA, que possibilitam a obtenção de resultados entre 4 a 18 horas (11, 39). Mesmo assim, este poderá demorar até 72 horas, o que torna o diagnóstico microbiológico laboratorial bastante demorado, levando ao atraso no início do tratamento, aumentando os períodos de suscetibilidade à infecção (10).

2.3.2. Identificação através de metodologias de Biologia Molecular

Os testes de BM baseados em métodos de RT-PCR têm colmatado a problemática do atraso da resposta, disponibilizando um diagnóstico laboratorial em menos de 2 horas, nomeadamente na detecção da resistência à meticilina em *S.aureus*, que se baseiam na detecção da *SCCmec*, dos genes *mecA* e também do *mecC* (10, 12, 35). Atualmente, estes testes podem incluir apenas a pesquisa de MRSA ou incluir a pesquisa conjunta de outros microrganismos, no caso dos testes *multiplex*, sendo estes de fácil processamento e considerados como o método *gold-standard* para a detecção do gene *mecA*, que é um dos genes responsáveis pela resistência à meticilina (10, 37). No entanto, podem existir resultados falso-negativos que podem induzir erro no diagnóstico de resistência à meticilina, o que pode ser atribuído a variantes da *SCCmec*, não detetadas por estas técnicas comerciais ou à presença de MRSA abaixo do limite de detecção da técnica, sugerindo uma ampliação insuficiente dos alvos (10-12, 35). Além disso, esta metodologia apresenta algum custo financeiro associado (10, 12).

2.4. Aplicação da tecnologia MALDI-TOF MS em microbiologia

2.4.1. Fundamento teórico da análise por MALDI-TOF MS

A espectrometria de massa permite a identificação e quantificação de moléculas ionizadas com base na análise da razão massa/carga (m/z), sendo possível diferenciar moléculas pertencentes à mesma amostra, incluindo em amostras biológicas (13-16). A técnica de MALDI-TOF MS integra duas tecnologias essenciais: a ionização por radiação ultravioleta da amostra associada a uma matriz co-cristalizada (MALDI), gerando macromoléculas carregadas positivamente; e a análise do tempo necessário para atravessar “em voo” (TOF) uma coluna com potencial elétrico e de comprimento fixo até ao sistema de detecção que fornece a razão m/z e a intensidade do sinal no espectro de massa (13-16). Os principais alvos utilizados na identificação e diferenciação de microrganismo são as proteínas ribossomais, que constituem cerca de 60 a 70% da sua constituição e apresentam uma massa entre 2 a 20 kDa e as proteínas *housekeeping* (13-16, 40). Como o tamanho e as sequências

proteicas dos ribossomas são bastante conservadas dentro da mesma espécie de microrganismo, é adequado a sua utilização para a identificação microbiológica (13-16). Com base na separação dos vários constituintes da amostra, segundo a sua razão m/z, é possível determinar padrões característicos que geram um PMF (13-16). Apresenta-se a esquematização ilustrativa do método no Anexo 1.

2.4.2. Identificação microbiológica por MALDI-TOF MS

A identificação de microrganismos por MALDI-TOF é feita através da comparação do PMF da bactéria “desconhecida” com o *main spectral profile* disponível na base de dados (13-16). Atualmente, a análise por MALDI-TOF MS é utilizada como uma ferramenta de identificação microbiológica na rotina laboratorial de microbiologia clínica, a partir de colónias cultivadas em meios de cultura sólidos, permitindo a identificação de microrganismos ao nível do género, espécie e em alguns casos da estirpe (13-16). O desenvolvimento das bases de dados e dos protocolos de preparação da amostra pré-análise são um aspeto essencial na aplicação na prática clínica, o que possibilita o contínuo enriquecimento das bases de dados e uma identificação progressivamente mais exata (13-16). Esta prática possibilita o desenvolvimento das capacidades atuais do método para a expansão da aplicabilidade desta ferramenta (13-17). Este método apresenta várias vantagens em comparação com métodos convencionais, como a análise fenotípica (métodos bioquímicos e imunológicos) e técnicas de BM baseadas em ensaios de RT-PCR (14, 36, 41). Esta tecnologia tem sido considerada um avanço significativo no âmbito dos métodos de identificação microbiológica, ao apresentar uma relação custo-benefício bastante positiva, elevada exatidão e rapidez (13, 14, 16, 36, 42). Assim torna-se útil em situações críticas, nas quais é necessário iniciar a terapêutica antimicrobiana dirigida, acarretando menores custos quando comparado com os testes de BM e imunológicos (13, 14, 16, 36, 42). É ainda considerado que o protocolo requer pouca quantidade de amostra, não é exaustivo e é de fácil aprendizagem (13-16).

2.4.3. Equipamentos MALDI-TOF MS na rotina laboratorial

Os equipamentos MALDI Biotyper sirius da Bruker Daltonics e o VITEK MS PRIME da bioMérieux são exemplos de sistemas certificados de diagnóstico *in vitro* para a identificação microbiológica por MALDI-TOF MS, sendo estes dos mais utilizados em laboratórios de microbiologia clínica. Ambos os equipamentos dispõem *softwares* próprios para a análise dos espectros de massa adquiridos na identificação de isolados e as correspondentes bases de dados. As identificações obtidas pelos equipamentos MALDI Biotyper sirius e o VITEK MS PRIME são apresentadas por critérios de confiança em escalas de *log (score)* e percentagem, respetivamente (43). O sistema de classificação para a identificação de isolados microbiológicos por MALDI-TOF MS está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Classificação das identificações segundo os sistemas de diagnóstico MALDI-TOF MS (43).

Sistemas da Bruker Daltonics		Sistemas da bioMérieux	
> 2,0	Elevada confiança.	60 - 99,9%	Elevada confiança.
> 2,0 com baixa consistência	Identificação do género, mas diferentes espécies.	60 - 99,9%, com baixa discriminação	Identificação do género, mas 2 a 4 espécies.
1,7 - 1,99	Baixa confiança.	< 60%	Sem identificação, se identificado o género, mas mais que 4 espécies diferentes.
< 1,7	Sem identificação.		

2.4.4. Protocolos para análise MALDI-TOF MS

O pré-tratamento da amostra é uma etapa essencial que permite a exposição das proteínas para a obtenção de uma identificação exata (42, 44). Atualmente, a solução de matriz mais utilizada é o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), que tem como função absorver eficazmente a radiação ultravioleta, reduzindo a fragmentação das macromoléculas e promover a ionização para a formação de moléculas carregadas positivamente (14-16). O pré-tratamento pode ser efetuado seguindo três protocolos distintos: método *intact-cell* (ICM); método de extração proteica *on-target* (O-PEM); método de extração proteica *in-tube* (I-PEM) (13, 15, 16, 42, 44).

O ICM é um método simples e rápido que consiste na deposição da colónia na lâmina-alvo e adição da solução de matriz, deixando-a secar, para co-cristalizar as proteínas, permitindo identificar eficazmente bactérias Gram negativas. No entanto, a identificação de bactérias Gram positivas por este protocolo, como os *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. pode ser limitada, o que se deve à estrutura da parede celular com peptidoglicano, que impede a extração das proteínas. Assim, a informação obtida no espectro de massa não é suficiente, pelo que pode ser necessário recorrer a protocolos de extração proteica (16, 42, 44).

O sucesso na identificação de isolados aumentou significativamente com a implementação da aplicação de ácido fórmico para a extração proteica (13, 15). O O-PEM consiste na deposição da colónia na lâmina-alvo e adição de ácido fórmico seguida da solução de matriz, que permite melhorar a extração proteica, sem a realização de um protocolo extenso (13, 15). No entanto, algumas bactérias e fungos apresentam glicocálice ou cápsula, como os *Actinomyces* spp. aeróbios, *Nocardia* spp. e *Mycobacterium* spp., que impedem que as proteínas sejam

extraídas pela matriz (14, 15). Quando o O-PEM demonstra resultados pouco exatos na identificação, atribuída à falta de extração de proteínas, pode-se recorrer ao I-PEM. O I-PEM consiste numa extração proteica por etanol e ácido fórmico com acetonitrilo (16, 42). Este protocolo é extenso e pouco acessível para a prática em rotina, envolvendo passos intermédios de suspensão, concentração por centrifugação e re-suspensão em várias soluções, para a obtenção de um *pellet* final, e por fim adição da solução de matriz (14, 42).

No entanto, com base na comparação dos três protocolos, verificou-se que o ICM e O-PEM são abordagens adequadas para a identificação de bactérias Gram negativas, Gram positivas e bactérias com glicocálice denso (41, 42, 44). O I-PEM deve ser apenas utilizado na identificação de microrganismos, na qual os anteriores métodos falharam em fornecer uma identificação exata, tendo em conta que os resultados por O-PEM e I-PEM são comparáveis na identificação de microrganismos comuns (42). Além disso, é importante referir que o protocolo mais adequado está otimizado para o equipamento disponível no laboratório de microbiologia (43). Apresenta-se os protocolos de pré-tratamento na Tabela 2.

Tabela 2 – Protocolos de tratamento da amostra pré-análise MALDI-TOF MS (42).

ICM	O-PEM	I-PEM
1.Espalhamento da colónia na lâmina-alvo;	1. Espalhamento da colónia na lâmina-alvo;	1. Selecionar várias colónias para tubo de <i>Eppendorf</i> com 300 µl de água destilada e 900 µl de etanol;
2.Sobreposição com solução de matriz de CHCA;	2. Sobreposição com solução de ácido fórmico a 70%;	2. Centrifugação para obtenção de <i>pellet</i> , decantar sobrenadante e deixar secar;
3.Deixar secar à temperatura ambiente (TA).	3. Deixar secar à temperatura ambiente;	3. Adicionar 15 µl de ácido fórmico a 70% e 15 µl de acetonitrilo;
	4. Sobreposição com solução de matriz de CHCA;	4. Centrifugação para obtenção de <i>pellet</i> ;
	5. Deixar secar à TA.	5. Transferir 1 µl de sobrenadante para lâmina-alvo e deixar secar à TA;
		6. Sobrepor com 1 µl de solução de matriz de CHCA e deixar secar à temperatura ambiente.

2.4.5. Detecção de Resistência a Antimicrobianos por MALDI-TOF MS

Atualmente existem metodologias que permitem a detecção de diferenças no espectro de massa gerado por isolados resistentes a um determinado antimicrobiano que possibilita a sua distinção de isolados sensíveis (14, 15, 17, 36). Os princípios para a detecção de resistências através de MALDI-TOF MS estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Fundamento teórico das metodologias de detecção de resistência a antimicrobianos por MALDI-TOF MS (14, 15, 17, 36).

Detecção de biomarcadores de resistência a antimicrobianos	Identificação picos de resistência através da análise de diferenças características entre o perfil espectral de isolados resistentes e sensíveis com base na metodologia de identificação de isolados microbiológicos.
Detecção do perfil espectral da hidrólise de antimicrobianos	Identificação da hidrólise de antimicrobianos β -lactâmicos através da detecção do desvio no espectro de massa após a sua incubação com isolados.
Detecção de aminoácidos marcados por isótopos estáveis (não radioativos)	Detecção da quantidade de incorporação de aminoácidos marcados com isótopos estáveis em proteínas recém-sintetizadas na presença de antimicrobianos.
Detecção do crescimento bacteriano na presença e ausência de antimicrobianos	Comparação do crescimento bacteriano com um crescimento padrão após incubação com antimicrobianos. O crescimento de um isolado suscetível apresenta um PMF com picos com intensidade menor comparado com isolado resistente.

A primeira metodologia distingue-se das restantes metodologias por não requer o uso adicional de reagentes e procedimentos que envolvam a incubação com antimicrobianos. Como tal, surge particular interesse nesta metodologia, devido à acessibilidade dos biomarcadores, não sendo necessário o investimento de mais custos, tempo ou recursos materiais, visto que a sua obtenção já é realizada durante a identificação de microrganismo (14, 15, 17, 36).

Existem vários estudos que demonstram o potencial do MALDI-TOF MS na detecção rápida de resistência a antimicrobianos através de biomarcadores (14, 15, 17, 36). Esta metodologia poderá proporcionar o aceleração do processo da decisão terapêutica antimicrobiana, nomeadamente no estudo da resistência à meticilina em *S. aureus*, permitindo discriminar MRSA de MSSA (14, 15, 17, 36). O tempo efetivo de identificação de isolados por esta metodologia varia entre equipamentos e do método de extração proteica utilizado (42-44). No

entanto, o tempo médio desde o processamento da amostra à identificação, com métodos de extração com deposição direta da solução de matriz e do isolado confere a obtenção da identificação do isolado até 40 minutos (42-44). Em comparação com métodos fenotípicos para o TSA, no caso de *S. aureus* podem decorrer até 8 horas, em estimativa a aplicação da detecção da resistência a meticilina por MALDI-TOF MS pode contribuir na redução até 24 horas (39, 45, 46). Em comparação, a detecção da resistência à meticilina com os métodos de BM, a redução temporal não é significativa, no entanto a redução de custos hospitalares poderá ser significativa (13, 17, 41).

Nomeadamente, vários estudos referem que a detecção dos biomarcadores PSM-mec e toxina delta permitem a identificação de MRSA através da MALDI-TOF MS (14, 16, 17, 36). No entanto, este biomarcador não permite detetar a resistência à meticilina em todas as linhagens de *S. aureus* (14, 32, 47). A última meta-análise relacionada com esta temática, além do biomarcador PSM-mec, incluiu estudos que abordaram biomarcadores adicionais e procedeu à avaliação da exatidão da identificação de MRSA por MALDI-TOF MS, onde se verificou-se que apresenta bom desempenho (48). Além disso, outros estudos reportam que a conjugação entre MALDI-TOF MS e ferramentas de Inteligência Artificial (IA) poderão permitir a rápida distinção entre MRSA e MSSA, sem a utilização de TSA convencional no estudo laboratorial de resistência a antimicrobianos (18, 21, 49-52).

Com tal, no presente estudo foi selecionado a “detecção de biomarcadores de resistência a antimicrobianos” para a identificação de biomarcadores de resistência à meticilina em *S. aureus*.

3. Objetivos

Com o intuito de possibilitar a aplicação da detecção de MRSA por MALDI-TOF MS na prática do diagnóstico laboratorial em Microbiologia, surge a necessidade de averiguar os potenciais biomarcadores de MRSA e MSSA.

Assim, o objetivo geral desta revisão sistemática de literatura é identificar os biomarcadores de detecção e discriminação de MRSA e MSSA por MALDI-TOF MS.

Os objetivos específicos foram definidos como:

- Identificar os principais biomarcadores de MRSA e MSSA que contribuem para a sua discriminação;
- Verificar a coerência dos biomarcadores de MRSA e MSSA;
- Abordar as diferenças entre os procedimentos técnicos para análise por MALDI-TOF MS;
- Abordar o contributo de ferramentas de IA para a identificação e discriminação de isolados de MRSA e MSSA.

4. Metodologia

Este estudo baseado numa Revisão Sistemática da Literatura, foi efetuado utilizando as *guidelines* de 2020 definidas por *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta Analyses* (PRISMA) (53).

4.1. Critérios P.I.C.O.

Foram definidos os seguintes critérios P.I.C.O.:

- População: Utentes com infeção por *S. aureus*;
- Intervenção: Detecção de biomarcadores de resistência à meticilina por MALDI-TOF MS;
- Comparador: Serão comparados os perfis de MRSA com MSSA;
- *Outcome*: Biomarcadores de resistência do *S. aureus* identificados por MALDI-TOF MS.

4.2. Estratégia de pesquisa

A pesquisa bibliográfica para este estudo foi realizada a 27 de julho de 2024, utilizando as bases de dados Pubmed e Web of Science. Nestas bases de dados foi utilizada a chave de pesquisa: (MALDI-TOF) AND ((MRSA) OR (methicillin-resistant Staphylococcus aureus) OR (methicillin resistant Staphylococcus aureus) OR (methicillin resistant S. aureus) OR (oxacillin resistant)) AND ((MSSA) OR (methicillin-sensitive Staphylococcus aureus) OR (methicillin sensitive Staphylococcus aureus) OR (methicillin sensitive S. aureus) OR (oxacillin sensitive)).

4.3. Critérios de elegibilidade

Todos os estudos disponíveis com acesso ao texto integral e em idioma inglês que surgiram no processo de recolha nestas bases de dados foram considerados elegíveis.

4.3.1. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão das publicações extraídas foram definidos segundo dois conjuntos distintos. Em relação aos tipos de publicações foram aplicados os critérios descritos na Tabela 4 e os estudos de revisões sistemáticas de literatura e meta-análises foram utilizados apenas para verificação de referências. As publicações obtidas pela estratégia de pesquisa utilizada foram selecionadas segundo os critérios de inclusão e exclusão disponíveis na Tabela 5.

Tabela 4 – Critérios de inclusão e exclusão segundo o tipo das publicações

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
Estudos observacionais prospectivos e retrospectivos;	<i>Reviews</i> ;
Estudos intervencionais e de análise de base de dados;	Editoriais;
Estudos não intervencionais.	Notas ao editor/comentários; <i>Letters, case-reports</i> ou <i>case-series</i> .

Tabela 5 – Critérios de inclusão e exclusão para a seleção de artigos em estudo

Critérios de inclusão	Critérios de exclusão
MRSA;	Infeções veterinárias;
MSSA;	Infeção por outros agentes infecciosos;
Infeção em humanos;	Artigos que apenas utilizem MALDI-TOF MS para identificação de isolados de <i>S. aureus</i> .
Biomarcadores de <i>S. aureus</i> .	

4.4. Gestão de dados

4.4.1. Processo de seleção

Numa fase inicial, os estudos resultantes da pesquisa bibliográfica foram selecionados por título, com base nos critérios de inclusão e exclusão. A seleção por *abstract* e do *full-text* foi processada, com base nos critérios de inclusão e exclusão, por dois revisores independentes procedendo ao processo de seleção com base na decisão unânime destes dois revisores. Em casos de discordância um terceiro revisor avaliou os *abstracts* e *full-text* e foi tomada a decisão em relação a esse estudo.

4.4.2. Processo de recolha

Os estudos selecionados foram compilados e organizados utilizando os *softwares* informáticos *EndNote*™ da Clarivate Analytics e *Excel*® da Microsoft Office.

4.4.3. Avaliação de qualidade

A avaliação da qualidade dos estudos, o risco de viés e a precisão dos dados foi avaliada através das ferramentas de avaliação crítica do *Joanna Briggs Institute*, de acordo com o tipo de estudo em avaliação (estudos caso-controlo, estudos transversais, etc). Esta ferramenta é adequada para este tipo de estudos, pois pode ser utilizada para valorizar a qualidade,

adaptada de acordo com o desenho do estudo e de forma sistemática (54). Para gerar uma representação gráfica e resumo do risco de viés foi utilizado a ferramenta Risk-of-bias VISualization (robvis) (55).

4.4.4. Análise dos Dados e Síntese

Os dados extraídos dos estudos selecionados foram organizados por: autor, ano, número de amostras incluídas, localização do estudo, método de referência na diferenciação MRSA e MSSA, equipamento MALDI-TOF MS utilizado, protocolo MALDI-TOF MS, biomarcadores de resistência à metilina, resistência à metilina e sensibilidade à metilina e utilização de ferramentas de IA. Estes dados foram sintetizados e organizados em forma de tabela. A análise estatística descritiva e o tratamento de dados foram efetuados com auxílio do *software* informático *Excel*[®] da Microsoft Office. Para alguns dos estudos que não apresentaram claramente a exatidão ou *area under the curve* (AUC) para a diferenciação de MRSA e MSSA, recorreu-se ao *MedCalc Software* (56).

4.5. Informações adicionais

O PROSPERO é uma entidade internacional para revisões sistemáticas que regista prospectivamente protocolos de revisões sistemáticas, disponibiliza publicamente os registos e emite um número de registo único para cada protocolo registado. Esta entidade promove a transparência, reduzindo o viés, evita repetições involuntárias e os desperdícios na investigação.

Com o intuito de garantir a qualidade e transparência deste estudo os investigadores procederam ao registo no PROSPERO sobre o número CRD42024591404, cujo formulário de registo está disponível no Anexo 2 (57).

5. Resultados

Os estudos extraídos foram selecionados de acordo com o fluxograma da metodologia PRISMA, apresentado na Figura 3 que resume o processo de seleção. Conforme descrito na Metodologia, a pesquisa foi efetuada utilizando a chave de pesquisa nas duas bases de dados - *PubMed* e *Web of Science* - gerando um total de 244 publicações, sem restrição de intervalo de datas de publicação. Pode-se verificar que a maioria dos estudos foram extraídos do *PubMed* (n=158) e os restantes do *Web of Science* (n=86).

Todas as publicações extraídas foram publicadas na língua inglesa. O processo de identificação de duplicados foi efetuado antes do *screening* com recurso ao *software* EndNote, que identificou por comando um total de 64 estudos, restando 180 para *screening*.

O *screening* foi efetuado por título, *abstract* e *full-text* de acordo com os critérios de elegibilidade. No *screening* por título dos 180 estudos, foram excluídos 109 estudos. Dos restantes 71 estudos procedeu-se ao *screening* por *abstract* através da avaliação dos dados do estudo (Tabela 4 e 5). Na última fase do processo, foi realizado o *screening* por *full-text*. Durante todo o *screening*, os investigadores selecionaram independentemente os estudos e por decisão unânime, recorrendo ao terceiro investigador em caso de discordância. Durante o processo de *screening* por *full-text* foram encontrados 4 estudos sem texto integral, que foram atribuídos ao bloco "Reports not retrieved". No bloco "Reports excluded" da Figura 3, estão apresentadas as razões de exclusão durante a fase de *screening* do *abstract* e *full-text*. Como resultado final, foram incluídos 15 estudos.

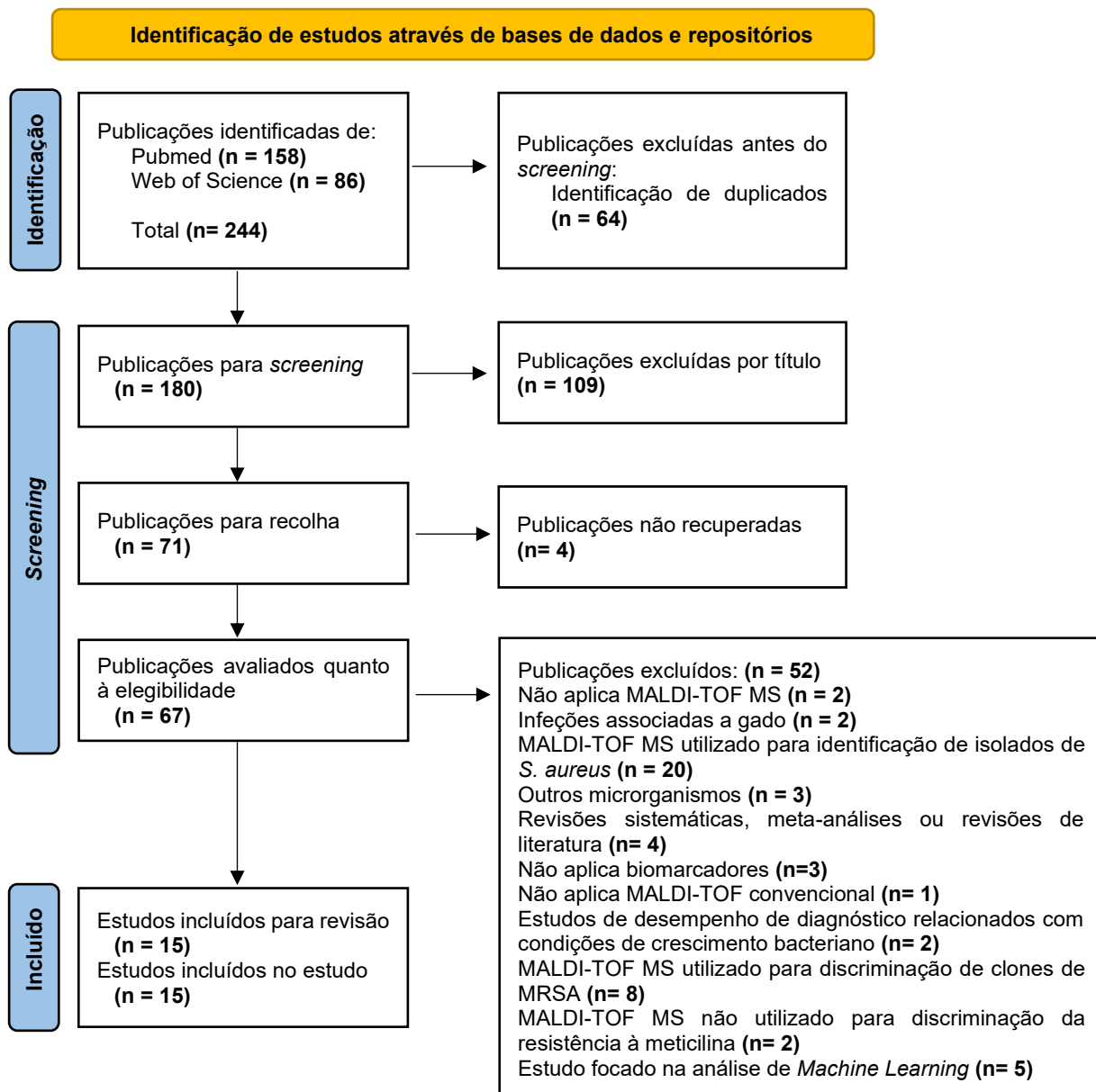


Figura 3 – Fluxograma PRISMA detalhado dos estudos incluídos, adaptado de Page et al, 2021 (53).

5.1. Resultados da avaliação crítica da qualidade pelas ferramentas do Joanna Briggs Institute

Neste estudo todos os artigos tiveram um desenho transversal, que foram avaliados com 8 perguntas, segundo o formulário apropriado para o seu desenho, respondidas como: “Sim”, “Não”, “Incerto” ou “Não aplicável” (58). O resultado da avaliação crítica realizada pelos investigadores apresenta-se sobre a forma de tabela, segundo o formulário para estudos transversais do *Joanna Briggs Institute* que está disponível no Apêndice 2. A representação gráfica e resumo do risco de viés está presente na Figura 4. De modo a gerar os dados apresentados para a representação gráfica foi necessário convertê-los segundo o nível de risco de viés: “Sim” em “Low”, “Não” em “High”, “Incerto” em “Unclear” e “Não aplicável” em

“No information”. O risco global do viés foi classificado como baixo quando o estudo atingiu mais do que 70% das classificações “Sim”, moderado entre 50-69% e alto quando foi inferior a 49%. De modo geral, a qualidade dos estudos e a exatidão dos dados foram satisfatórios e o risco de viés foi baixo.

A

Study	Risk of bias								Overall
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	
Abalkhail & Elbehiry, 2022	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Alksne et al, 2020	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Du et al, 2002	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Edwards-Jones et al, 2000	+	+	-	+	+	?	+	+	+
Elbehiry et al, 2023	+	+	X	+	+	?	+	+	+
Fan et al, 2024	+	+	X	+	+	?	+	+	+
Gao et al, 2002	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Hu et al, 2019	+	+	X	+	+	?	+	+	+
Josten et al, 2014	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Kim et al, 2019	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Paskova et al, 2020	+	+	-	+	+	?	+	+	+
Rhoads et al, 2016	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Sogawa et al, 2017	+	+	+	+	+	?	+	+	+
Wang et al, 2013	+	+	+	+	+	?	+	-	+
Yu et al, 2022	+	+	X	+	+	?	+	+	+

D1: Were the criteria for inclusion in the sample clearly defined?
D2: Were the study subjects and the setting described in detail?
D3: Was the exposure measured in a valid and reliable way?
D4: Were objective, standard criteria used for measurement of the condition?
D5: Were confounding factors identified?
D6: Were strategies to deal with confounding factors stated?
D7: Were the outcomes measured in a valid and reliable way?
D8: Was appropriate statistical analysis used?

Judgement
● High
● Unclear
● Low
● No information

B

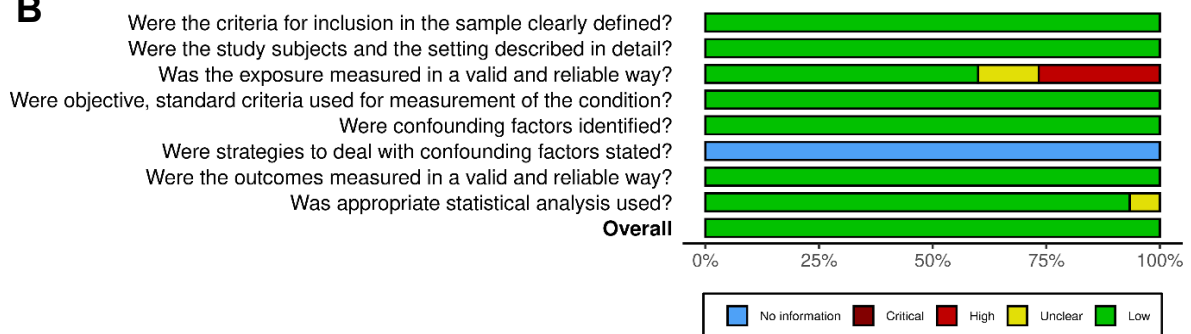


Figura 4 – Representação gráfica (A) e resumo da avaliação do risco de viés (B). O símbolo a verde corresponde a baixo risco de viés, o símbolo amarelo corresponde a risco de viés incerto e o símbolo vermelho corresponde a alto risco de viés, o símbolo vermelho escuro corresponde a risco de viés crítico e o símbolo azul interrogado corresponde a falta de informação. Os elementos gráficos foram gerados pela ferramenta Risk-of-bias VISualization (robvis) (55).

5.2. Síntese dos dados

Os dados foram organizados sobre a forma de tabela síntese, que incluem todos os aspectos importantes para a discussão do tema em estudo. Na Tabela 6 (tabela resumida) e Apêndice 1 (tabela completa) estão disponíveis os dados recolhidos: autor e ano, o local do estudo, a amostra em estudo, o método de referência para a sensibilidade à metilina ou detecção do gene *mecA*, o equipamento MALDI-TOF MS utilizado, o protocolo de pré-tratamento da amostra aplicado, os biomarcadores de resistência e sensibilidade à metilina discutidos e a abordagem com ferramentas de IA para a discriminação da resistência à metilina.

Tabela 6 – Tabela síntese dos artigos incluídos que inclui as características: autor/ano, amplitude da amostra, método de referência, analisador MALDI-TOF MS, método de preparação da amostra, biomarcadores de resistência e sensibilidade e modelos de IA (Resumida).

Autores, ano	Metodologia				Resultados		
	Amplitude da amostra	Método de referência	Analisador MALDI-TOF MS	Método de preparação da amostra	Biomarcadores de Resistência (Da)	Biomarcadores de Sensibilidade (Da)	Modelos de IA
Abalkhail & Elbehiry, 2022 (18)	22 MRSA e 26 MSSA	PCR do gene <i>mec A</i>	MALDI Biotyper (Bruker Daltonics)	I-PEM *1	5530, 6580, 6710 e 6820	2771, 2996, 3720, 4480, 4540 e 6310	PCA
Alksne et al, 2020 (59)	26 MRSA e 28 MSSA	PCR do gene <i>mec A</i>	Autoflex Speed MS (Bruker Daltonics)	I-PEM *1 O-PEM *1 ICM *1	ICM e O-PEM: PSM-mec (2414 ± 2) ICM, O-PEM e I-PEM: toxina delta (3006 ± 2)	ND	NA
Du et al, 2002 (19)	35 MRSA e 41 MSSA	PCR do gene <i>mec A</i>	linear MALDI-TOF MS (Micromass UK Ltd.)	O-PEM *2	Principais picos: 2413,01 e 2453,54	Principais picos: 2547,91, 2585,28, 2686,45 e 2723,17	NA
Edwards-Jones et al, 2000 (20)	7 MRSA e 7 MSSA	Tipagem com PFGE e com <i>phage typing</i>	Kompact MALDI 2 linear TOF MS (Kratos Analytical)	O-PEM *2	891, 1140, 1165, 1229, 2127, 2454 e 3045	2548 e 2647	NA
Elbehiry et al, 2023 (21)	197 MRSA e 129 MSSA	Teste de Kirby-Bauer	MALDI Biotyper (Bruker Daltonik)	I-PEM *1	3990, 4120 e 5850	Ausência de picos de resistência	PCA

Fan et al, 2024 (60)	20 MRSA e 30 MSSA	Teste automatizado de TSA	VITEK MS (bioMérieux)	Protocolo Amp-MB O-PEM *3	4304,6889 (A.U. superior em isolados de MRSA) 3874,4304 e 6889	3041,2293 (A.U. superior em isolados de MSSA)	NA
Gao et al, 2002 (61)	21 MRSA e 41 MSSA	Teste de Kirby- Bauer PCR do gene <i>mec A</i>	Autoflex max TOF/TOF MS (Bruker Daltonics)	I-PEM *4	4821 e 9645	2306 e 2322 (A.U. superior em isolados de MSSA)	PCA
Hu et al, 2019 (62)	241 MRSA e 106 MSSA	Teste de Kirby- Bauer	MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	PSM-mec (2413 ± 2)	ND	Clinpro Tools v.3.0
Josten et al, 2014 (63)	356 <i>S.aureus</i>	Teste de Kirby- Bauer e PCR do gene <i>mec A</i> (confirmado com PCR <i>multiplex</i> da <i>SCCmec</i>)	MALDI-TOF MS Biflex II (Bruker Daltonic) VITEK MS (bioMérieux)	O-PEM *1 ICM *5	PSM-mec (CC5): 2415 (intervalo 2404 - 2420) Toxina delta: 3007 (restantes CC's) e 3037 (CC1)	ND	NA
Kim et al, 2019 (49)	320 <i>S.aureus</i> (base de dados) 181 <i>S.aureus</i> (amostra teste)	PCR do gene <i>mec A</i> e tipagem da <i>SCCmec</i>	Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	<i>SCCmec</i> IV: 5541 (+) e 5053 (-) <i>PSM-mec</i> (<i>SCCmec</i> III específico): 2410 e 4607 Pelo menos um: 1975, 2410, 3890, 4607 e 6594	2194, 2339 e 2631	BioNumerics (Algoritmo <i>decision tree</i>)

Paskova et al, 2020 (64)	35 MRSA	ND	MicroFlex mass spectrometer (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	PSM-mec (2413 ± 3) e toxina delta (3006 ± 3)	ND	NA
Rhoads et al, 2016 (65)	137 MRSA e 146 MSSA 12 MRSA USA 100-USA1200	PCR do gene <i>mec A</i>	VITEK MS (bioMérieux) Bruker MicroFlex (Bruker Daltonics): isolados USA	ICM *5	PSM-mec (2415 ± 4); intervalo otimizado (2415 ± 2)	ND	NA
Sogawa et al, 2017 (50)	50 MRSA e 50 MSSA (algoritmo) 34 MRSA e 31 MSSA (amostra teste)	PCR do gene <i>mec A</i>	Autoflex II TOF (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	1888.1 (430.3 A.U.), 1935.9 (880.8 A.U.), 2867.9 (1490.9 A.U.), 3044.2 (20061.4 A.U.)*6 e 4641.3 (260.0 A.U.)	1935.9 (662.2 A.U.) e 2760,3 (1230.1 A.U.)	NL-SVM
Wang et al, 2013 (51)	48 MRSA e 52 MSSA	PCR do gene <i>mec A</i>	MALDI-Microflex (Bruker Daltonics)	I-PEM *1	3784 e 5700 (A.U. superior em isolados de MRSA)	3784 e 5700 (A.U. inferior em isolados de MSSA)	Clinpro Tools (Algoritmo genético)
Yu et al, 2022 (52)	4309 MRSA e 3949 MSSA (algoritmo) 12101 MS (validação externa)	Teste automatizado de TSA	MicroflexLT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	6593,2	6550,0	LightGBM

*1 – solução de matriz de CHCA com 50% acetonitrilo e 2.5% ácido trifluoracético; *2 – solução de matriz de CMBT (acetonitrilo/metanol/água destilada (1:1:1, v/v/v), com 0.1% ácido fórmico e 0.01 M de éter 18-coroa-6); *3 – Extração com ácido fórmico e com matriz VITEK-MS-CHCA (#411071): solução de matriz de CHCA com 20-30% acetonitrilo, 20-30% etanol e 3-5% ácido trifluoracético (66); *4 – solução de matriz de

CHCA-C3 com acetonitrilo em água destilada (v/v = 1/1) com 2% trifluoracético; *⁵ – VITEK-MS-CHCA (#411071): solução de matriz de CHCA com 20-30% acetonitrilo, 20-30% etanol e 3-5% ácido trifluoracético, sem ácido fórmico (66); *⁶ – m/z correspondente a um fragmento da PBP2a.

Legenda: ND - não descrito; NA - não aplicado; CC – complexo clonal; CMBT - 5-Cloro-2-mercaptobenzotiazol; CHCA - ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico; FA - ácido fórmico; ICM - método *intact-cell*; O-PEM - método de extração proteica *on-target*; I-PEM - método de extração proteica *in-tube*; A.U. - intensidade média; QC - Controlo de Qualidade; PCA - *Principal Component Analysis*; NL-SVM - *Non-linear Support Vector Machine*; LightGBM - *Light Gradient Boosting Machine*; MS - espectro de massa.

5.3. Características dos estudos selecionados

Nas 15 publicações incluídas neste estudo, a maioria são originárias de países asiáticos, principalmente na China, que ao todo perfazem 8 estudos (19, 49-52, 60-62). Os restantes são do Médio Oriente (2 da Arábia Saudita) (18, 21), da região europeia (1 da República Checa (64) e 1 do Reino Unido (20), 1 da Alemanha (63) e 1 da Letónia (59)), sendo um destes um estudo multicêntrico (64) e por fim um estudo é originário dos Estados Unidos da América (65) (Figura 5). No estudo alemão de Josten et al, 2014 são incluídos 13 isolados internacionais, no entanto apresenta baixo impacto numa amostra de 356 isolados de *S. aureus* (63).

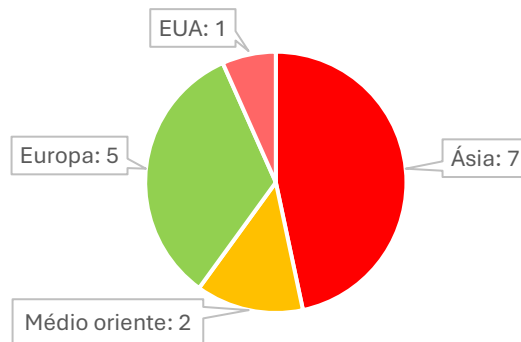


Figura 5 – Origem geográfica dos artigos selecionados em frequência absoluta.

No âmbito da amplitude da amostra incluída nestes estudos, existe variabilidade no número total de isolados incluídos. As amostras variam entre os 14 e 20359 isolados de *S. aureus*, sendo na maioria dos estudos discriminado o número de isolados representativos de MRSA e MSSA, demonstrando razoável igualdade na sua distribuição (18-21, 49-52, 59-65). Além disso, alguns dos estudos incluem isolados de referência no estudo da deteção de biomarcadores de resistência à metilina por MALDI-TOF MS, nomeadamente estípes de referência da American Type Culture Collection (ATCC) (20, 59-61, 63). O estudo com maior abrangência apresenta 8258 isolados de *S. aureus* que foram utilizados para a construção da base de dados interna e incluídos na construção do modelo de IA e 12101 espectros de massa utilizados como meio de validação externa do modelo (52).

Na maioria dos estudos é descrito a utilização de um método *gold-standard* através da deteção do gene *mecA* ou a deteção fenotípica da sensibilidade à metilina, à exceção de um deles que não faz menção à metodologia utilizada para este fim (18-21, 49-52, 59-65). Em específico, oito estudos utilizam técnicas de BM para a deteção do gene *mecA*, dois utilizam o teste de Kirby-Bauer para determinar a sensibilidade à metilina e dois utilizaram ambos os métodos *gold-standard* e de referência para deteção do gene *mecA* e a deteção fenotípica da sensibilidade à oxacilina (18-21, 49-52, 59-65). E apenas dois deles utilizaram testes

automatizados baseados em características bioquímicas para a discriminação da sensibilidade à oxacilina (52, 60).

5.4. Equipamentos e protocolo de análise MALDI-TOF MS

Nos estudos analisados, os autores utilizaram principalmente equipamentos MALDI-TOF MS de dois sistemas de diagnóstico distintos. Em 10 estudos foram utilizados equipamentos da Bruker Daltonics, 1 da bioMérieux e em 2 estudos foram utilizados equipamentos de ambos (18, 21, 49-52, 59-65). Nos restantes 2 estudos que se datam de 2000 e 2002 foram utilizados equipamentos da Kratos Analytical Ltd. e Micromass UK Ltd., respetivamente (19, 20).

Dos protocolos de pré-tratamento da amostra para análise MALDI-TOF MS, o mais utilizado foi o O-PEM, representado por 9 estudos e o segundo mais utilizado foi o I-PEM, representado por 4 estudos (Figura 6) (18-21, 49-52, 59-65).

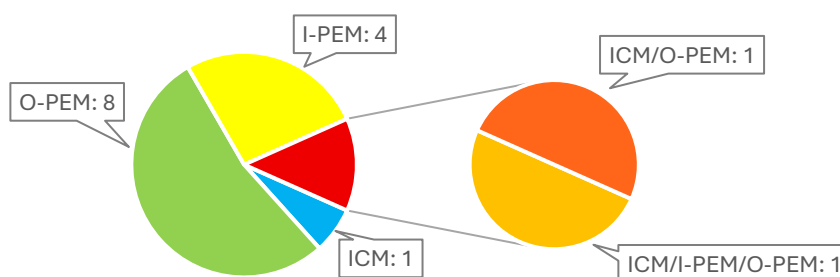


Figura 6 – Descrição em frequência absoluta dos protocolos utilizados nos estudos incluídos.

Dos estudos que utilizam O-PEM, dois deles, dos anos 2000 e 2002, utilizam uma solução de matriz de CMBT (acetonitrilo/metanol/água destilada (1:1:1, v/v/v), com 0.1% ácido fórmico e 0.01 M éter 18-coroa-6) (19, 20). Um dos estudos aplicou um protocolo de pré-concentração utilizando uma técnica de separação com partículas magnéticas conjugadas com ampicilina para a deteção por MALDI-TOF MS de MRSA em baixa concentração em amostras biológicas (60). Neste estudo é descrita a extração proteica com ácido fórmico, mas sem especificar a matriz (60). Pode-se assumir que dado que utilizaram um equipamento da bioMérieux, terá sido utilizada a solução de matriz VITEK-MS-CHCA (#411071), que contém CHCA, 20-30% acetonitrilo, 20-30% etanol e 3-5% ácido trifluoracético (60, 66). No estudo de Josten et al. de 2014, um dos equipamentos é da Bruker Daltonics, que utilizou solução de matriz com CHCA, 50% acetonitrilo e 2.5% ácido trifluoracético (63). Nos restantes estudos que fizeram análise dos isolados com equipamentos da Bruker Daltonics, utilizaram a mesma solução de matriz referida anteriormente (49, 50, 52, 62, 64).

Nos estudos que utilizaram o protocolo I-PEM, três dos estudos procederam à extração inicial por ácido fórmico a 70% e posteriormente utilizam uma solução de matriz com CHCA, 50%

acetonitrilo e 2.5% ácido trifluoracético (18, 21, 51). O restante estudo utilizou uma solução de matriz experimental de CHCA esterificado, à qual referem que apresenta melhor extração de proteínas e péptidos hidrofóbicos, que contém CHCA-C3, acetonitrilo em água destilada (v/v = 1/1) e 2% trifluoracético (61).

Em relação ao estudo de Rhoads et al, 2016, foram utilizados equipamentos da bioMérieux e Bruker Daltonics, no qual descrevem que a amostra foi diretamente colocada na lâmina-alvo sem ácido fórmico, mas não descrevem a solução de matriz utilizada (61). No entanto, em relação ao equipamento da bioMérieux pode-se partir do pressuposto que a solução de matriz utilizada foi a VITEK-MS-CHCA (#411071), tendo sido utilizado o ICM (61, 66). Por outro lado, para o equipamento da Bruker Daltonics é apenas descrita que a análise foi efetuada com a deposição da amostra e da matriz, sem descrição dos componentes, tendo sido utilizado o ICM (65). E além disso, este apenas foi utilizado para a análise de isolados USA100-USA1200 (65). No estudo de Josten et al de 2014, um dos equipamentos que utilizou foi da bioMérieux, no qual utilizaram a solução de matriz VITEK-MS-CHCA (#411071) (63, 66).

No estudo de Alksne et al, 2020, foram utilizados os três protocolos de pré-tratamento com o objetivo de verificar as diferenças de resultados na obtenção dos biomarcadores, variando entre a análise após a preparação em tubo e a análise com a colocação da amostra diretamente na lâmina-alvo com ou sem o tratamento com ácido fórmico a 70%, mas utilizando sempre para cada um dos protocolos uma solução de matriz de CHCA, 50% acetonitrilo e 2.5% ácido trifluoracético (59).

5.5. Biomarcadores de resistência e sensibilidade à metilina

No âmbito dos biomarcadores de resistência e sensibilidade à metilina foram obtidos resultados variáveis, contidos entre o intervalo dos 891 Da e 9645 Da, podendo ser agrupados em biomarcadores “clássicos” e “adicionais” (18-21, 49-52, 59-65).

Nos estudos incluídos, cinco discutem biomarcadores “clássicos” da resistência à metilina, que são o PSM-mec e a toxina delta, que foram obtidos por diferentes protocolos de pré-tratamento (59, 62-65). Em relação ao PSM-mec em qualquer um dos estudos apresenta um valor coerente, com uma m/z que ronda os 2414 Da, havendo apenas alguma variabilidade no intervalo de incerteza (59, 62-65). Em Josten et al, 2014, está descrito um intervalo mais alargado para m/z do PSM-mec que pode variar entre 2404 e 2420 Da, mas referindo que corresponde a isolados de MRSA do complexo clonal 5 (CC5) (63). O PSM-mec é descrito como um biomarcador extremamente específico, não só representativo da resistência à metilina em *S. aureus*, mas também em outros *Staphylococcus* spp., nomeadamente em *S. epidermidis* (59, 62-65). Sendo também referido que o PSM-mec pode atingir uma especificidade de 100%, mas com sensibilidade baixa e reprodutibilidade variável (59, 62-65).

No entanto, o gene *psm-mec* só está presente em isolados com *SCCmec* do tipo II, III e VIII, apenas apresentando o potencial de identificação de cerca de metade dos isolados de MRSA (59, 62-65). Este biomarcador apresenta intensidade variável de acordo com o protocolo utilizado, sendo possível a sua obtenção apenas seguindo os protocolos ICM e O-PEM (59, 62-65). Em um dos cinco estudos que discutem este biomarcador, também é utilizado o *software Clinpro Tools*, como interveniente para a determinação da capacidade discriminação de MRSA e MSSA, utilizando o módulo de subtipagem do equipamento Bruker MALDI Biotyper (62). Os resultados dos testes de desempenho dos estudos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados dos testes de desempenho para o PSM-mec.

	Alksne et al, 2020 (59)	Hu et al. 2019 (62)	Josten et al. 2014 (63)	Rhoads et al, 2016 (63)	Paskova et al, 2020 (64)
Sensibilidade	61% *1	60,2%	94,7% *3	37%	50/90% *4
Especificidade	100% *1	100%	100% *3	100%	100%
Reprodutibilidade	87% *1	ND	ND	ND	33-100% *5
Repetibilidade	ND	1,7/18,4% *2	ND	ND	ND

*1 – utilizando ICM; *2 – repetibilidade *intra-batch* e *inter-batch*, respetivamente; *3 – resultados obtidos em isolados MRSA *agr*-positivos por ICM; *4 – em isolados com *SCCmec* II e III, respetivamente; *5 – reprodutibilidade inter-laboratorial.

A toxina delta é também discutida em três destes estudos, como um biomarcador que pode auxiliar na deteção da MRSA (59, 63, 64). Este biomarcador apresenta um valor coerente entre estudos, com uma m/z que ronda os 3006 Da, sem um intervalo de variação relevante, à exceção do descrito por Josten et al de 2014, que apresenta uma m/z de 3037 Da em isolados de CC1 (59, 63, 64). A toxina delta é expressa pelo gene *agr* que intervém na regulação da expressão do PSM-mec (59, 63, 64). Como tal, a sua deteção pode indicar a presença do PSM-mec, pelo que todos os isolados com PSM-mec detetável apresentam toxina delta (59, 63, 64). Contudo a sua presença não indica por si só resistência à meticilina, não sendo desta forma específica ou indicativa da presença de um isolado de *S. aureus*, pois pode ser encontrada em qualquer *Staphylococcus* spp. *agr* positivo (59, 63). A toxina delta apresenta melhores resultados em relação à intensidade do sinal comparado com o PSM-mec, em particular em isolados com *SCCmec* II e III (59, 63). Josten et al, 2014 e Alksne et al, 2020, reportam que são obtidos melhores resultados com protocolos ICM e O-PEM do que

com I-PEM, podendo até apresentar a maior intensidade de todo o espectro de massa (59, 63).

Os restantes dez estudos que utilizam biomarcadores, aqui denominados como biomarcadores “adicionais”, são divididos em biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina. Estes apresentam variabilidade entre estudos em relação aos protocolos de pré-tratamento utilizados e à aplicação de modelos de IA (18-21, 49-52, 60, 61). A sua aplicação na discriminação de isolados de MRSA e MSSA baseia-se em diferenças de intensidade de sinal dos biomarcadores ou em biomarcadores que não coexistem em isolados resistentes e sensíveis à meticilina (18-21, 49-52, 60, 61). Essa distinção pode ser efetuada visualmente ou automaticamente com auxílio das plataformas associadas ao equipamento MALDI-TOF MS (18-21, 49-52, 60, 61).

De acordo com os biomarcadores recolhidos dos estudos é possível verificar na Figura 7 e 8 que os biomarcadores de resistência estão em maior número e apresentam um padrão mais difuso, comparando com os biomarcadores de sensibilidade que estão em menor número e que se concentram entre 2500 a 3500 Da com alguns *outliers* entre 6200 a 6600 Da.

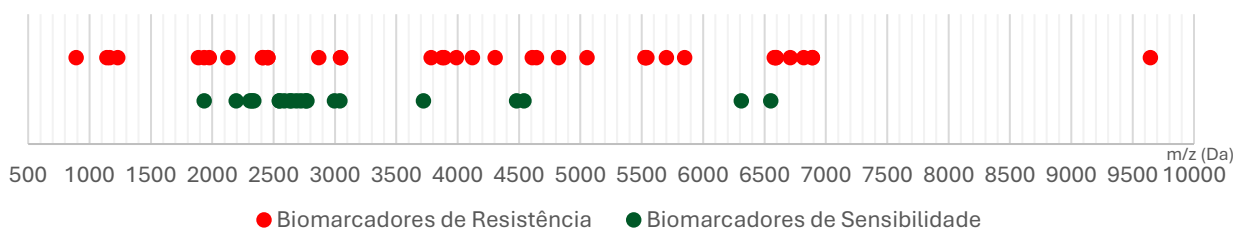


Figura 7 - Distribuição dos biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina em *S. aureus*.

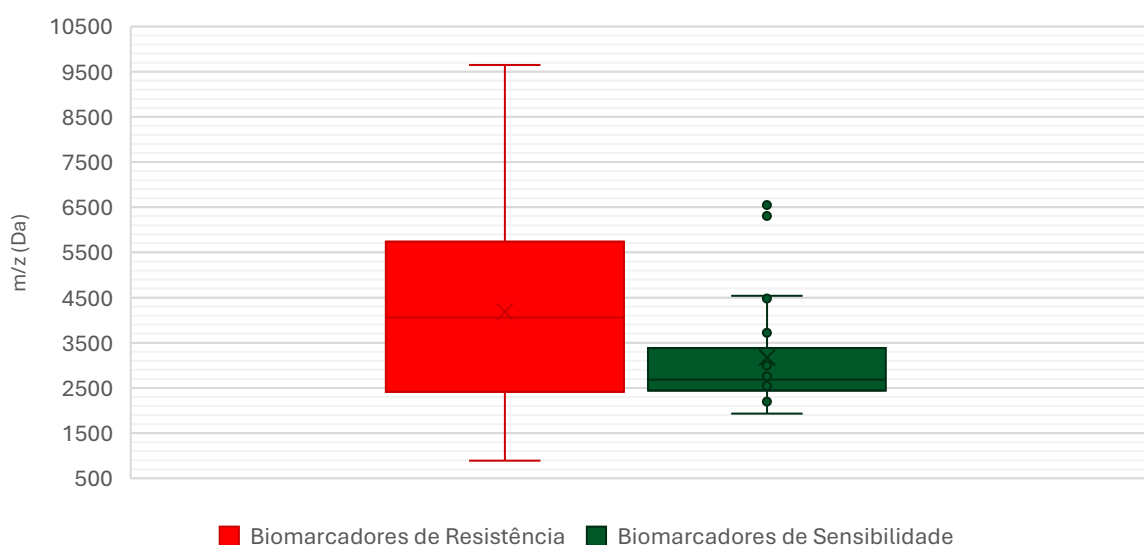


Figura 8 - Distribuição dos biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina em *S. aureus* (Diagrama de caixa).

Na Tabela 8 estão apresentadas as taxas de exatidão ou *area under the curve* (AUC) para a diferenciação de MRSA e MSSA envolvendo os estudos selecionados com biomarcadores adicionais identificados com e sem recurso a ferramentas de IA.

Tabela 8 – Testes de desempenho da identificação e discriminação de MRSA e MSSA utilizando os biomarcadores adicionais.

Teste de desempenho	Abalkhail (18)	Du (19)	Edwards -Jones (20)	Elbehiry (21)	Fan (60)	Gao (61)	Kim (49)	Sogawa (50)	Wang (51)	Yu (52)
Exatidão (%)	100	90,8 ^{1;2*}	85,7 ^{1;2*}	97,8 ^{1*}	96,0 ^{1;2*}	96,8 ^{1*}	87,6	89-100	ND	—
AUC	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,91-0,78

Legenda: ND – não descrito. ^{1*} – calculado utilizando o *MedCalc Software* (56); ^{2*} – não aplica ferramentas de IA.

5.6. Utilização de ferramentas de IA

No âmbito da aplicação de modelos de IA foram encontrados oito estudos que utilizaram estas ferramentas para facilitar na discriminação da resistência à meticilina por MALDI-TOF MS (18, 21, 49-52, 61, 62).

O *Principal Component Analysis* (PCA) é utilizado em três estudos que aplicaram biomarcadores “adicionais” (18, 21, 61). A PCA é uma técnica matemática suplementar disponível no programa informático Compass utilizado em equipamentos da Bruker Daltonics (18, 21). Esta técnica aplica modelos estatísticos para demonstrar o grau de probabilidade e diversidade em perfis de espectros de massa, permitindo reduzir a variabilidade de bases de dados complexas (18, 21, 67). Os biomarcadores são agrupados consoante a sua correspondência, em isolados resistentes e sensíveis e podem ser representados em gráficos *scatterplot* bidimensionais ou tridimensional, permitindo estabelecer relações dimensionais entre amostras (18, 21, 61).

O *Clinpro Tools* é um *software* aplicado em dois dos estudos para a discriminação dos isolados, segundo os biomarcadores presentes em isolados resistentes e sensíveis, através de pré-tratamento dos dados, análise estatística e aplicação de vários modelos matemáticos (51, 62, 68). Em Hu et al, 2019 este *software* foi apenas utilizado para analisar a discrepância entre isolados de MRSA com PSM-mec presuntivamente positivo em comparação com isolados de MSSA, MRSA sem pico PSM-mec específico e isolados com resultados incoerentes (62). Em Wang et al, 2013, o *Clinpro Tools* foi utilizado para fazer a análise do espectro de massa com algoritmo genético para verificar diferenças de padrões no espectro de massa entre isolados de MRSA e MSSA (51).

O estudo de Kim et al, 2019, utilizou o *software* BioNumerics para realizar um pré-processamento dos espectros de massa através da recalibração, subtração da *baseline* e seleção dos picos. Neste foram selecionados biomarcadores específicos de MRSA e MSSA e picos específicos de acordo com o tipo de *SCCmec* presente nos isolados de MRSA (49). Estes picos foram utilizados para a construção de um modelo preditivo simples baseado na combinação de picos específicos e de um modelo *Decision Tree*, os quais foram capazes de discriminar a resistência e sensibilidade à metilicina. No modelo *Decision Tree*, os isolados sem atribuição a nenhuma das duas categorias (zona cinzenta) foram categorizados como dúbios. Foi realizada a comparação dos modelos e verificou-se que o modelo *Decision Tree* obteve melhores resultados no grupo teste (49).

O estudo de Sogawa et al, 2017, utilizou o *software* MALDI BioTools no processamento dos espectros de massa iniciais através de *non-linear Support Vector Machine* (NL-SVM) para a construção do algoritmo, permitindo a seleção dos biomarcadores para a discriminação de isolados de MRSA e MSSA (50).

No estudo de Yu et al, 2022, os dados dos espectros de massa foram pré-processados com um conjunto de ferramentas de análise estatística para preparar para a fase de análise com dez algoritmos de *Machine Learning* (Light Gradient Boosting Machine [LightGBM], Gradient Boosting, Regressão Logística, Extreme Gradient Boosting, Extra Trees, Random Forest, Linear SVM, Decision tree, K neighbors e naive Bayes). Neste estudo foi aplicado o modelo de LightGBM como modelo de classificação para a seleção dos biomarcadores (52).

Com recurso a estes modelos de IA, os estudos reportaram em geral uma exatidão ou *area under the curve* (AUC) para a diferenciação de MRSA e MSSA superior a 90% (Tabela 8).

6. Discussão

O MRSA apresenta-se tanto em ambiente nosocomial como em ambiente comunitário revelando-se como um risco de infecção associado a maior mortalidade e morbidade comparando com infecções por MSSA (2-4, 6). Segundo a OMS, o MRSA mantém-se no topo da lista de agentes bacterianos prioritários por continuar a ser desafiante no tratamento de infecções por si causadas e com elevados encargos financeiros para os serviços de saúde (1-3). No sentido da redução do período de suscetibilidade à infecção, a deteção e discriminação de MRSA de MSSA é crucial para o início da terapêutica dirigida (3, 8, 9, 69).

Atualmente, são utilizados procedimentos convencionais para a identificação microbiológica e deteção de resistências a antimicrobianos, que podem demorar entre 48 a 72 horas (10, 11). As técnicas de BM permitem disponibilizar um diagnóstico laboratorial da resistência à meticilina em *S. aureus* em menos de 2 horas, reduzindo o tempo de resposta, apesar de apresentarem algumas limitações e serem dispendiosas (10, 21). MALDI-TOF MS tem sido visto como um avanço significativo no âmbito da prestação de cuidados de saúde como meio de diagnóstico para a identificação microbiológica, possibilitando a redução do tempo de resposta e do custo financeiro (14, 16). Mais recentemente, esta tecnologia tem cativado a atenção para o estudo da deteção de resistências a antimicrobianos, nomeadamente na deteção de MRSA, pela sua conhecida conveniência, desempenho e por já ser utilizado em muitos laboratórios de microbiologia para a identificação de isolados microbiológicos (18, 21). Com recurso a uma recente meta-análise onde se avaliou o custo-eficiência da aplicação de MALDI-TOF MS no desfecho em utentes com bacteriemias, verificou-se uma diferença significativa na redução de custos hospitalares diretos, redução da estadia em internamento, mortalidade e importantemente da redução no tempo efetivo para o início da antibioterapia (46). A aplicação desta metodologia poderá contribuir ainda mais na redução destes fatores e para o aumento dos *Quality-Adjusted Life Years* em utentes com infecções por *S. aureus* (45, 48).

Este estudo foi focado na identificação dos biomarcadores de deteção e discriminação de isolados clínicos de MRSA em humanos. Neste trabalho foram incluídos artigos onde foram utilizados diferentes equipamentos e protocolos experimentais. No entanto, devido à diferença nos fornecedores dos equipamentos e respetivos modelos, parâmetros técnicos dos equipamentos, bases de dados e a aplicação de modelos de IA, serão explorados principalmente os resultados experimentais na deteção de biomarcadores de resistência e sensibilidade no PMF. A meta-análise de Chen et al, 2022 foi utilizada como verificação de referência para os artigos incluídos neste estudo.

Em relação aos protocolos de pré-tratamento da amostra para análise MALDI-TOF MS, os resultados variam em relação à capacidade de detecção de isolados de bactérias Gram positivas (42, 44). Segundo Alksne et al, 2020, as identificações de *S. aureus* apresentaram maior nível de confiança, em *log score*, com o protocolo de I-PEM ($2,352 \pm 0,127$), comparado com ICM ($2,248 \pm 0,127$) e O-PEM ($2,321 \pm 0,061$), fornecendo um PMF mais informativo na identificação (59). A razão pela qual o ICM apresenta *score* mais baixo deve-se à maior suscetibilidade de contaminação com metabolitos, pigmentos das colónias e substâncias derivadas do meio de cultura sólido, gerando uma maior taxa de falsos positivos (44, 59). Por outro lado, os métodos de extração geram melhores resultados, que podem ser atribuídos à maior capacidade de extração de proteínas e redução do *background* no espectro (42, 44, 59, 63). Apesar dos resultados do *log score* em I-PEM apresentarem dados de maior confiança, as diferenças no valor de confiança da identificação entre protocolos não são muito divergentes, permitindo mesmo assim uma identificação com *log score* superior a 2 ou valor de confiança superior a 60% em qualquer um dos protocolos (43, 44, 59). Desta forma, pelo menos para a identificação de isolados tornou-se menos comum recorrer a protocolos de extração de proteínas, o que tornou métodos mais simples, como o ICM, capazes de atingir uma elevada precisão, devido à melhoria da eficiência do método (16, 41, 70). Com recurso à meta-análise de Chen et al, esta compara a *performance* entre ICM e PEM, e apoia estes achados. Refere que sensibilidade entre os dois protocolos é semelhante, enquanto a especificidade é superior em ICM e por outro lado é mais acessível por não requer mais reagentes, reduzindo o tempo de identificação (48). Neste sentido, a detecção dos biomarcadores que possibilitam discriminar a resistência à metilicina presentes no PMF reflete-se de acordo com o protocolo de pré-tratamento aplicado em cada um dos estudos. Tendo em consideração a possibilidade da variada natureza química dos biomarcadores, não se irá explorar todos os detalhes sobre a influência do protocolo.

Tendo em consideração a proporção e distribuição no espectro de massa dos biomarcadores de resistência e sensibilidade recolhidos dos estudos é possível verificar algumas diferenças. Na maioria dos estudos os investigadores focaram-se na identificação de biomarcadores de resistência, ao invés da discriminação através da identificação de biomarcadores de sensibilidade. Possivelmente por essa razão, foram encontrados mais biomarcadores de resistência e a sua distribuição foi mais ampla. Outra razão, é a possível maior expressão de proteínas nos isolados de MRSA, que pode estar relacionado com a sua resistência à metilicina, explicando o maior número de biomarcadores de resistência encontrados (71, 72).

Recorrendo a dois estudos que comparam o perfil proteómico de MRSA e MSSA, no âmbito da identificação e quantificação relativa de proteínas específicas e metabolitos, foram encontradas diferenças significativas na atividade metabólica (71, 72). No entanto, não houve

evidências que existissem diferenças na quantidade total de proteínas entre MRSA e MSSA (71, 72). Como no presente estudo o foco é na discriminação através de biomarcadores relacionados com os isolados resistência e sensíveis à meticilina, é possível que existam diferenças no perfil proteômico destes isolados. Por outro lado, alguns dos estudos incluídos referem a existência de intervalos mais relevantes para a discriminação da resistência à meticilina, revelando biomarcadores mais proeminentes (18, 21, 49, 51, 52). Apesar dos intervalos encontrados apresentarem variabilidade, é possível estabelecer um intervalo médio entre 2400 a 5300 Da (18, 21, 49, 51). Este intervalo parece razoável, tendo em consideração que nos estudos incluídos nesta revisão sistemática, a maioria dos biomarcadores de resistência e sensibilidade se concentram nesse intervalo, como é possível observar na Figura 6 e 7 (18, 21, 49, 51).

A existência de uma base de dados para o reconhecimento do PMF típico dos isolados é fundamental para a identificação dos isolados, que são fornecidas com os analisadores MALDI-TOF MS (13, 14, 16). No âmbito do enriquecimento dos dados necessários para a detecção de biomarcadores discriminadores da resistência à meticilina, alguns investigadores além da base de dados comercial, geraram uma base de dados própria utilizando uma porção ou a totalidade da amostra para a seleção dos biomarcadores ideais para a discriminação de MRSA e MSSA.

Neste estudo foram incluídas publicações de vários locais geográficos, mas com predomínio do continente asiático. A distribuição global dos clones de *S. aureus* é heterogênea e por consequência a expressão dos biomarcadores encontrados nestes estudos pode ser influenciada (2, 47). Esta limitação é referida em muitos dos estudos incluídos. Como tal, alguns investigadores recorrem à utilização de amostras de grandes dimensões ou à inclusão de isolados de diversos locais, como também a inclusão de estirpes de referência (18, 21, 49, 62, 64).

6.1. Identificação de PSM-mec e toxina delta

O sinal de PSM-mec apresentado nos estudos não apresenta uma variabilidade significativa, demonstrando coerência nos resultados para este biomarcador, podendo-se entrar em consenso que se situa a 2414 ± 2 Da (59, 62-65). Apesar de evidenciar a presença do gene *mecA*, este biomarcador apresenta expressão variável em estirpes de MRSA que possuam predominantemente *SCCmec* tipo II e III, mas também do tipo VIII (59, 62-65). Além disso, não é restrito a *S. aureus*, podendo também representar a resistência à meticilina em *S. epidermidis* (23, 32, 59, 62-65). De acordo com os resultados para a detecção de PSM-mec, o protocolo aplicado influencia bastante a capacidade de detecção deste biomarcador (59, 63, 65). O pico correspondente a PSM-mec pode ser visível no PMF de amostras preparadas com

ICM e O-PEM, mas com maior intensidade sem a aplicação de ácido fórmico a 70% (59). No entanto, a deteção de PSM-mec em amostras preparadas com I-PEM não pode ser obtida (59, 63, 65). Devido à sua natureza aniónica e presença na superfície da bactéria, este péptido só pode ser detetado quando mantida a integridade celular até ao final do protocolo de pré-tratamento, sendo que nos primeiros passos do protocolo de I-PEM a extração é realizada em solução alcoólica e provavelmente o péptido é extraído para o sobrenadante, não podendo ser detetado (42, 44, 59, 63, 65).

A regulação da expressão de PSM-mec está estritamente relacionada com o gene *agr* (23, 32, 59, 63, 64). Em simultâneo, a funcionalidade do gene *agr* pode ser detetada pela expressão da toxina delta que é detetável no PMF (59, 63, 64). Em relação a m/z para a toxina delta, os resultados encontrados divergem. Na maioria dos estudos é consensual que a toxina delta é detetável a 3006 ± 2 Da (59, 63). No entanto, Josten et al, 2014 mostra que em isolados do CC1, este biomarcador é também detetável a 3037 Da, enquanto nos restantes isolados apresenta-se na m/z habitual (63). Recorrendo a um estudo que avaliou a deteção de toxina delta por MALDI-TOF MS utilizando ICM, referem que numa amostra de 168 isolados foram encontrados 139 que apresentam o pico a 3005 ± 5 Da e 12 com o *peak shift* a 3035 ± 5 Da (22). Foi colocada a hipótese de se tratar de uma variante alélica da toxina delta, que foi confirmada através de sequenciação, o que demonstrou que nesses casos havia substituição de uma glicina na posição 10 por uma serina, gerando uma variante da toxina delta com essa m/z (22). Adicionalmente, foi realizada a genotipagem de alguns desses isolados e verificou-se que esses pertenciam ao CC1, CC45, CC59 e CC121 (22). Pode-se afirmar que, na grande maioria, a toxina delta apresenta-se a 3006 Da e em minoria em 3037 Da. Além disso, como o PSM-mec é regulado pelo gene *agr*, nos estudos foi verificado que na maioria dos isolados de MRSA com a presença de toxina delta também apresentavam PSM-mec detetável (59, 63).

Relativamente ao protocolo de pré-tratamento, na deteção da toxina delta realizada por Alksne et al, 2020 e Josten et al, 2014 verificou-se resultados comparáveis (59, 63). Em qualquer um dos métodos foi possível evidenciar a presença deste biomarcador (59, 63). Mas com intensidade de sinal maior em métodos com deposição direta da colónia na lâmina-alvo, sendo mais evidente quanto menor for a extração proteica (59, 63).

O estudo multicentro de Paskova et al, 2020, reporta que os biomarcadores PSM-mec e toxina delta não podem ser aplicados isoladamente na prática clínica (64). O PSM-mec de facto apresenta uma especificidade de 100%, no entanto a sua baixa sensibilidade e reprodutibilidade variável, impede a confiança deste biomarcador para a deteção de MRSA (64). A baixa sensibilidade de PSM-mec representada pela presença de falsos-negativos pode ser explicada pela variabilidade na expressão do gene *psm-mec*, ocasionalmente gerando

pequenas quantidades do péptido e pela supressão por outros picos com maior intensidade no intervalo 3000-10000 Da (59, 62-65). Como tal, alguns destes estudos referem que deve ser definido um limiar mínimo para a deteção de PSM-mec, não só de forma a aumentar a sensibilidade deste biomarcador, mas também para restringir a deteção equívoca de PSM-mec (59, 62-65). A toxina delta apresenta melhores resultados em relação à intensidade do sinal, em particular em isolados com *SCCmec* II e III, contudo a sua presença não indica por si só a resistência a meticilina, não sendo desta forma específica para MRSA (59, 63, 64).

Os restantes estudos reportam os mesmos achados em relação à baixa reprodutibilidade, falta de sensibilidade do PSM-mec e a toxina delta como um biomarcador que verifica a funcionalidade do gene *agr* e que frequentemente possui a maior intensidade do espectro (59, 62, 63, 65). É importante mencionar que Josten et al, 2014 só obteve uma sensibilidade de 94,7%, que é superior comparado com outros estudos, por ter excluído os isolados de MRSA *agr* negativos com PSM-mec detetável, sendo apenas contabilizado para a sensibilidade os isolados PSM-mec *agr* positivos (63). Adicionalmente, recorrendo a Chen et al, 2022 como verificação de referência para os estudos que detetaram o biomarcador PSM-mec, pode-se verificar que se obteve resultados semelhantes (48).

Como meio de otimizar a deteção de MRSA, o PSM-mec e toxina delta poderão ser apoiados por outros biomarcadores que reforcem o seu poder de discriminação da resistência à meticilina, permitindo detetar uma maior parte dos isolados de MRSA.

6.2. Biomarcadores “adicionais” e contributo das ferramentas de IA

Dada à expressão variável de proteínas pelas diversas linhagens de *S. aureus*, a discriminação entre MRSA e MSSA não se restringe apenas à presença ou ausência de apenas alguns biomarcadores, tornado essa discriminação difícil. Como meio de otimizar a discriminação da resistência à meticilina surge a necessidade de incluir biomarcadores que abrangam um maior número de clones.

Edwards-Jones et al, 2000 e Du et al, 2002, surgem como estudos pioneiros na discriminação de isolados de MRSA e MSSA por MALDI-TOF MS. Nestes estudos, para além de apresentarem alguns biomarcadores úteis para discriminação entre MRSA e MSSA, é descrito que a reprodutibilidade destes biomarcadores é aceitável. Embora os resultados obtidos na reprodutibilidade sejam um fator positivo, o número de isolados incluídos nestes estudos foi reduzido e restrito geograficamente, pelo que não se pode extrapolar para discriminação na prática laboratorial (19, 20).

Nestes dois estudos, os autores utilizaram equipamentos mais antiquados e descrevem que optaram pela utilização de ICM com uma matriz de CMBT (19, 20). No entanto, a composição

desta matriz possui ácido fórmico, o que revela algum nível de extração proteica *on-target* (19, 20, 42, 44). Na maioria dos estudos, os autores utilizam uma matriz de CHCA e equipamentos de apenas dos sistemas de diagnóstico da Bruker Daltonics e bioMérieux. A utilização de uma matriz e de equipamentos distintos dos restantes estudos incluídos pode conduzir à deteção de biomarcadores distintos que poderão não ser encontrados de outra forma. Estes fatores podem apresentar-se como obstáculo para o enquadramento destes biomarcadores com os dos restantes estudos. No entanto, através da análise cuidada foi possível observar alguns resultados concordantes com os demais estudos. Além dos biomarcadores “adicionais”, podem ser encontrados os típicos biomarcadores PSM-mec e toxina delta. De acordo com outros estudos, em Edwards-Jones et al, observa-se a presença de PSM-mec aqui detetada com ligeiro desvio a 2416,6 Da e muitas das vezes suprimida por outros picos com maior intensidade, ocultando a sua presença (20, 64). Inesperadamente, neste estudo a presença de PSM-mec não é acompanhada com a deteção da toxina delta, pelo que não se pode ter a certeza se de facto esta m/z corresponde a PSM-mec ou se foi possível detetar a toxina delta na mesma m/z (20). Por outro lado, em Du et al, a presença de PSM-mec a 2413,01 Da e a toxina delta a 3004,86 Da é observada em apenas isolados de MRSA (19).

Ao abordar os biomarcadores “adicionais” nestes dois estudos, os resultados são pouco comparáveis, apesar de ser descrito em Du et al que o método utilizado foi semelhante ao utilizado em Edwards-Jones et al (19). Por exemplo, em Edwards-Jones et al, é observado que em espectros típicos de MRSA foi detetada a presença dos picos a 2454 e 3045 Da que estão ausentes no espectro típico de MSSA (20). No entanto, estes achados não foram totalmente corroborados em Du et al, sendo que apenas o pico a 2454 Da estava presente em MRSA, mas 3045 Da foi detetado em ambos os espectros típicos de MRSA e MSSA (19). Esta discrepância pode ser justificada pela utilização de isolados de zonas geográficas distintas, apresentando assim uma expressão proteica discordante ou as diferenças nas condições de cultura (19). Ambos os estudos não aplicaram ferramentas de IA (19, 20). No entanto, é descrito em Du et al, que a combinação de um “método algoritmo” com MALDI-TOF MS pode ser uma estratégia promissora na identificação bacteriana (19).

A ideia de combinar modelos de processamento de dados complexos é descrito em vários estudos, nomeadamente com o recurso a modelos de IA (18, 21, 49-52, 61, 65). Nestes estudos os modelos de IA foram utilizados para o processamento de padrões divergentes através de análise comparativa do PMF gerado em isolados de MRSA e MSSA, permitindo determinar biomarcadores específicos relacionados com a resistência e sensibilidade à meticilina dos isolados (18, 21, 49-52, 61).

Nos estudos em seguida foram identificados biomarcadores que apresentam variabilidade de expressão em isolados de MRSA e MSSA. Alguns destes biomarcadores estão presentes em

ambos os tipos de *S. aureus*, no entanto com a detecção da sua m/z com diferentes intensidades. Nestes casos, para a correta identificação de um isolado de MRSA ou MSSA é importante a determinação do valor limite de intensidade de sinal para a positividade de um biomarcador. Nos presentes estudos não foram definidos valores de *cut-off* para estes casos. Em Sogawa et al, surge um caso ideal para esta necessidade. O biomarcador com a m/z 1935,9 Da apresentou as intensidades médias, 880,8 e 662,2 Da para MRSA e MSSA, respetivamente (50). Estas intensidades são muito semelhantes e podem originar a discriminação dúbia dos isolados. No caso do estudo de Wang et al, os dois biomarcadores identificados podem estar presentes em isolados de MRSA e MSSA, mas apenas foi definido que estes apresentam maior intensidade em MRSA (51). Noutros casos, como em Abalkhail et al, Elbehiry et al e Yu et al, 2022 apenas foi referido que os biomarcadores identificados estão presentes ou ausentes em MRSA e MSSA (18, 21, 52). Em qualquer dos casos, parece ser necessário a determinação de limites mínimos para definir a positividade destes biomarcadores.

Um dos estudos que se destaca é o estudo de Kim et al, onde foi apresentado um modelo *tree decision* que incluiu doze biomarcadores específicos para os *SCCmec* II, III e IV, *PSM-mec*, e biomarcadores específicos para MSSA (49). A escolha destes biomarcadores foi definida com base nos valores preditivos positivos e negativos, sensibilidades e especificidades mais elevados (49). Além disso, os biomarcadores foram selecionados de forma a não coexistirem valores de m/z muito semelhantes, com o objetivo de não serem classificados equivocadamente (49). Adicionalmente, foram selecionados os *peak shifts* dos biomarcadores mais adequados, que estão associados a determinados clones de *S. aureus* (49). Este estudo não negligenciou a utilização do *PSM-mec*, uma vez que este biomarcador representa isolados de MRSA que contém *SCCmec* tipo II, III e VIII (23, 32, 59, 62-65). Por outro lado, a seleção de biomarcadores do *SCCmec* IV foi justificada dada à crescente infeção por isolados de CA-MRSA que são fenotipicamente distintos de HA-MRSA (2, 28, 47, 49). No entanto, como discutido anteriormente este estudo carece também da definição de valores de *cut-off* (49). Contudo, neste caso o efeito de casos dúbios poderá ter menor impacto na presença dos 12 biomarcadores, assegurando uma maior robustez (49). Os investigadores deste estudo testaram o modelo gerado com estirpes de referência, no entanto alguns destes isolados não expressaram os biomarcadores necessários para a sua discriminação (49). Este resultado pode ser justificado pela colheita destas estirpes ter ocorrido há muito tempo e a sua expressão proteica poder não corresponder aos isolados clínicos atuais (41, 49, 70). Esta justificação pode ser corroborada tendo em conta que validação do modelo com o grupo teste apresentou uma identificação de 87,6% dos isolados (49). Os resultados obtidos por este

modelo aparentam ser de fácil aplicação na prática clínica desde que estejam disponíveis as ferramentas necessárias.

Os investigadores reportaram nestes estudos que a capacidade de discriminação de MRSA e MSSA em geral foi superior a 90% (Tabela 8) (18, 21, 49-52). O desempenho superior demonstrado nestes estudos, em comparação com os que apenas utilizaram o PSM-mec e toxina delta para discriminação, pode ser atribuída à utilização de biomarcadores que são mais abrangentes. O PSM-mec é apenas produzido em isolados com *SCCmec* tipo II, III e VIII, e é diretamente controlado pelo gene *agr*, podendo também ser detetada a toxina delta (59, 62-65). A deteção de PBP2a excede a capacidade de deteção de MALDI-TOF MS devido ao seu tamanho molecular (48). No entanto, a deteção de fragmentos da PBP2a também pode ser útil para avaliar a presença de isolados com gene *mecA* (50). No estudo de Sogawa et al, um dos biomarcadores identificados corresponde a um fragmento de PBP2a, que apresentou uma elevada intensidade em isolados de MRSA (50). No entanto, o gene *mecA* não é o único responsável pela resistência à meticilina em MRSA (2). O gene *mecC* é um homólogo de *mecA* que confere resistência à meticilina, produzindo uma proteína semelhante à PBP2a e que apresenta características semelhantes (2-4). Na maioria destes biomarcadores, a correspondência com a proteína expressa não foi apresentada. Contudo, tendo em conta os resultados obtidos com estes modelos, pode-se aferir que foram selecionados biomarcadores relacionados com a resistência e sensibilidade à meticilina em *S. aureus*.

6.3. Protocolos alternativos para a deteção de MRSA

Neste estudo surgem dois artigos com metodologias alternativas na discriminação da resistência à meticilina, que poderão otimizar a deteção de MRSA diretamente em amostras com pouco inóculo e noutro caso com a utilização de uma matriz experimental.

A deteção diretamente de amostras biológicas nas quais a presença de microrganismos ocorre em baixa concentração pressupõe um desafio utilizando MALDI-TOF MS. Como tal, Fan et al, 2024 propõe um método de deteção de MRSA diretamente de amostras de sangue total e líquido cefalorraquidiano (LCR), através da realização de um protocolo de pré-concentração e separação utilizando partículas magnéticas conjugadas com ampicilina (AMP-MB) e posterior discriminação por MALDI-TOF MS através de biomarcadores de resistência e sensibilidade (60). Uma vez que para este método é necessária a centrifugação para reduzir a interferência da matriz da amostra, o protocolo de separação magnética além de reduzir a influência da matriz da amostra biológica, mantém também a integridade bacteriana (14, 16, 60).

A determinação do limiar inferior de deteção de MRSA em sangue total e LCR por centrifugação e com recurso as partículas magnéticas foi determinada como 5×10^6 unidades

formadoras de colónias por mililitro (CFU/mL) para ambas as amostras (60). A detecção de MRSA inoculado em solução tampão de fosfato salino (PBS) foi utilizada como comparador na qual se obteve um limiar de $2,5 \times 10^6$ CFU/mL (60). Além disso, a eficiência de captura das AMP-MB com MRSA em amostras de sangue total e LCR foi superior a 80% e comparada com a captura em PBS de superior a 95%, até concentrações de 10^6 CFU/mL (60). Este resultado é encorajador, tendo em conta que em outros estudos é referido que a sensibilidade necessária para a detecção por MALDI-TOF MS é de aproximadamente 10^4 a 10^6 CFU/mL (16). É importante mencionar que a ampicilina é um antimicrobiano de largo espectro, não sendo específico para os PBP's de *S. aureus* (73). A alegada especificidade da ampicilina aos PBP's de MRSA é testada através da co-inoculação das amostras biológicas e PBS com *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella pneumoniae*, referindo que a detecção é garantida desde que a proporção de MRSA seja superior a 50% (60).

Neste estudo foram determinados os biomarcadores de resistência e sensibilidade à metilina em *S. aureus* com auxílio do *software* VITEK MS Mass Spectrometer Research Library (60). Através deste protocolo foi possível identificar diretamente em amostras com baixa concentração de MRSA num período de 1,5 horas, sem a necessidade da sementeira de amostras (60). No entanto, este procedimento é limitado para a detecção de um microrganismo quando existe a possibilidade da infeção por mais do que um agente etiológico (16, 60).

Outro método de otimizar a detecção de MRSA será através da utilização de uma matriz com maior desempenho na extração dos péptidos que são essenciais para detecção de número mais amplo de biomarcadores. No estudo de Gao et al, 2022 utilizou I-PEM e matriz de CHCA esterificada que possui maior desempenho na extração de proteínas hidrofóbicas comparada com a matriz convencional que contém CHCA (61). Neste estudo foi demonstrado que a utilização desta matriz permite a detecção de biomarcadores discriminadores de MRSA e MSSA, que não têm sido detetados utilizando a matriz de CHCA (61). Esta é mais uma razão da importância da escolha da matriz para identificação de microrganismos e a potencial aplicação para a discriminação de MRSA por MALDI-TOF.

A análise da segregação dos biomarcadores entre MRSA e MSSA foi efetuada através da ferramenta de IA, PCA que processou os espectros de massa utilizando as intensidades normalizadas destes biomarcadores (61). Nesta foi possível averiguar o agrupamento dos isolados de MRSA e MSSA relativamente a estes biomarcadores, apresentando poucas discrepâncias (61). As poucas discrepâncias encontradas podem estar associadas à variabilidade da expressão da resistência à metilina (2, 47, 61).

Tendo em consideração que este estudo se distingue da grande maioria dos estudos incluídos, pela escolha de uma matriz com características distintas, a utilização destes

biomarcadores em conjunto com os restantes pode ser desadequada, dado que é claramente descrito pelos autores que estes biomarcadores não foram detetados com a matriz CHCA (61). No entanto, de acordo com Calderaro e Chezzi (2024), a introdução de uma solução de matriz para a extração otimizada de proteínas hidrofóbicas, bem como a melhoria da identificação microbiológica ao nível da estirpe/serotipo, poderia proporcionar avanços na aplicação da MALDI-TOF MS na deteção generalizada de resistência a antimicrobianos e na identificação diretamente a partir de amostras biológicas (41).

6.4. Aplicação prática dos biomarcadores de resistência e sensibilidade por MALDI-TOF MS

A aplicação desta metodologia pode ser desafiante devido à variabilidade fenotípica dos isolados de *S. aureus*, que por sua vez não expressam consistentemente os mesmos biomarcadores de resistência e sensibilidade à meticilina (2, 47).

Como referido anteriormente, a construção de uma base de dados é fundamental para a identificação de padrões de discriminação dos isolados (13, 14, 16, 41). A construção de uma base de dados interna pode ser vista como uma mais-valia para melhoria do reconhecimento de padrões característicos no PMF de *S. aureus* de determinadas zonas geográficas e para a identificação dos biomarcadores através de análise por modelos de IA (41, 48). Idealmente, para a aplicação da discriminação de MRSA e MSSA por MALDI-TOF MS com menores restrições deverá ser incluída uma ampla amostra geograficamente diversa (18, 21, 49, 62, 64). Com base nos resultados obtidos por Kim et al, 2019, a seleção dos biomarcadores utilizando modelos de IA deverá ser orientada segundo testes de desempenho individuais, como o valor preditivo positivo e negativo, sensibilidade e especificidade mais elevados, de forma a conferir robustez na identificação e discriminação de MRSA e MSSA (49). Além disso, de acordo com os resultados de alguns estudos, relembra-se que pode ser necessário determinar valores de *cut-off* para definir a positividade de biomarcadores que coexistem em ambos os isolados de MRSA e MSSA, mas com intensidades distintas (18, 21, 50-52).

No contexto deste estudo, deve ser dada maior relevância aos biomarcadores adquiridos com a utilização da solução de matriz de CHCA. Isto com o intuito de manter a coerência dos resultados e tendo em consideração que atualmente esta é a solução de matriz convencional (41, 43). De qualquer forma, deverá ser explorada a identificação de biomarcadores com reagentes que otimizem a deteção de biomarcadores, nomeadamente com a solução de matriz CHCA esterificada, permitindo detetar proteínas/péptidos hidrofóbicos que estão associados a membrana celular de *S. aureus* (41, 61).

No âmbito da validação da base de dados interna é importante que seja processada com uma amostra-teste que inclua isolados que não foram envolvidos na sua construção (48). Este procedimento foi corretamente executado, nomeadamente nos estudos de Fan et al, 2024, Kim et al, 2019, Sogawa et al, 2017 e Yu et al 2022 (49, 50, 52). Em particular, Yu et al utilizaram uma amostra de grandes dimensões para gerar uma base de dados interna e sua validação foi efetuada com recurso a amostras independentes de quatro locais diferentes, também com grande dimensão (52). Contrariamente, em alguns dos estudos incluídos, nomeadamente em Edward-Jones et al, procederam à avaliação da reprodutibilidade da discriminação utilizando a mesma amostra (20). Este procedimento efetivamente conferiu a deteção dos padrões discriminadores da resistência à meticilina, mas este processo pode não ser transponível numa prática mais abrangente (20).

Por outro lado, muitos dos estudos incluídos introduzem na sua própria amostra e/ou procedem à comparação intra-laboratorial dos padrões do PMF com isolados de referência, como por exemplo com estirpes da ATCC, Leibniz Institute (DSMZ) e National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria (NCIMB) (18, 20, 21, 49, 59, 61, 63). A utilização de estirpes de referência pode contribuir para uma maior robustez da identificação dos biomarcadores de discriminação da resistência à meticilina, dado que os isolados clínicos são afetados por fatores que podem afetar características fenotípicas, ao contrário das estirpes de referência que são relativamente mais estáveis e bem conhecidas (48). Os achados referentes à utilização de bases de dados comerciais combinadas com as geradas pelos investigadores e a utilização de estirpes de referência também são discutidos na meta-análise de Chen et al e é referido que a sua utilização contribui positivamente para uma maior confiança nos resultados da discriminação de resistência à meticilina em *S. aureus* (48).

7. Conclusão

A tecnologia MALDI-TOF MS é uma ferramenta com ótimo desempenho para identificação de isolados microbiológicos e com a capacidade de discriminar isolados de *S. aureus* resistentes e sensíveis à metilina. A análise dos estudos selecionados para esta revisão sistemática revelou que isoladamente PSM-mec e toxina delta não são suficientemente discriminativos para a detecção de resistência à metilina em *S. aureus* por MALDI-TOF MS. A combinação de biomarcadores adicionais e abordagens com ferramentas de IA, aumentam substancialmente o desempenho no diagnóstico laboratorial. Adicionalmente, o desenvolvimento de protocolos para amostras com inóculo reduzido e a otimização da matriz podem contribuir para a melhoria da detecção de MRSA.

Uma vez que muitos laboratórios clínicos possuem equipamentos MALDI-TOF MS para a identificação de isolados bacteriológicos, surge a oportunidade de aproveitar os dados disponíveis das identificações de *S. aureus* para a distinção da resistência à metilina sem necessidade de recursos materiais e financeiros adicionais. Esta abordagem pode ser uma ferramenta que contribuirá para a rápida detecção e discriminação da resistência à metilina em *S. aureus* e para diminuir os encargos económicos nos serviços de saúde e melhorar a qualidade do atendimento aos utentes.

8. Limitações do estudo e perspectivas futuras

No presente estudo surgem como limitações a inclusão de alguns artigos que apresentaram amostras de baixa dimensão e apenas utilizaram isolados locais. Estes aspetos não foram apreciados na avaliação crítica da qualidade por falta de critérios das questões do formulário para estudos transversais das ferramentas do *Joanna Briggs Institute*. Por outro lado, nesta revisão sistemática houve a inclusão predominante de estudos do continente asiático, que se deve ao maior número de estudos desta temática e não pela sua seleção em específico no presente estudo. Desta forma os biomarcadores encontrados refletem-se em linhagens clonais desta região. Outro aspeto a ter em consideração que surge como obstáculo na aplicação destes biomarcadores é a influência de fatores pré-analíticos, como o impacto dos vários protocolos de pré-tratamento da amostra e a presença de contaminantes presentes nos meios de cultura derivado da sementeira das amostras biológicas. Como tal, sugere-se uniformização dos procedimentos para a futura aplicação desta metodologia. Neste estudo foram também incluídos estudos com protocolos distintos, nomeadamente em relação à utilização de soluções de matriz distintas, mas com baixa representação. A restrição de determinados materiais experimentais não foi contemplada nos critérios de elegibilidade. No entanto, isso não surge como limitação, dado que o presente estudo foi focado na identificação dos biomarcadores característicos da resistência e sensibilidade à meticilina.

Como estudos futuros sugere-se o desenvolvimento de estudos com recolha ampla de isolados de zonas geográficas, com objetivo de proporcionar resultados mais coerentes na deteção dos biomarcadores e gerar bases de dados internas atualizadas que se enquadrem às estirpes locais. A aplicação de modelos IA na identificação dos biomarcadores discriminadores pode requerer o envolvimento de uma equipa multidisciplinar de profissionais qualificados, com o intuito de gerar bases de dados robustas. Estes irão intervir no âmbito da seleção das ferramentas mais adequadas para esse fim. Adicionalmente, a determinação de valores de *cut-off* para biomarcadores que coexistem em ambos os isolados, mas com diferente intensidade é necessária para a redução de identificações dúbias. Surge também a necessidade de estudos referentes à otimização dos protocolos, nomeadamente com reagentes que possibilitem a deteção alargada de biomarcadores e protocolos otimizados para amostras com baixa concentração de microrganismos.

O estudo de biomarcadores que permitam discriminar MRSA permitirá acelerar o diagnóstico destas infeções bacterianas em meio nosocomial e na comunidade com diminuição dos intervalos de suscetibilidade e a capacidade de iniciar antecipadamente a terapêutica antimicrobiana específica.

9. Referências bibliográficas

1. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization; 2024.
2. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4).<https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18>
3. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18033.<https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
4. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):430-49.<https://doi.org/10.1093/femsre/fux007>
5. Costa B. Relação entre a colonização por MRSA e IACS: Escola Superior de Saúde Fernando Pessoa; 2023.
6. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence.* 2021;12(1):547-69.<https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
7. Commission E. EU Guidelines for the prudent use of antimicrobials in human health. Brussels: European Union; 2017.
8. Mergenhagen KA, Starr KE, Wattengel BA, Lesse AJ, Sumon Z, Sellick JA. Determining the Utility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Nares Screening in Antimicrobial Stewardship - PubMed. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America.* 2020;71(5).<https://doi.org/10.1093/cid/ciz974>
9. WHO. Antimicrobial stewardship programmes in health-care facilities in low- and middle-income countries - A WHO practical toolkit2019.
10. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(6):1000-18.<https://doi.org/10.1093/jac/dki372>

11. Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque ACA. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. *Biotechnol J*. 2019;14(1):e1700750.<https://doi.org/10.1002/biot.201700750>
12. Yarbrough ML, Warren DK, Allen K, D. B, Daum R, Donskey C, et al. Multicenter Evaluation of the Xpert MRSA NxG Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Nasal Swabs. *Clin Microbiol*. 2018.<https://doi.org/doi.org/10.1128/JCM.01381-17>
13. Elbehiry A, Aldubaib M, Abalkhail A, Marzouk E, A AL, Moussa I, et al. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(11).<https://doi.org/10.3390/vaccines10111881>
14. Hou TY, Chiang-Ni C, Teng SH. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *J Food Drug Anal*. 2019;27(2):404-14.<https://doi.org/10.1016/j.jfda.2019.01.001>
15. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015;6:791.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>
16. Tsuchida S, Umemura H, Nakayama T. Current Status of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in Clinical Diagnostic Microbiology. *Molecules*. 2020;25(20).<https://doi.org/10.3390/molecules25204775>
17. Florio W, Baldeschi L, Rizzato C, Tavanti A, Ghelardi E, Lupetti A. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:572909.<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.572909>
18. Abalkhail A, Elbehiry A. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Diabetic Foot Infections: Protein Profiling, Virulence Determinants, and Antimicrobial Resistance. *Applied Sciences*. 2022;12(21).<https://doi.org/10.3390/app122110803>
19. Du Z, Yang R, Guo Z, Song Y, Wang J. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem*. 2002;74(21):5487-91.<https://doi.org/10.1021/ac020109k>
20. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, Walker J, Fox AJ, Gordon DB. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2000;49(3):295-300.<https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-3-295>

21. Elbehiry A, Marzouk E, Moussa I, Anagreyah S, AlGhamdi A, Alqarni A, et al. Using Protein Fingerprinting for Identifying and Discriminating Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Inpatient and Outpatient Clinics. *Diagnostics (Basel).* 2023;13(17).<https://doi.org/10.3390/diagnostics13172825>

22. Gagnaire J, Dauwalder O, Boisset S, Khau D, Freydiere AM, Ader F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* delta-toxin production by whole-cell MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7(7):e40660.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040660>

23. Qin L, McCausland JW, Cheung GY, Otto M. PSM-Mec-A Virulence Determinant that Connects Transcriptional Regulation, Virulence, and Antibiotic Resistance in *Staphylococci*. *Front Microbiol.* 2016;7:1293.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01293>

24. Ondusko DS, Nolt D. *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics in Review.* 2018;39(6):287-98.<https://doi.org/10.1542/pir.2017-0224>

25. Derakhshan S, Navidinia M, Haghi F. Antibiotic susceptibility of human-associated *Staphylococcus aureus* and its relation to agr typing, virulence genes, and biofilm formation. *BMC Infect Dis.* 2021;21(1):627.<https://doi.org/10.1186/s12879-021-06307-0>

26. Bennett MR, Thomsen IP. Epidemiological and Clinical Evidence for the Role of Toxins in *S. aureus* Human Disease. *Toxins (Basel).* 2020;12(6).<https://doi.org/10.3390/toxins12060408>

27. Hodille E, Rose W, Diep BA, Goutelle S, Lina G, Dumitrescu O. The Role of Antibiotics in Modulating Virulence in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30.<https://doi.org/10.1128/CMR.00120-16>

28. Monecke S, Coombs G, Shore AC, Coleman DC, Akpaka P, Borg M, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011;6(4):e17936.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017936>

29. Tam K, Torres VJ. *Staphylococcus aureus* Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr.* 2019;7(2).<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0039-2018>

30. Harkins CP, Pichon B, Doumith M, Parkhill J, Westh H, Tomasz A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the introduction of methicillin into clinical practice. *Genome Biol.* 2017;18(1):130.<https://doi.org/10.1186/s13059-017-1252-9>
31. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. *Nat Rev Microbiol.* 2019;17(4):203-18.<https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4>
32. Chatterjee SS, Chen L, Joo HS, Cheung GY, Kreiswirth BN, Otto M. Distribution and regulation of the mobile genetic element-encoded phenol-soluble modulin PSM-mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2011;6(12):e28781.<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028781>
33. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Front Microbiol.* 2015;6:1174.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174>
34. ECDC, WHO. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 - 2021 data. 2023.<https://doi.org/10.2900/63495>
35. Ji Y, ed. *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols* 2007.
36. Vrioni G, Tsiamis C, Oikonomidis G, Theodoridou K, Kapsimali V, Tsakris A. MALDI-TOF mass spectrometry technology for detecting biomarkers of antimicrobial resistance: current achievements and future perspectives. *Ann Transl Med.* 2018;6(12):240.<https://doi.org/10.21037/atm.2018.06.28>
37. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI supplement M100. 30th ed. ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
38. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *EUCAST: Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2017
39. Ligozzi M, Bernini C, Bonora MG, De Fatima M, Zuliani J, Fontana R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol.* 2002;40(5):1681-6.<https://doi.org/10.1128/JCM.40.5.1681-1686.2002>

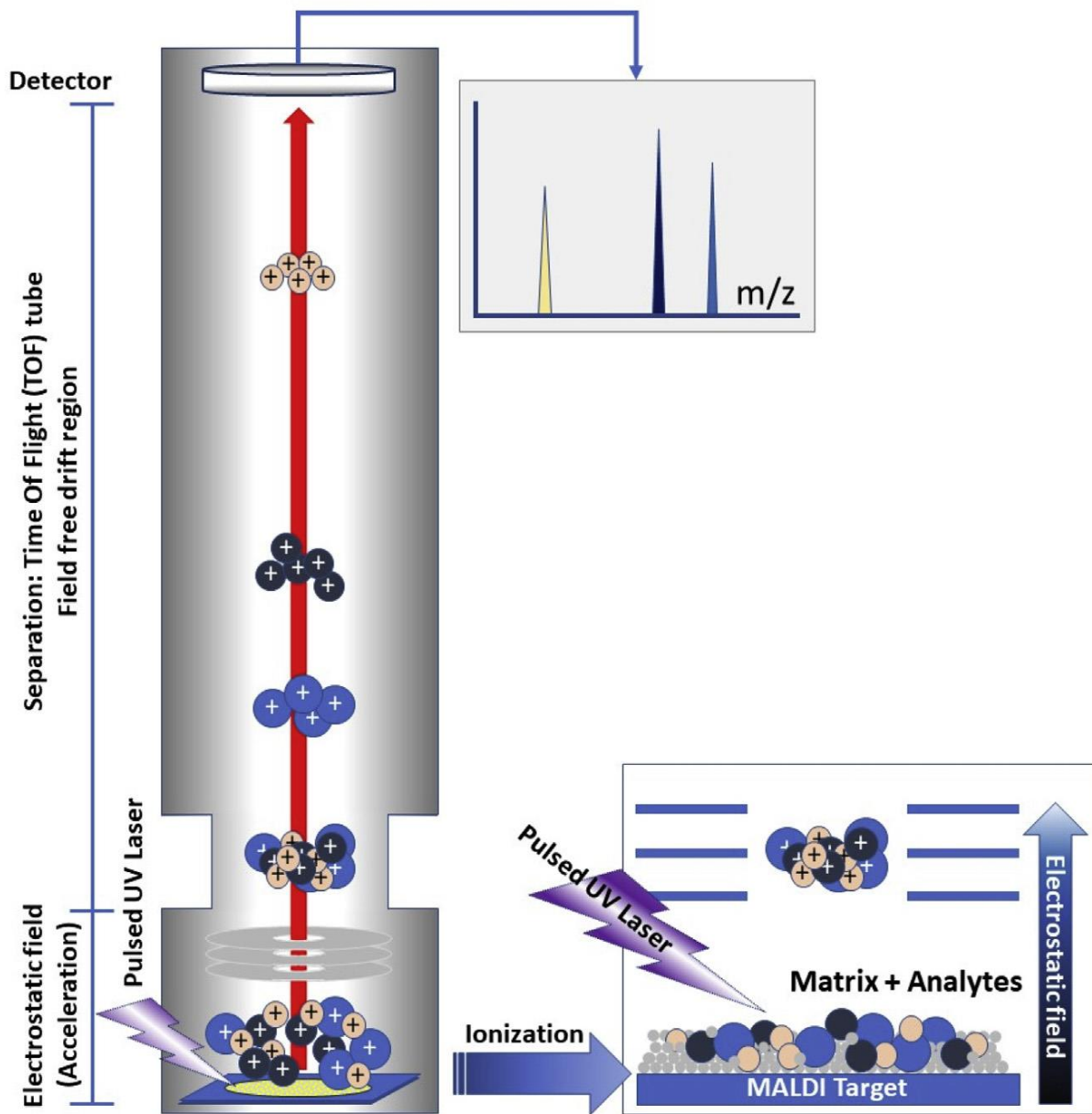
40. Veloo AC, de Vries ED, Jean-Pierre H, Justesen US, Morris T, Urban E, et al. The optimization and validation of the Biotyper MALDI-TOF MS database for the identification of Gram-positive anaerobic cocci. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(9):793-8.<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.016>
41. Calderaro A, Chezzi C. MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms.* 2024;12(2).<https://doi.org/10.3390/microorganisms12020322>
42. Wang J, Wang H, Cai K, Yu P, Liu Y, Zhao G, et al. Evaluation of three sample preparation methods for the identification of clinical strains by using two MALDI-TOF MS systems. *J Mass Spectrom.* 2021;56(2):e4696.<https://doi.org/10.1002/jms.4696>
43. Thelen P, Graeber S, Schmidt E, Hamprecht A. A side-by-side comparison of the new VITEK MS PRIME and the MALDI Biotyper sirius in the clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2023;42(11):1355-63.<https://doi.org/10.1007/s10096-023-04666-x>
44. Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2868-73.<https://doi.org/10.1128/JCM.00506-11>
45. Pliakos EE, Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(3).<https://doi.org/10.1128/CMR.00095-17>
46. Yo CH, Shen YH, Hsu WT, Mekary RA, Chen ZR, Lee WJ, et al. MALDI-TOF mass spectrometry rapid pathogen identification and outcomes of patients with bloodstream infection: A systematic review and meta-analysis. *Microb Biotechnol.* 2022;15(10):2667-82.<https://doi.org/10.1111/1751-7915.14124>
47. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):222-35.<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01573.x>
48. Chen C, Zhou Z, Cong L, Shan M, Zhu Z, Li Y. Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS: A meta-analysis. *Biotechnol Appl Biochem.* 2023;70(3):1217-29.<https://doi.org/10.1002/bab.2433>

49. Kim JM, Kim I, Chung SH, Chung Y, Han M, Kim JS. Rapid Discrimination of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by MALDI-TOF MS. *Pathogens*. 2019;8(4).<https://doi.org/10.3390/pathogens8040214>
50. Sogawa K, Watanabe M, Ishige T, Segawa S, Miyabe A, Murata S, et al. Rapid Discrimination between Methicillin-Sensitive and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Biocontrol Sci*. 2017;22(3):163-9.<https://doi.org/10.4265/bio.22.163>
51. Wang YR, Chen Q, Cui SH, Li FQ. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical specimens by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biomed Environ Sci*. 2013;26(6):430-6.<https://doi.org/10.3967/0895-3988.2013.06.003>
52. Yu J, Tien N, Liu YC, Cho DY, Chen JW, Tsai YT, et al. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using MALDI-TOF MS and Machine Learning from over 20,000 Clinical Isolates. *Microbiol Spectr*. 2022;10(2):e0048322.<https://doi.org/10.1128/spectrum.00483-22>
53. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71.<https://doi.org/10.1136/bmj.n71>
54. Barker TH, Stone JC, Sears K, Klugar M, Leonardi-Bee J, Tufanaru C, et al. Revising the JBI quantitative critical appraisal tools to improve their applicability: an overview of methods and the development process. *JBI Evid Synth*. 2023;21(3):478-93.<https://doi.org/10.11124/JBIES-22-00125>
55. McGuinness LA, Higgins JPT. Risk-of-bias VISualization (robvis): An R package and Shiny web app for visualizing risk-of-bias assessments. *Res Synth Methods*. 2021;12(1):55-61.<https://doi.org/10.1002/jrsm.1411>
56. MedCalc Software Ltd. Ostend B. MedCalc Statistical Software version: 23.0.8 [Available from: <https://www.medcalc.org>].
57. Centre for Reviews and Dissemination. PROSPERO: International prospective register of systematic reviews 2025 [Available from: <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/help/aboutprospero>].

58. Joanna Briggs Institute (JBI). Checklist for Analytical Cross Sectional Studies 2020 [Available from: <https://jbi.global/critical-appraisal-tools>].
59. Alksne L, Makarova S, Avsejenko J, Cibrovskā A, Trofimova J, Valcina O. Determination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by MALDI-TOF MS in clinical isolates from Latvia. *Clin Mass Spectrom*. 2020;16:33-9. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.03.001>
60. Fan L-P, Tang X, Bai X, Cheng H, Zeng C, Huang S, et al. Rapid identification of MRSA directly from sterile body fluids by co-magnetic bead enrichment and MALDI-TOF mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 2024;197. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.109739>
61. Gao W, Li B, Ling L, Zhang L, Yu S. MALDI-TOF MS method for differentiation of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using (E)-Propyl alpha-cyano-4-Hydroxyl cinnamylate. *Talanta*. 2022;244:123405. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123405>
62. Hu Y, Huang Y, Lizou Y, Li J, Zhang R. Evaluation of *Staphylococcus aureus* Subtyping Module for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Detection Based on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Front Microbiol*. 2019;10:2504. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02504>
63. Josten M, Dischinger J, Szekat C, Reif M, Al-Sabti N, Sahl HG, et al. Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol*. 2014;304(8):1018-23. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>
64. Paskova V, Chudejova K, Sramkova A, Kraftova L, Jakubu V, Petinaki EA, et al. Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-TOF MS-based identification of MRSA. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020;65(5):895-900. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00799-0>
65. Rhoads DD, Wang H, Karichu J, Richter SS. The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016;86(3):257-61. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.08.001>
66. bioMérieux. FICHA DE DADOS DE SEGURANÇA - VITEK-MS-CHCA (# 411071): bioMérieux; 2023 [Available from: <https://resourcecenter.biomerieux.com/dashboard>].

67. Jolliffe IT, Cadima J. Principal component analysis: a review and recent developments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2016;374(2065):20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
68. Wang HY, Lien F, Liu TP, Chen CH, Chen CJ, Lu JJ. Application of a MALDI-TOF analysis platform (ClinProTools) for rapid and preliminary report of MRSA sequence types in Taiwan. *PeerJ.* 2018;6:e5784. <https://doi.org/10.7717/peerj.5784>
69. Europeia C. Orientações da UE para a utilização prudente de agentes antimicrobianos no domínio da saúde humana. 2017/C 212/01. 2017
70. Cuenod A, Foucault F, Pfluger V, Egli A. Factors Associated With MALDI-TOF Mass Spectral Quality of Species Identification in Clinical Routine Diagnostics. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:646648. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.646648>
71. Boucherabine S, Giddey A, Nassar R, Al-Hroub HM, Mohamed L, Harb M, et al. Proteomic and metabolomic profiling of methicillin resistant versus methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* using a simultaneous extraction protocol. *Front Microbiol.* 2024;15:1402796. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1402796>
72. Xu Z, Chen J, Vougas K, Shah A, Shah H, Misra R, et al. Comparative Proteomic Profiling of Methicillin-Susceptible and Resistant *Staphylococcus aureus*. *Proteomics.* 2020;20(2):e1900221. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900221>
73. Rafailidis PI, Ioannidou EN, Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou EN, Falagas ME. Ampicillin/Sulbactam. *Drugs* 2007 67:13. 2012-09-14;67(13). <https://doi.org/10.2165/00003495-200767130-00003>

Anexo 1 – Ilustração do funcionamento da tecnologia MALDI-TOF MS



Retirado de Hu et al, 2019 (14).

Anexo 2 – Registo no Prospero

27/06/25, 19:14

PROSPERO

Detection of Biomarkers of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) by MALDI-TOF MS

Pedro Santos, Edna Ribeiro, Irina Alho

To enable PROSPERO to focus on COVID-19 submissions, this registration record has undergone basic automated checks for eligibility and is published exactly as submitted. PROSPERO has never provided peer review, and usual checking by the PROSPERO team does not endorse content. Therefore, automatically published records should be treated as any other PROSPERO registration. Further detail is provided [here](#).

Citation

Pedro Santos, Edna Ribeiro, Irina Alho. Detection of Biomarkers of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) by MALDI-TOF MS. PROSPERO 2024 CRD42024591404. Available from <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/view/CRD42024591404>.

REVIEW TITLE AND BASIC DETAILS

Review title

Detection of Biomarkers of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) by MALDI-TOF MS

Original language title

Detection of Biomarkers of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA) by MALDI-TOF MS

Review objectives

- Identify the main biomarkers of MRSA and MSSA that contribute to their discrimination;
- Verify the consistency of MRSA and MSSA biomarkers;
- Address the differences between sample preparations for MALDI-TOF MS;
- Address the contribution of AI tools to the identification and discrimination of MRSA and MSSA isolates.

Keywords

MALDI-TOF MS; methicillin-resistance; MRSA; MSSA; Artificial intelligence; Discrimination

SEARCHING AND SCREENING

Searches

PubMed and Web of Science; All available articles with full-text access and in English that appear in the database collection process will be eligible until June 27th, 2024. Exclusion criteria: reviews, editorials, notes to the editor, commentaries, letters, case-reports or case-series.

Study design

Both randomized and nonrandomized study types will be included.

Included

Regarding the types of publications it will be included prospective and retrospective observational studies, interventional studies, database analyses and non-interventional studies. Systematic Literature Review and meta-analysis studies will be used as reference checks.

ELIGIBILITY CRITERIA

Condition or domain being studied

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) remains an important agent that causes infections which could be more easily managed with early diagnosis. The MALDI-TOF MS technology, with the ability to detect biomarkers could distinguish MRSA from other variants of *S. aureus*, thus being seen as optimization of the diagnostic and therapeutic

process. In this study, a Systematic Literature Review will be carried out with the aim of evaluating the ability to detect specific biomarkers for identifying MRSA using the MALDI-TOF MS method. The recognition of reliable biomarkers might allow the identification and differentiation of MRSA and MSSA using the MALDI-TOF MS could lead to its possible application in the detection of MRSA in routine laboratories.

Population

Included

Patients with *S. aureus* infection.

Intervention(s) or exposure(s)

Detection of methicillin resistance biomarkers using MALDI-TOF MS.

Comparator(s) or control(s)

The profiles of MRSA and MSSA will be compared.

Context

There will be included studies that use MALDI-TOF MS biomarkers for the detection of methicillin resistance in MRSA.

OUTCOMES TO BE ANALYSED

Main outcomes

Measures of effect

S. aureus resistance biomarkers identified using MALDI-TOF MS.

Mass/Charge

Additional outcomes

Not applicable

Measures of effect

Not applicable

DATA COLLECTION PROCESS

Data extraction (selection and coding)

The articles resulting from the research will initially be selected by title. The selection by abstract will be made, based on the inclusion and exclusion criteria, by two independent reviewers and the articles will be included or excluded based on the unanimous decision of the two reviewers. In cases of disagreement, a third reviewer will assess the abstracts and a decision will be made on the article. The selected articles will be compiled and organised using EndNote™ software from Clarivate Analytics and Excel® from Microsoft Office.

Risk of bias (quality) assessment

The quality of the articles, the risk of bias and the accuracy of the data will be assessed using the critical appraisal tools of the Joanna Briggs Institute (JBI), according to the type of study being assessed (case-control studies, cross-sectional studies, etc).

PLANNED DATA SYNTHESIS

Strategy for data synthesis

The data extracted from the selected articles will be organised by: author, year, MALDI-TOF MS equipment that was used, number of samples included, MRSA and MSSA differentiation method, methicillin resistance biomarkers, methicillin resistance and methicillin sensitivity. This data will be summarised and organised in summary table. Statistical analysis will be carried out using Microsoft Office Excel®.

Analysis of subgroups or subsets

Analysis of subgroups or subsets not planned

REVIEW AFFILIATION, FUNDING AND PEER REVIEW

Review team members

27/06/25, 19:14

PROSPERO

- Mr Pedro Santos, Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL)
- Dr Edna Ribeiro, Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL)
- Dr Irina Alho, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL)

Review affiliation

Escola Superior de Tecnologias da Saúde de Lisboa (ESTeSL); Av. D. João II, Lote 4.69.01 1990-096 Lisboa, Parque das Nações

Funding source

Review has no specific/external funding but is supported by guarantor/review team (non-commercial) institutions.

Named contact

Pedro Santos.

2023074@alunos.estesl.ipl.pt

TIMELINE OF THE REVIEW

Review timeline

Start date: 01 September 2024. End date: 01 July 2025

Date of first submission to PROSPERO

17 October 2024

Date of registration in PROSPERO

29 October 2024

AVAILABILITY OF FULL PROTOCOL

Availability of full protocol

A full protocol has been written and uploaded to PROSPERO. The protocol will be made available after the review is completed.

CURRENT REVIEW STAGE

Publication of review results

The intention is to publish the review once completed. The review will be published in English

Stage of the review at this submission

Review stage	Started	Completed
Pilot work	✓	✓
Formal searching/study identification	✓	✓
Screening search results against inclusion criteria	✓	✓
Data extraction or receipt of IPD	✓	✓
Risk of bias/quality assessment	✓	✓
Data synthesis	✓	✓

Review status

The review is currently planned or ongoing.

ADDITIONAL INFORMATION

PROSPERO version history

- Version 1.2, published 21 Mar 2025
- Version 1.1, published 29 Oct 2024
- Version 1.0, published 29 Oct 2024

Review conflict of interest

<https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/register/TemplatePreview>

3/4

27/06/25, 19:14

PROSPERO

None known

Country

Portugal

Medical Subject Headings

Biomarkers; Humans; Methicillin Resistance; Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus; Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization; Staphylococcal Infections; Staphylococcus aureus

Revision note

No preview available

Disclaimer

The content of this record displays the information provided by the review team. PROSPERO does not peer review registration records or endorse their content.

PROSPERO accepts and posts the information provided in good faith; responsibility for record content rests with the review team. The guarantor for this record has affirmed that the information provided is truthful and that they understand that deliberate provision of inaccurate information may be construed as scientific misconduct.

PROSPERO does not accept any liability for the content provided in this record or for its use. Readers use the information provided in this record at their own risk.

Any enquiries about the record should be referred to the named review contact

Anexo 3 – Certificado de apresentação do poster “Detecção de Biomarcadores de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina por MALDI-TOF MS no III Congresso BioMedLab



**III CONGRESSO
BioMedLab**
ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS LABORATORIAIS

 **EPBS
PATRONAGE**
ATRIBUIÇÃO DE 5
EUROPEAN CPD CREDITS

Certificado

Certifica-se que Pedro Santos; Irina Alho e Edna Ribeiro são autores do poster “Detecção de Biomarcadores de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina por MALDI-TOF MS” apresentado por Pedro Santos no III Congresso BioMedLab, que decorreu nos dias 7, 8 e 9 de março de 2025, em Lisboa.


Presidente do III Congresso BioMedLab
Sandra Vieira de Carvalho


Presidente da BioMedLab
Fernando José Figueiredo Agostinho d'Abreu Mendes

BioMedLab
ASSOCIAÇÃO PORTUGUESA DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS LABORATORIAIS

Anexo 4 – Certificado de melhor poster apresentado no III Congresso BioMedLab



11. Apêndices

Apêndice 1 - Tabela síntese dos artigos incluídos na revisão sistemática da literatura

Autor, ano	Amplitude da amostra	Local do estudo	Metodologia			Resultados		
			Método de referência	Analizador MALDI-TOF MS	Método de preparação da amostra	Biomarcadores de Resistência	Biomarcadores de Sensibilidade	Ferramentas de AI
Abalkhail & Elbehiry, 2022 (18)	22 MRSA e 26 MSSA	Arábia Saudita	PCR do gene <i>mec A</i>	MALDI Biotyper (Bruker Daltonics)	I-PEM *1	5530, 6580, 6710 e 6820	2771, 2996, 3720, 4480, 4540 e 6310	PCA
Alksne et al, 2020 (59)	26 MRSA e 28 MSSA	Letónia	PCR do gene <i>mec A</i>	Autoflex Speed MS (Bruker Daltonics)	I-PEM *1 O-PEM *1 ICM *1	ICM e O-PEM: PSM-mec (2414 ± 2) ICM, O-PEM I-PEM: toxina delta (3006 ± 2)	ND	NA
Du et al, 2002 (19)	35 MRSA e 41 MSSA	China	PCR do gene <i>mec A</i>	linear MALDI-TOF MS (Micromass UK Ltd.)	O-PEM *2	Principais picos: 2413,01 e 2453,54	Principais picos: 2547,91, 2585,28, 2686,45 e 2723,17	NA
Edwards-Jones et al, 2000 (20)	7 MRSA e 7 MSSA	Reino Unido	Tipagem com PFGE e com <i>phage typing</i>	Kompact MALDI 2 linear TOF MS (Kratos Analytical)	O-PEM *2	891, 1140, 1165, 1229, 2127, 2454 e 3045	2548 e 2647	NA
Elbehiry et al, 2023 (21)	197 MRSA e 129 MSSA	Arábia Saudita	Teste de Kirby-Bauer	MALDI Biotyper (Bruker Daltonik)	I-PEM *1	3990, 4120 e 5850	Ausência de picos de resistência	PCA

Fan et al, 2024 (60)	20 MRSA e 30 MSSA	China	Teste automatizado de TSA	VITEK MS (bioMérieux)	Protocolo Amp-MB O-PEM *3	4304,6889 (A.U. superior em isolados de MRSA) 3874,4304 e 6889	3041,2293 (A.U. superior em MSSA)	NA
Gao et al, 2002 (61)	21 MRSA e 41 MSSA	China	Teste de Kirby-Bauer PCR do gene <i>mec A</i>	Autoflex max TOF/TOF MS (Bruker Daltonics)	I-PEM *4	4821 e 9645	2306 e 2322 (A.U. superior em MSSA)	PCA
Hu et al, 2019 (62)	241 MRSA e 106 MSSA	China	Teste de Kirby-Bauer	MALDI-Biotyper (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	PSM-mec (2413 ± 2)	ND	Clinpro Tools v.3.0
Josten et al, 2014 (49)	356 <i>S.aureus</i>	Alemanha *7	Teste de Kirby-Bauer e PCR do gene <i>mec A</i> (confirmado com PCR <i>multiplex</i> da <i>SCCmec</i>)	MALDI-TOF MS Biflex II (Bruker Daltonic) VITEK MS (bioMérieux)	O-PEM *1 ICM *5	PSM-mec (CC5): 2415 (intervalo 2404 - 2420) Toxina delta: 3007 (restantes CC's) e 3037 (CC1)	ND	NA
Kim et al, 2019 (49)	320 <i>S.aureus</i> (base de dados) 181 <i>S.aureus</i> (amostra teste)	Coreia	PCR do gene <i>mec A</i> e tipagem da <i>SCCmec</i>	Microflex LT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	SCCmec IV: 5541 (+) e 5053 (-) PSM-mec (<i>SCCmec</i> III específico): 2410 e 4607 Pelo menos um: 1975, 2410, 3890, 4607 e 6594	2194, 2339 e 2631	BioNumerics (Algoritmo <i>decision tree</i>)

Paskova et al, 2020 (64)	35 MRSA	Multicentro europeu	ND	MicroFlex mass spectrometer (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	PSM-mec (2413 ± 3.00) e toxina delta (3006 ± 3.00)	ND	NA
Rhoads et al, 2016 (65)	137 MRSA e 146 MSSA 12 MRSA USA 100-USA1200	EUA	PCR do gene <i>mec A</i>	VITEK MS (bioMérieux) Bruker MicroFlex (Bruker Daltonics): isolados USA	ICM *5	PSM-mec (2415 ± 4.00); intervalo otimizado (2415 ± 2.00)	ND	NA
Sogawa et al, 2017 (50)	50 MRSA e 50 MSSA (algoritmo) 34 MRSA e 31 MSSA (amostra teste)	Japão	PCR do gene <i>mec A</i>	Autoflex II TOF (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	1888.1 (430.3 A.U.), 1935.9 (880.8 A.U.), 2867.9 (1490.9 A.U.), 3044.2 (20061.4 A.U.)*6 e 4641.3 (260.0 A.U.)	1935.9 (662.2 A.U.) e 2760,3 (1230.1 A.U.)	NL-SVM
Wang et al, 2013 (51)	48 MRSA e 52 MSSA	China	PCR do gene <i>mec A</i>	MALDI-Microflex (Bruker Daltonics)	I-PEM *1	3784 e 5700 (A.U. superior em MRSA)	3784 e 5700 (A.U. inferior em MSSA)	Clinpro Tools (Algoritmo genético)
Yu et al, 2022 (52)	4309 MRSA e 3949 MSSA (algoritmo) 12101 MS (validação externa)	Taiwan	Teste automatizado de TSA	MicroflexLT MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics)	O-PEM *1	6593,2	6550,0	LightGBM

*¹ – solução de matriz de CHCA com 50% acetonitrilo e 2.5% ácido trifluoracético; *² – solução de matriz de CMBT (acetonitrilo/metanol/água destilada (1:1:1, v/v/v), com 0.1% ácido fórmico e 0.01 M de éter 18-coroa-6); *³ – Extração com ácido fórmico e com matriz VITEK-MS-CHCA (#411071): solução de matriz de CHCA com 20-30% acetonitrilo, 20-30% etanol e 3-5% ácido trifluoracético (66); *⁴ – solução de matriz de CHCA-C3 com acetonitrilo em água destilada (v/v = 1/1) com 2% trifluoracético; *⁵ – VITEK-MS-CHCA (#411071): solução de matriz de CHCA com 20-30% acetonitrilo, 20-30% etanol e 3-5% ácido trifluoracético, sem ácido fórmico (66); *⁶ – m/z correspondente a um fragmento da PBP2a; *⁷ – dois isolados de ST239 originários da Austrália e Portugal.

Legenda: ND - não descrito; NA - não aplicado; CC – complexo clonal; CMBT - 5-Cloro-2-mercaptobenzotiazol; CHCA - ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico; FA - ácido fórmico; ICM - método *intact-cell*; O-PEM - método de extração proteica *on-target*; I-PEM - método de extração proteica *in-tube*; A.U. - intensidade média; QC - Controlo de Qualidade; PCA - *Principal Component Analysis*; NL-SVM - *Non-linear Support Vector Machine*; LightGBM - *Light Gradient Boosting Machine*; MS - espectro de massa.

Apêndice 2 – Tabela de avaliação crítica da qualidade de estudos transversais - Joanna Briggs Institute

	(18)	(59)	(19)	(20)	(21)	(60)	(61)	(62)	(63)	(49)	(64)	(65)	(50)	(51)	(52)
1.Were the criteria for inclusion in the sample clearly defined?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2.Were the study subjects and the setting described in detail?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3.Was the exposure measured in a valid and reliable way?	S	S	S	IC	N	N	S	N	S	S	IC	S	S	S	N
4.Were objective, standard criteria used for measurement of the condition?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5.Were confounding factors identified?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6.Were strategies to deal with confounding factors stated?	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7.Were the outcomes measured in a valid and reliable way?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8.Was appropriate statistical analysis used?	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	IC	S

Legenda - S: Sim; N: Não; IC: Incerto; NA: Não aplicável.

Fonte: Joanna Briggs Institute, 2020 (58).