

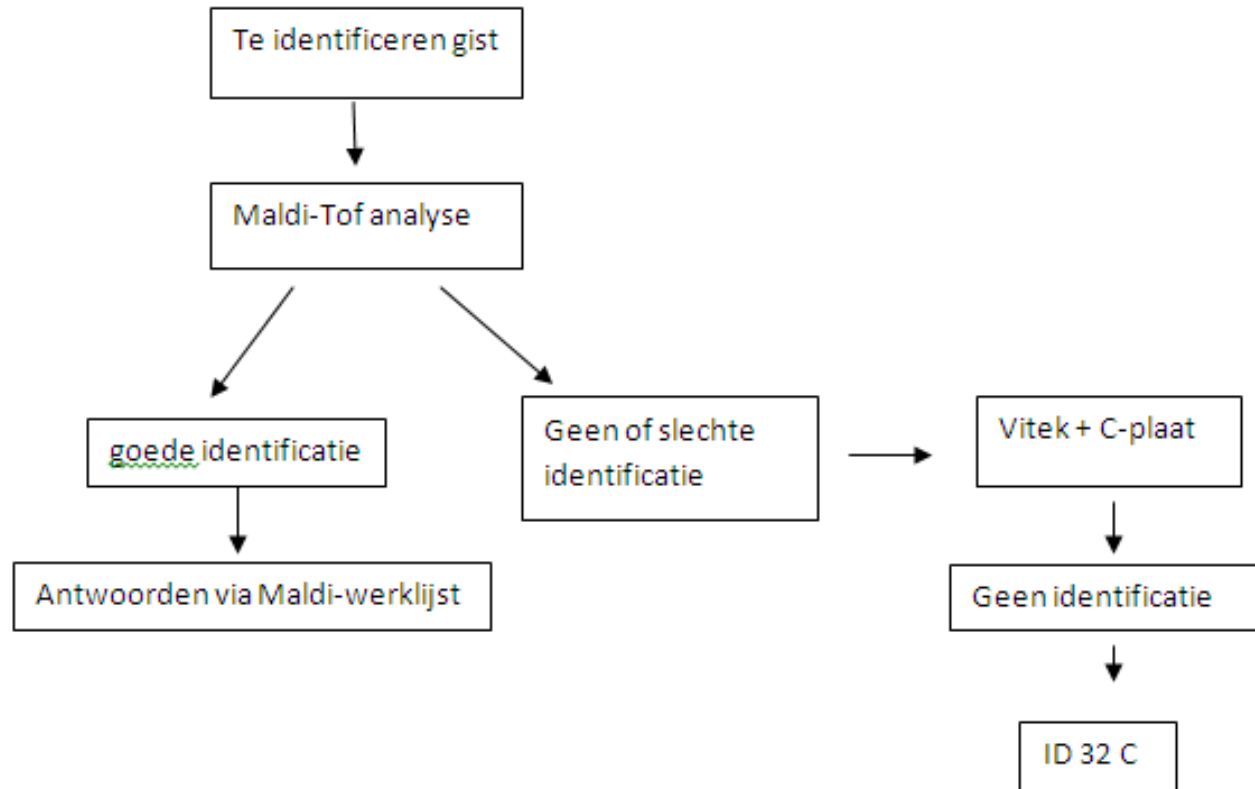
MALDI-TOF MS VOOR DE IDENTIFICATIE VAN GISTEN

Christophe Indevuyst
ASO Klinische biologie

Identificatie gisten

2

Species identificatie: gebruikte technieken:



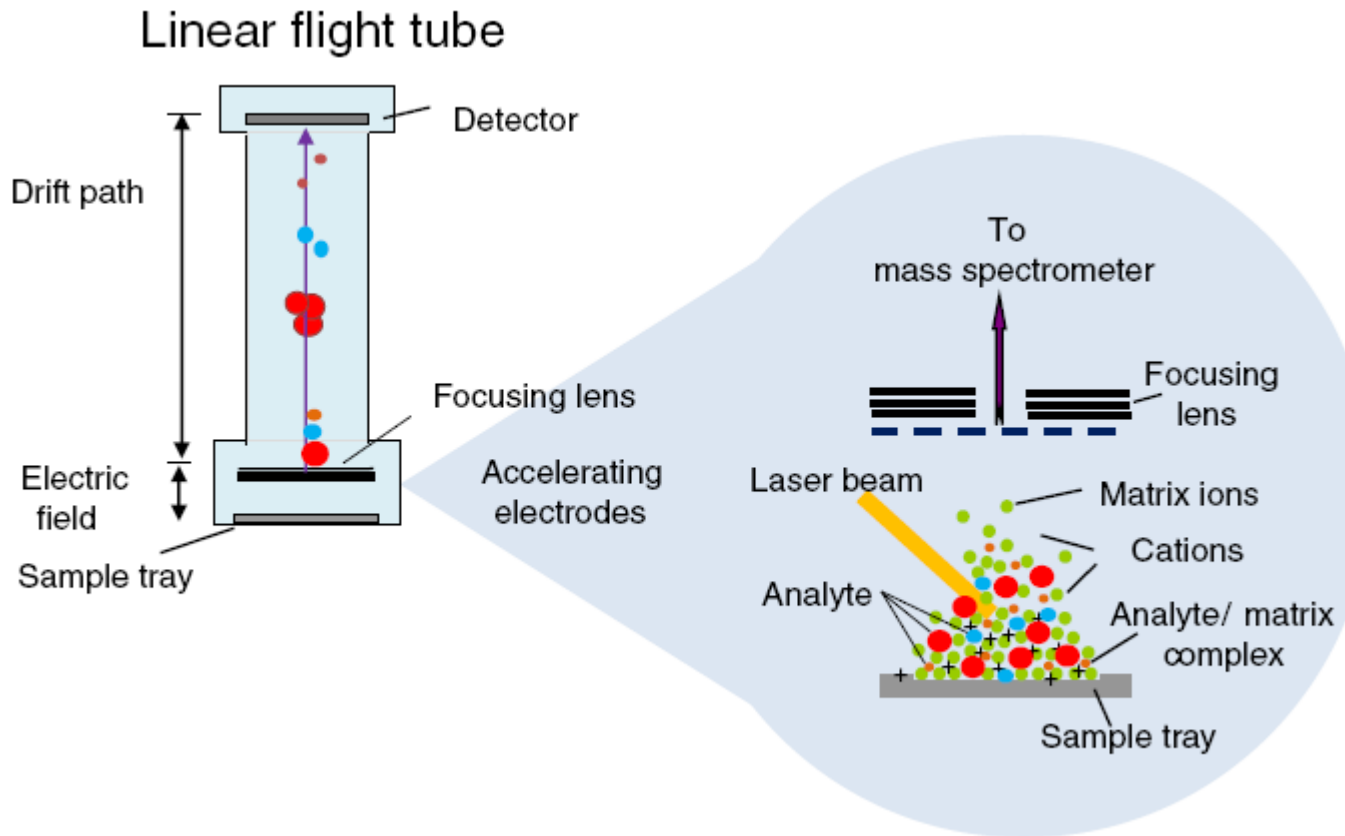
MALDI TOF MS

3

Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation
—
Time-Of-Flight
Mass Spectrometry

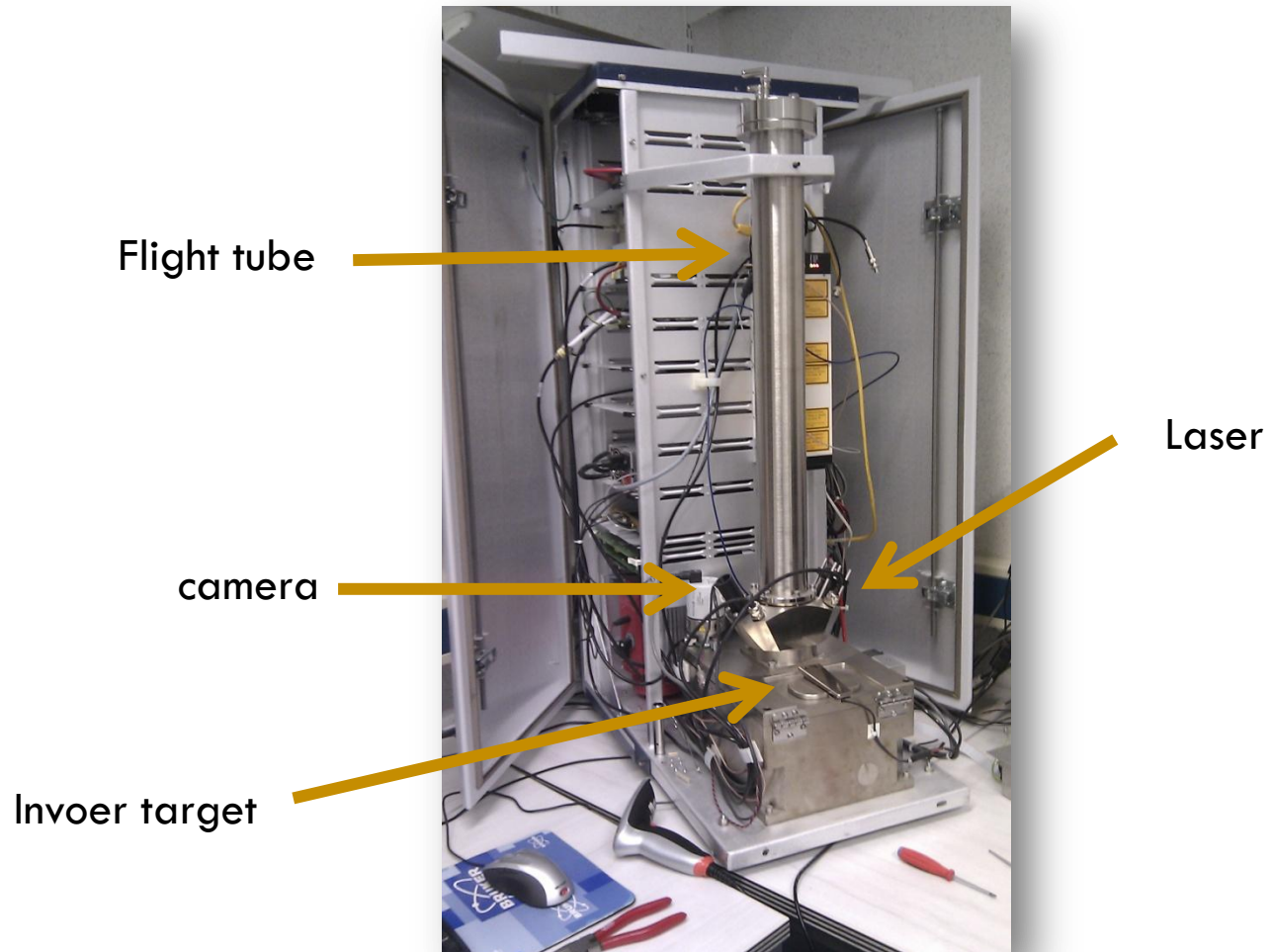
MALDI-TOF MS werkingsprincipe

4



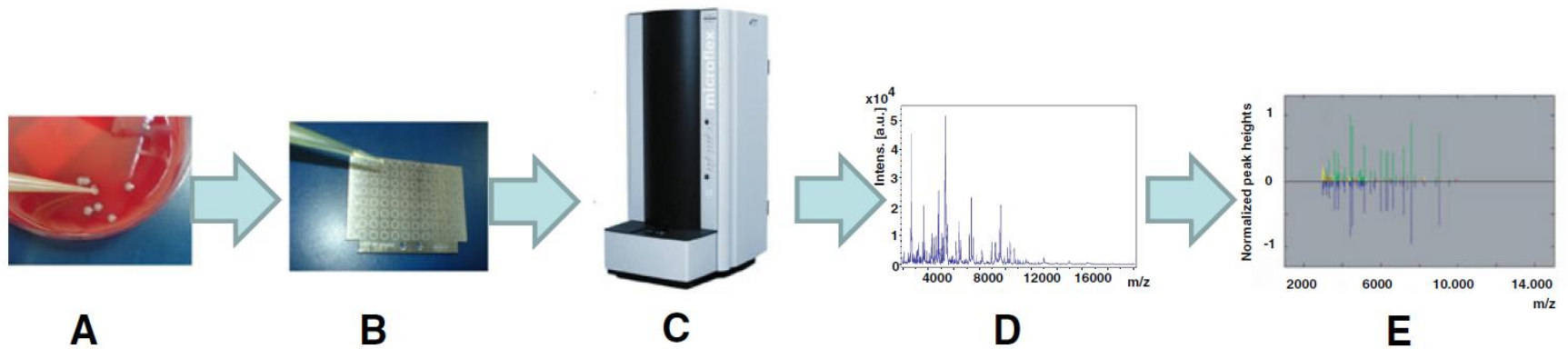
Bruker Microflex

5



Analyseprocedure

6



Ranking	Species Identification	Score Value	NCBI Code
1 (++)	Enterococcus faecium DSM 17050 DSM	2.298	1352
2 (++)	Enterococcus faecium 20218_1 CHB	2.297	1352
3 (++)	Enterococcus faecium 11037 CHB	2.206	1352
4 (++)	Enterococcus faecium DSM 13589 DSM	2.116	1352
5 (++)	Enterococcus faecium DSM 2146 DSM	2.093	1352
6 (++)	Enterococcus faecium DSM 2918 DSM	2.008	1352
7 (+)	Enterococcus faecium PX_21086109_III MLD	1.949	1352
8 (+)	Enterococcus faecium DSM 6177 DSM	1.862	1352
9 (+)	Enterococcus faecium VRE_PX_16086218 MLD	1.83	1352
10 (+)	Enterococcus mundtii DSM 4840 DSM	1.739	53346

Groen: logscore ≥ 2
 Geel: logscore 1.7 ≥ 2
 Rood: logscore < 1.7

Acceptatiecriteria

7

- Acceptatie wanneer:
 - ▣ Alle groene en gele matches van hetzelfde species/complex
 - ▣ Beste groene match is meer dan 0.2 hoger dan beste groene/gele match van ander genus of species.
 - ▣ Indien geen groene matches dienen er minstens 5 consecutieve gele en/of rode matches te zijn met ten minste 1 logscore ≥ 1.7 . Daarenboven moet er minimum 0.2 verschil zijn met beste gele/rode match van ander genus of species.

Acceptatiecriteria

8

- Identificatie wordt niet aanvaard:
 - ▣ Beste match < 1.7
 - ▣ Bij onvoldoende differentiatie met groene match van ander genus/species: bijkomende identificatietesten uitvoeren.

- Enkele uitzonderingen dienen steeds bevestigd te worden:
 - ▣ *S. pneumoniae*, *Shigella* species, *Salmonella* species.

Acceptatiecriteria

9

- Species waarvan geen 5 MSP's aanwezig in databank
 - ▣ *C. dubliniensis*
 - ▣ *C. metapsilosis*
 - ▣ *C. tropicalis*
 - ▣ *C. krusei*
 - ▣ *C. guilliermondii*
 - ▣ ...



Indien logscore < 2.000 kunnen deze species nooit via MALDI-TOF worden geïdentificeerd

[-] Saccharomycetes (0/203)
[-] Saccharomycetales (0/203)
[-] Dipodascaceae (0/21)
[-] Metschnikowiaceae (0/9)
[-] mitosporic Saccharomycetales (0/97)
[-] Candida (0/97)
Candida africana (1/1)
Candida albicans (14/14)
Candida boidinii (5/5)
Candida cariosilignicola (1/1)
Candida catenulata (4/4)
Candida cylindracea (1/1)
Candida dubliniensis (3/3)
Candida ernobii (1/1)
Candida freyschussii (1/1)
Candida friedrichii (1/1)
Candida glabrata (7/7)
Candida haemulonii (2/2)
Candida inconspicua (1/1)
Candida intermedia (1/1)
Candida lactis-condensi (1/1)
Candida magnoliae (2/2)
Candida maltosa (1/1)
Candida membranifaciens (1/1)
Candida mesenterica (2/2)
Candida metapsilosis (2/2)
Candida multigemmis (1/1)
Candida nemodendra (1/1)
Candida nitratophila (1/1)
Candida nivariensis (2/2)

Acceptatiegraad

10

- Identificatiegraad van gisten via MALDI-TOF MS:
62%. (validatie mei 2010)
 - ▣ Databank Bruker mei 2010 → reeds geüpdate
 - ▣ Nu versie ~~3995~~ 4111

Vragen

11

1. Welke factoren zijn belangrijk voor een goede identificatie van gisten?
2. Evaluatie huidige procedure. Optimalisatie?
3. Welke mogelijkheden zijn er voor de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS.

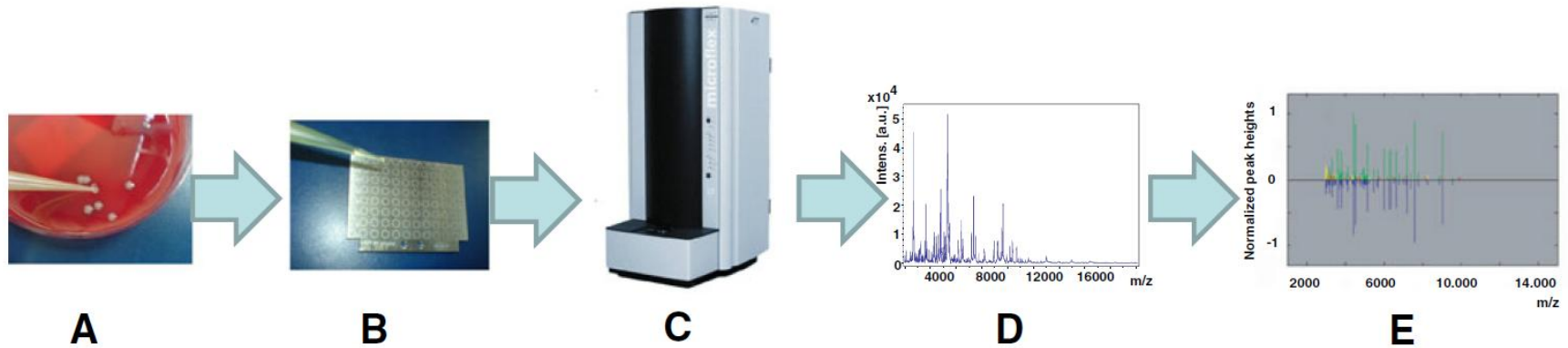
Vragen

12

1. Welke factoren zijn belangrijk voor een goede identificatie van gisten?
2. Evaluatie huidige procedure. Optimalisatie?
3. Welke mogelijkheden zijn er voor de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS.

Factoren met invloed op MALDI-TOF MS resultaat.

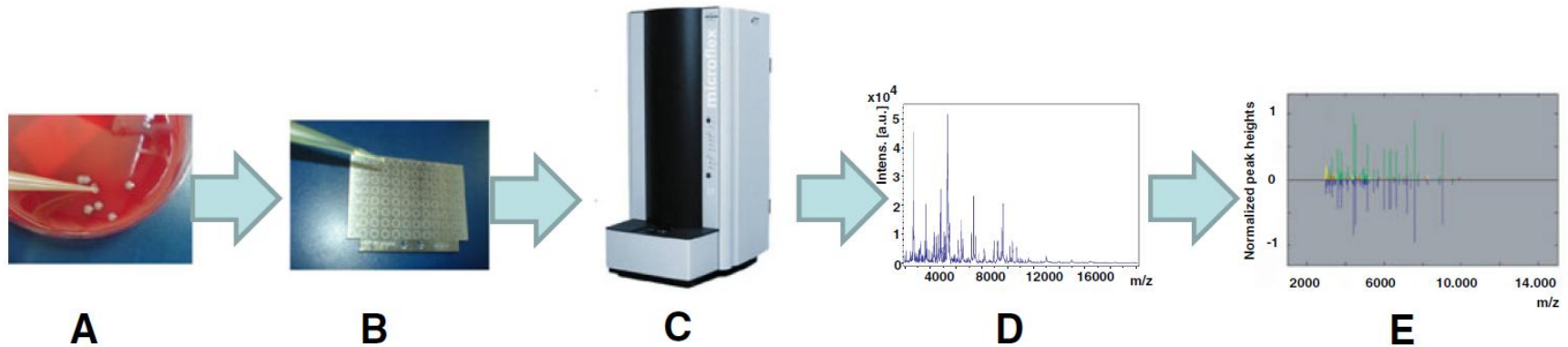
13



- Incubatieduur
- Incubatietemperatuur
- Voedingsbodem
 - Matrix
 - Extractieprocedure
- MALDI settings
 - MSP databank

Factoren met invloed op MALDI-TOF MS resultaat.

14



- Incubatieduur
- Incubatietemperatuur
- Voedingsbodem
 - Matrix
 - **Extractieprocedure**
 - MALDI settings
 - MSP databank

Extractieprocedures

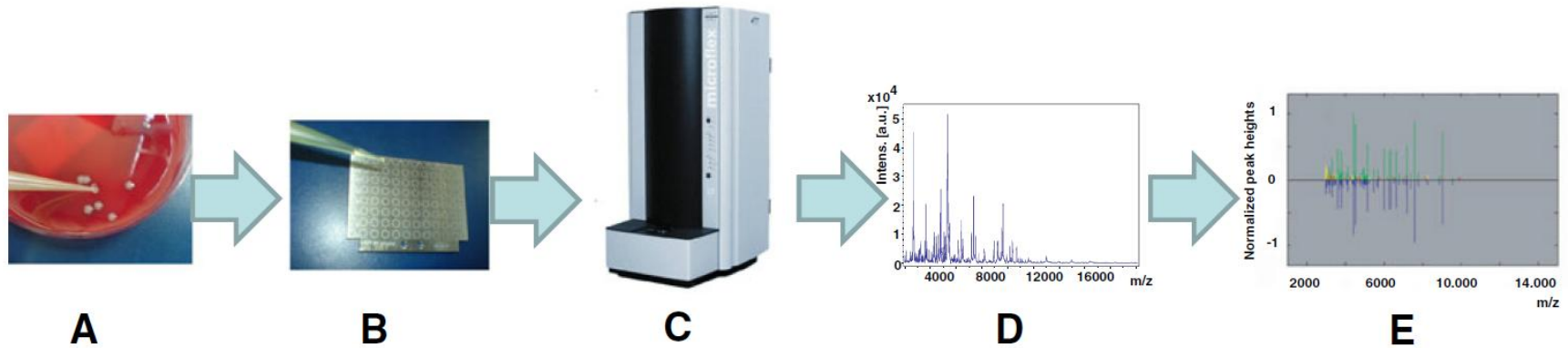
15

- Rechtstreekse applicatie op target: slechte resultaten.
- Conventionele extractie met EtOH en mierenzuur:
 - ▣ Omslachtig: 3 x centrifugeren
 - ▣ Tijdrovend: +/- 20 minuten
- Verkorte extractieprocedure:
 - ▣ Directe applicatie van mierenzuur 70%
 - ▣ Tijdsduur: +/- 5 minuten
 - ▣ Droogtijd mierenzuur 70% bepalend.



Factoren met invloed op MALDI-TOF MS resultaat.

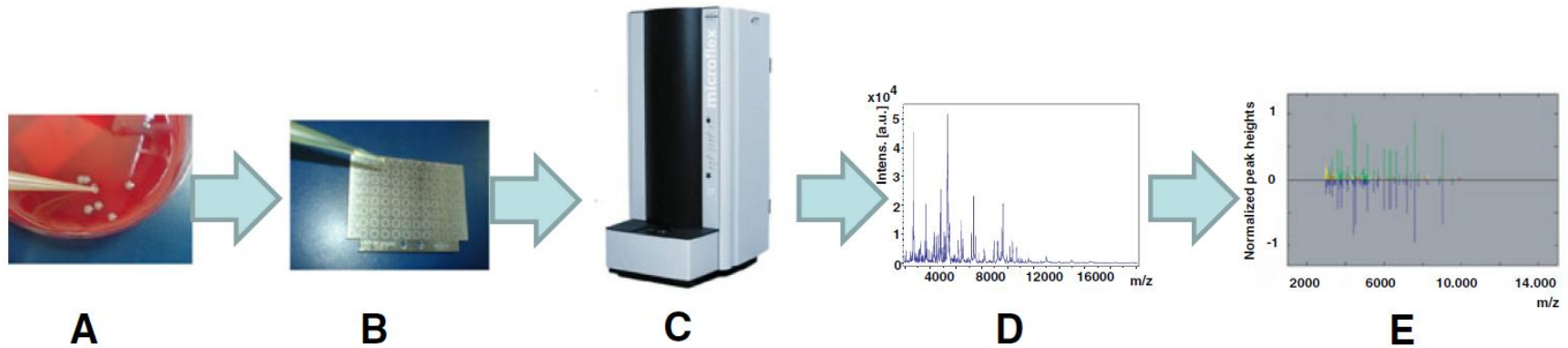
16



- Incubatieduur
- Incubatietemperatuur
- Voedingsbodem
 - Matrix
 - **Extractieprocedure**
- **MALDI settings**
 - **MSP databank**

Factoren met invloed op MALDI-TOF MS resultaat.

17



- Incubatieduur
- Incubatietemperatuur
- Voedingsbodem
 - Matrix
 - **Extractieprocedure**
 - **MALDI settings**
 - **MSP databank**

Maldi instellingen

18

□ Instellingen MBT_AutoX en MBT_process

AutoXecute Method Editor, Version 3.3.142.0 Method: MBT_AutoX (Read-only)

AutoXecute Method: MBT_AutoX

General Laser Evaluation Accumulation Movement Processing MS/MS

Peak Selection
Use masses from 4000 Da to 10000 Da for evaluation and processing
Use background list none for evaluation and processing Edit...

Peak Exclusion
☒ Ignore the 1 largest peaks in the defined mass range

Peak Evaluation
Processing Method: MBT_Process Edit... New...
Smoothing: ☒ On ☐ Off
Baseline Subtraction: ☒ On ☐ Off
Peak Resolution must be higher than 400

Fuzzy Control
☐ Digest/Peptides Signal Intensity: High
☒ Proteins/Oligonucleotides Maximal Resolution 10 times above threshold

Save Save As OK Cancel Help

Edit Processing Method [MBT_Process]

Mass List
Find
Edit
Processing
Smoothing
Baseline Subtraction

Mass List Find

Peak Detection Algorithm: Centroid

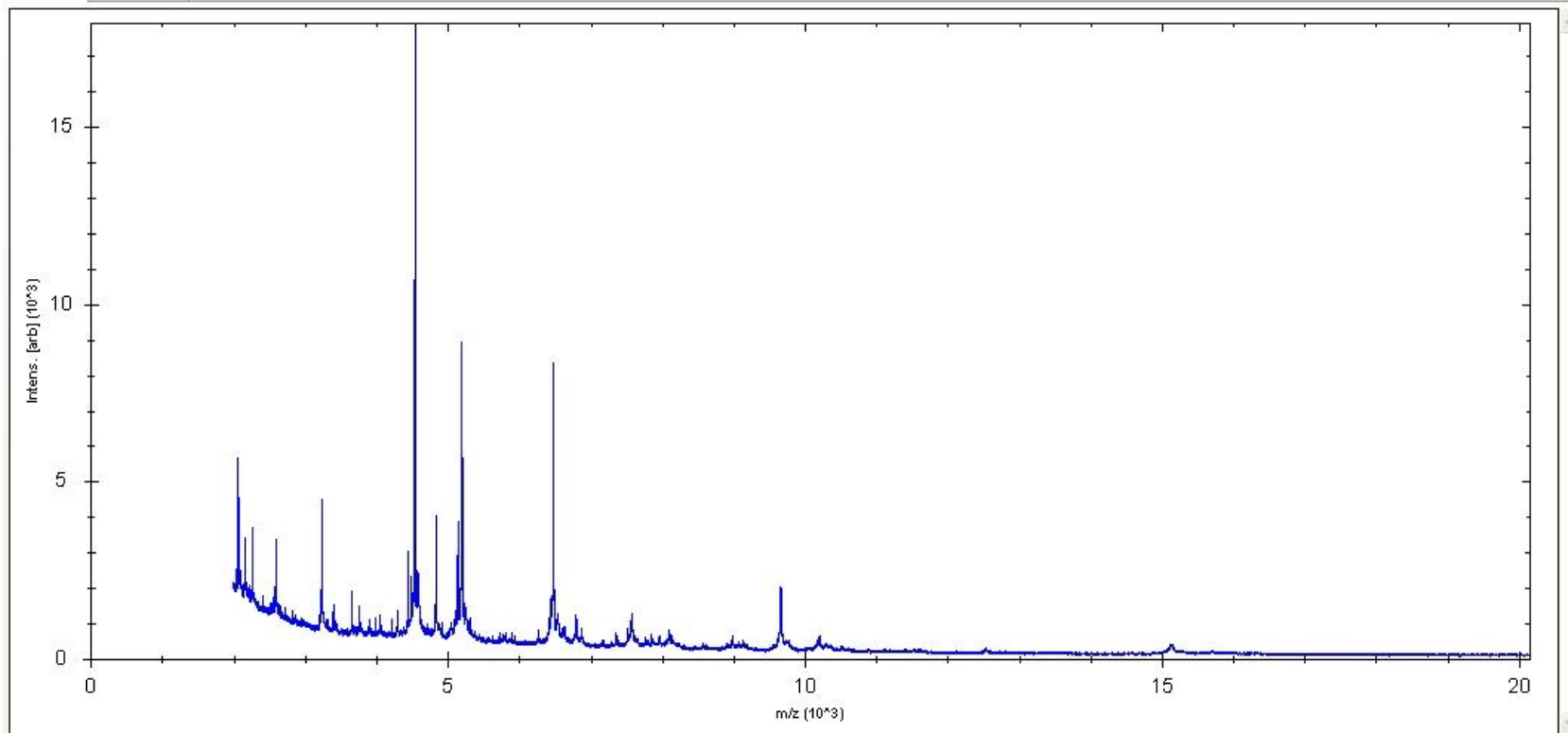
Signal to Noise Threshold: 2
Relative Intensity Threshold: 0 %
Minimum Intensity Threshold: 600
Maximal Number of Peaks: 300
Peak Width: 4 m/z
Height: 90 %
Baseline Subtraction: TopHat

Save Save as OK Cancel Help

Maldi instellingen

19

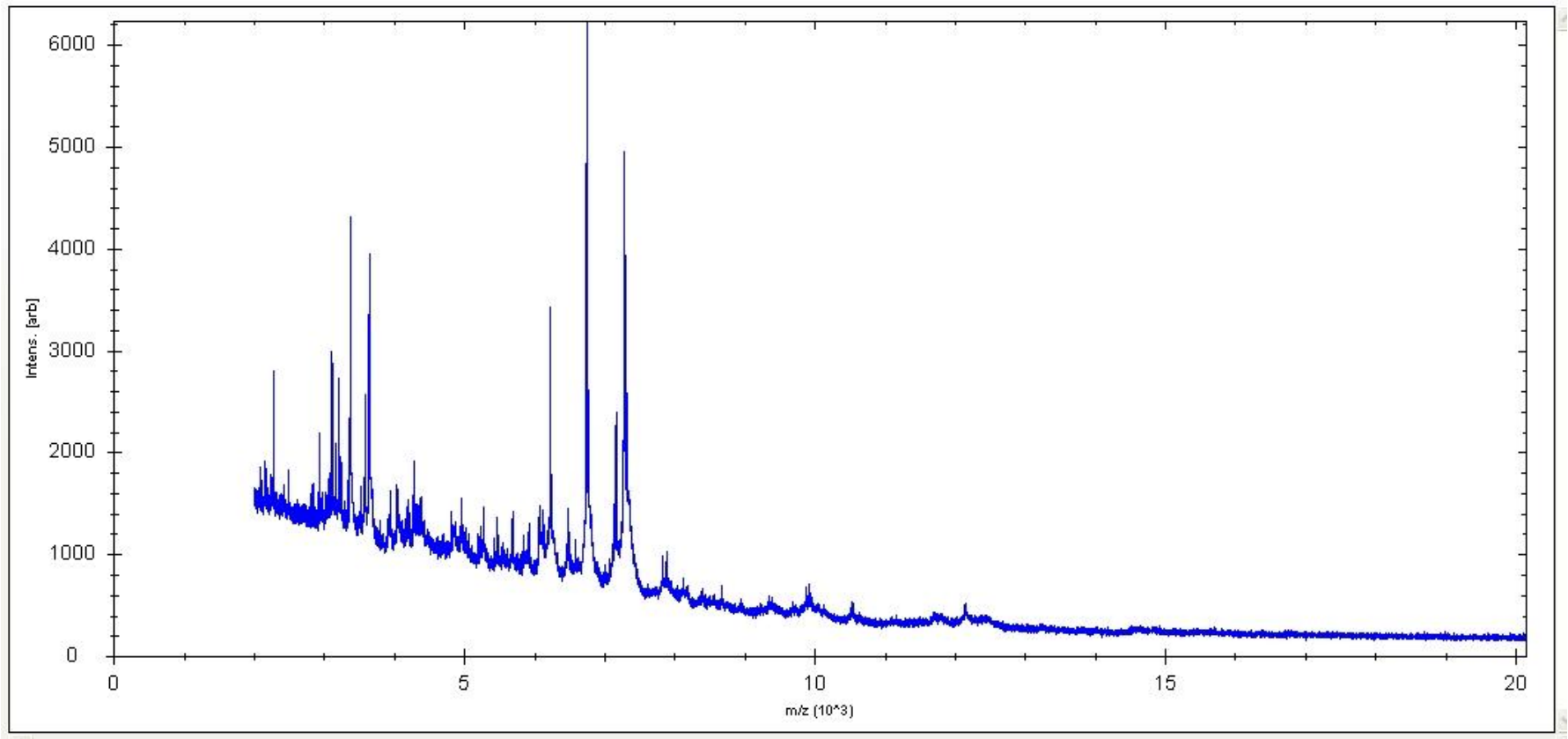
□ Acceptabele spectra



Maldi instellingen

20

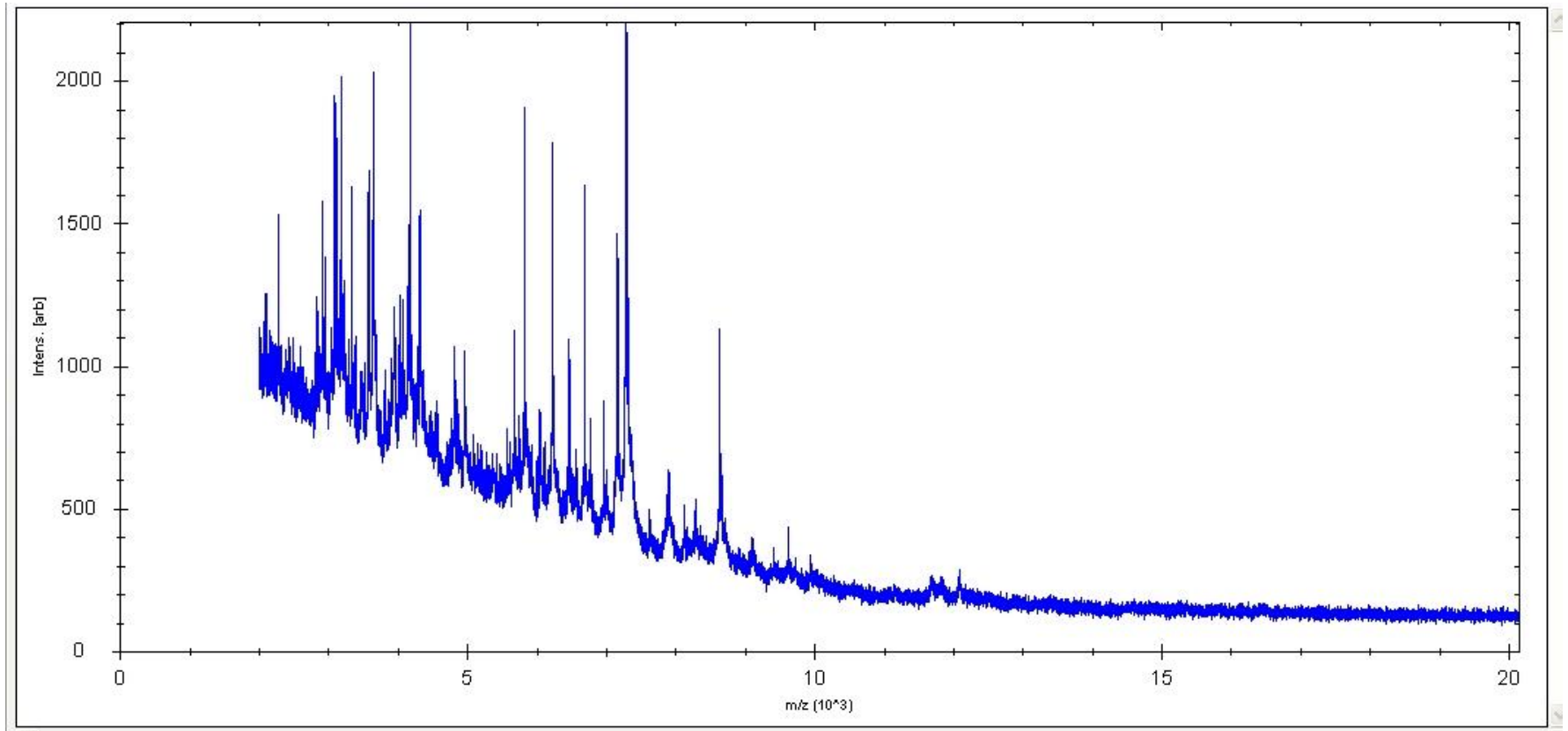
□ Niet acceptabele spectra



Maldi instellingen

21

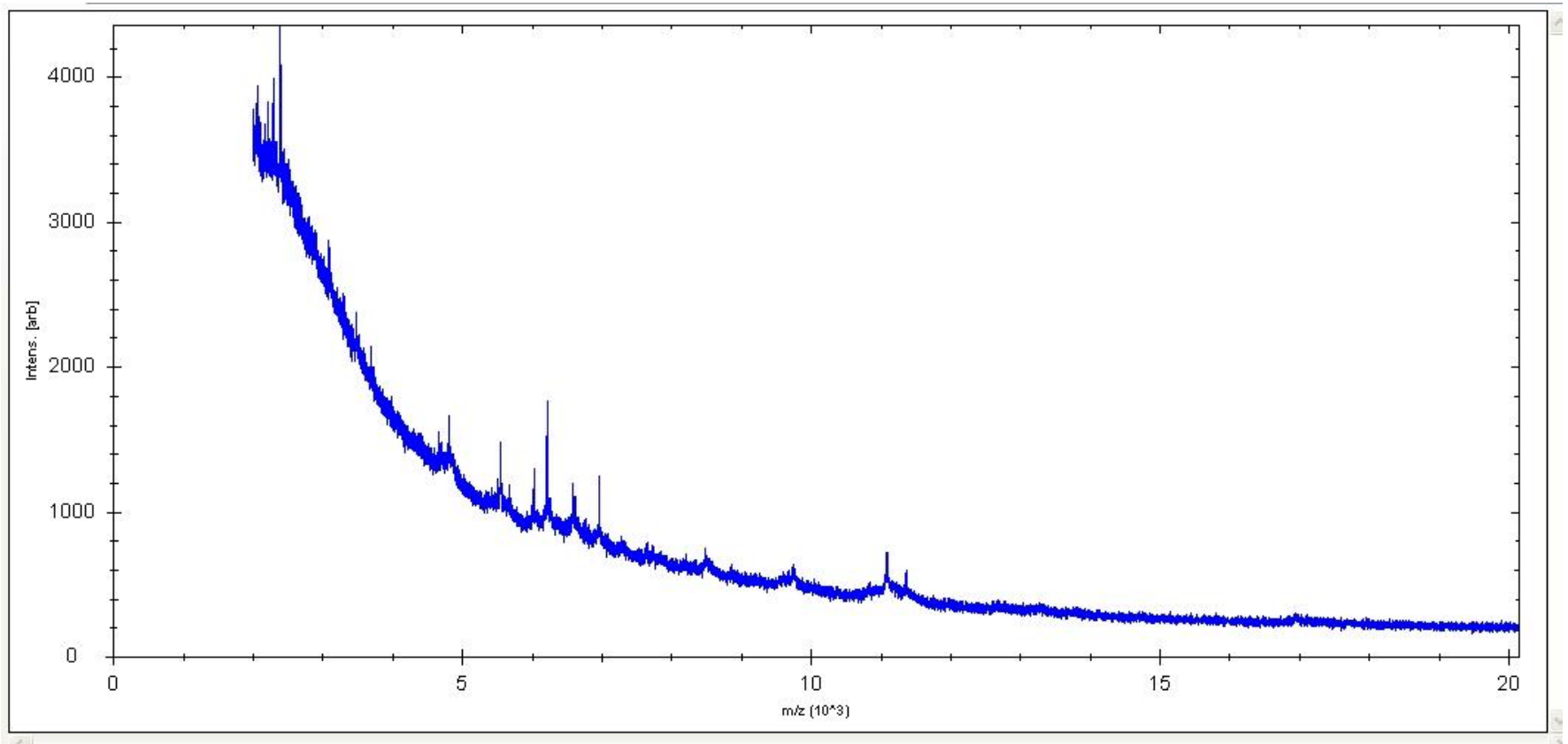
□ Niet acceptabele spectra



Maldi instellingen

22

□ Niet acceptabele spectra



Maldi instellingen

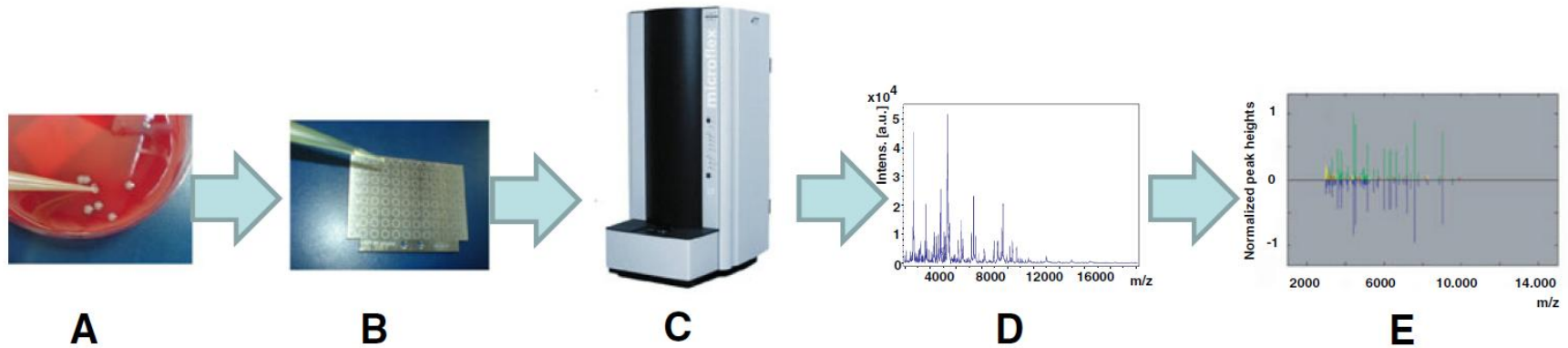
23

- Niet acceptabele spectra
 - ▣ Vnl. na verkorte extractieprocedure

 - Oplossing: ‘manueel beschieten’
 - ▣ Kies dikker/dunner uitgestreken gebied op target
 - ▣ Aanpassen intensiteit laser (hoger/lager)
 - ▣ Accepteren van suboptimale spectra
- ➔ bijkomende goede identificaties

Factoren met invloed op MALDI-TOF MS resultaat.

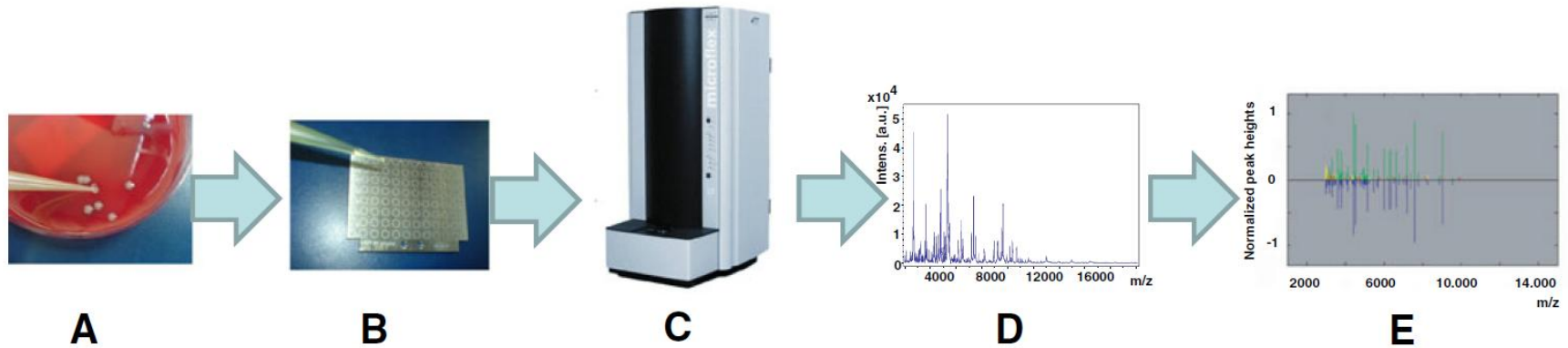
24



- Incubatieduur
- Incubatietemperatuur
- Voedingsbodem
 - Matrix
 - **Extractieprocedure**
 - **MALDI settings**
 - **MSP databank**

Factoren met invloed op MALDI-TOF MS resultaat.

25

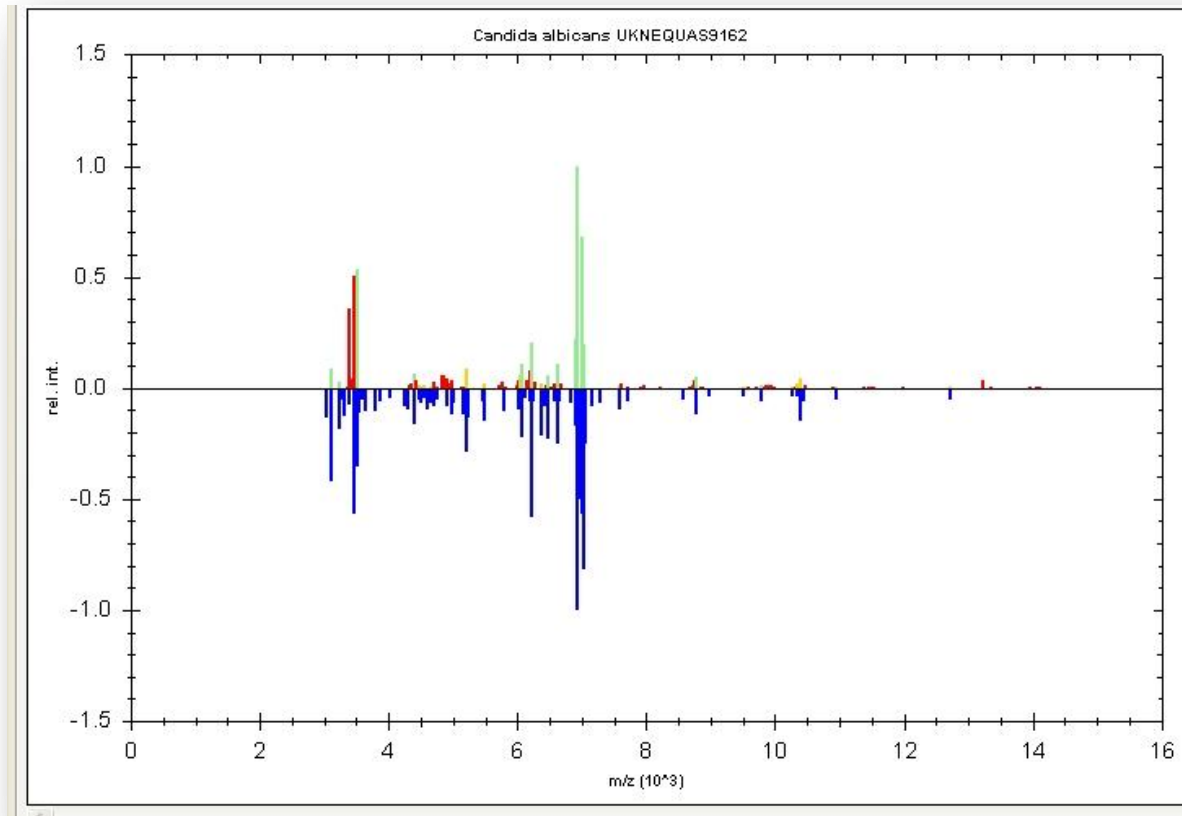


- Incubatieduur
- Incubatietemperatuur
- Voedingsbodem
 - Matrix
 - **Extractieprocedure**
 - **MALDI settings**
 - **MSP databank**

MSP databank

26

- Indien speciës niet in databank → slechte ID



Vragen

27

1. Welke factoren zijn belangrijk voor een goede identificatie van gisten?
2. Evaluatie huidige procedure. Optimalisatie?
3. Welke mogelijkheden zijn er voor de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS.

Vragen

28

1. Welke factoren zijn belangrijk voor een goede identificatie van gisten?
2. Evaluatie huidige procedure. Optimalisatie?
3. Welke mogelijkheden zijn er voor de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS.

Retrospectieve analyse

29

- Acceptatiegraad van de analyse van gisten periode november – december 2011.

N	Single-bepaling	Duplo-bepaling
396	72%	82%

Frequente problemen

30

- 10x *C. albicans*, slechte score. Bij herhaling wel OK.

	Detected Species	Log(Score)
●	Candida albicans ATCC 10231 THL	1.604
●	Candida albicans DSM 5817 DSM	1.591
●	Candida albicans VA 17248 07 04 UKE	1.492
●	Candida albicans DSM 6569 DSM	1.486
●	Candida albicans DSM 1577 DSM	1.447
●	Candida albicans DSM 1665 DSM	1.437
●	Candida albicans DSM 3454 DSM	1.363
●	Candida albicans DSM 6659 DSM	1.346
●	Candida albicans DSM 11943 DSM	1.299
●	Candida albicans DSM 11949 DSM	1.259

- 4x *C. glabrata* (5 sequentiële hits nodig voor acceptatie)

	Detected Species	Log(Score)
●	Candida glabrata 10035463 101 USH	1.882
●	Candida glabrata ATCC 2001T THL	1.736
●	Candida glabrata 31 PSB	1.728
●	Candida glabrata ATCC 90030 VML	1.384
●	Candida maltosa DSM 15531 DSM	1.136
●	Candida nivariensis RV490 Feb09 04 PSB	1.100
●	Debaryomyces hansenii DSM 70590 DSM	1.073
●	Candida glabrata DSM 70615 DSM	1.053
●	Candida dubliniensis 20 UKE	1.041
●	Candida glabrata DSM 11950 DSM	1.029

Frequente problemen

31

- “No peaks”
 - ▣ Voornamelijk bij gebruik van Sabouraud buis ipv plaat
 - ➔ Op te lossen door manueel spectra te meten.

- Mengsel van verschillende gisten
 - ▣ Moeilijk te zien in buis.
 - ▣ Geeft slechte scores op MALDI-TOF en vaak meerdere species. (vb. *C. glabrata* en *C. albicans*)
 - ➔ Overenten op ChromAgar.



Literatuur:

33

Studie	Klinische stalen	Extractieprocedure	Resultaten
Pinto et al.	Candida species (n=148)	Conventioneel	84% score $\geq$ 2.0 96% score $\geq$ 1.7
Van Herendael et al.	Diverse (n=167)	Verkort	82.8 % score $\geq$ 1.7
Dhiman et al.	Diverse (prospectief: A: n=138, retrospectief B: n=103)	Conventioneel	92.0% (A) score $\geq$ 2.0 96.3% (A) score $\geq$ 1.8 81.6% (B) score $\geq$ 2.0 84.5% (B) score $\geq$ 1.8
Hendrickx et al.	Candida para-/meta-/ orthopsilosis (n=163)	Verkort	90.7 % score $\geq$ 1.7
Stevenson et al.	44 species (n=109)	Conventioneel	89.6 % score $\geq$ 1.8
Marklein et al.	Diverse (n=267)	Conventioneel	92.5 % score $\geq$ 2.0
Van Veen et al.	12 species (n=61)	Verkort	85.2% score $\geq$ 2.0

- Validatie verkorte extractieprocedure
- Verlaagde cutoff tot $\geq$ 1.7
- Acceptatiegraad tussen 81.6% - 96.3% ~ databank

Uitbreiding databank

34

- 1^e fase: 26 getypeerde stammen
 - ▣ QC stammen
 - ▣ ATCC / IHEM stammen
 - ▣ Eigen collectie (typering ITS-FLP)

Species	Aantal
Candida albicans	1
Candida dubliniensis	1
Candida glabrata	5
Candida guilliermondii	3
Candida krusei	6
Candida parapsilosis	1
Candida tropicalis	1
Cryptococcus neoformans var. grubii	1
Cryptococcus neoformans var. neoformans	1
Geotrichum capitatum	2
Saccharomyces cerevisiae	4

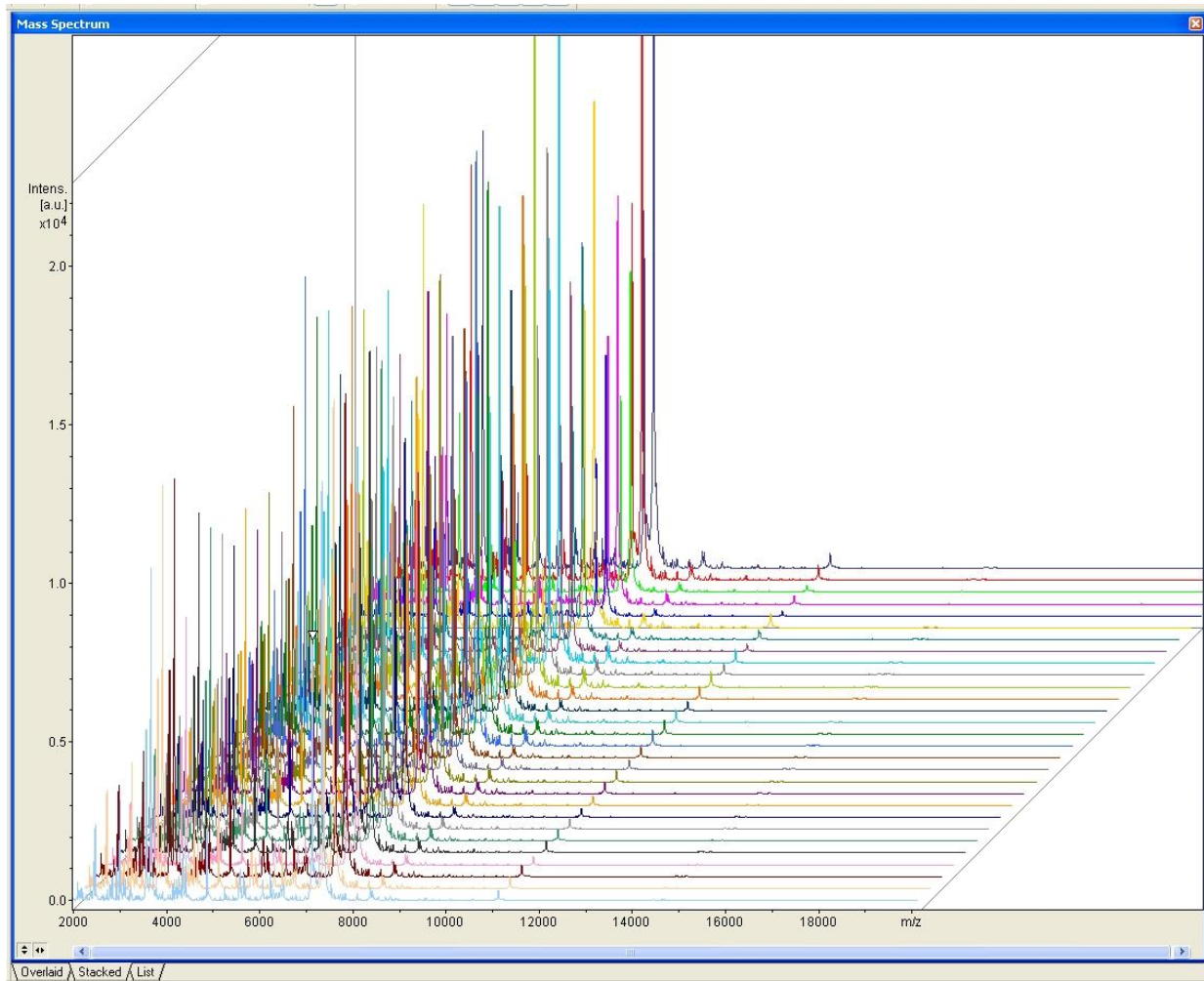
Materialen en methoden

35

1. EtOH-mierenzuur extractie (Bruker)
2. Analyse op MALDI-TOF.
 - ▣ Settings cfr. routine
 - ▣ Minimum 20x.
3. Inspectie van spectra in FlexAnalysis.
 - ▣ Eventuele verwijdering van afwijkende spectra.
 - ▣ Baseline subtraction en smoothing

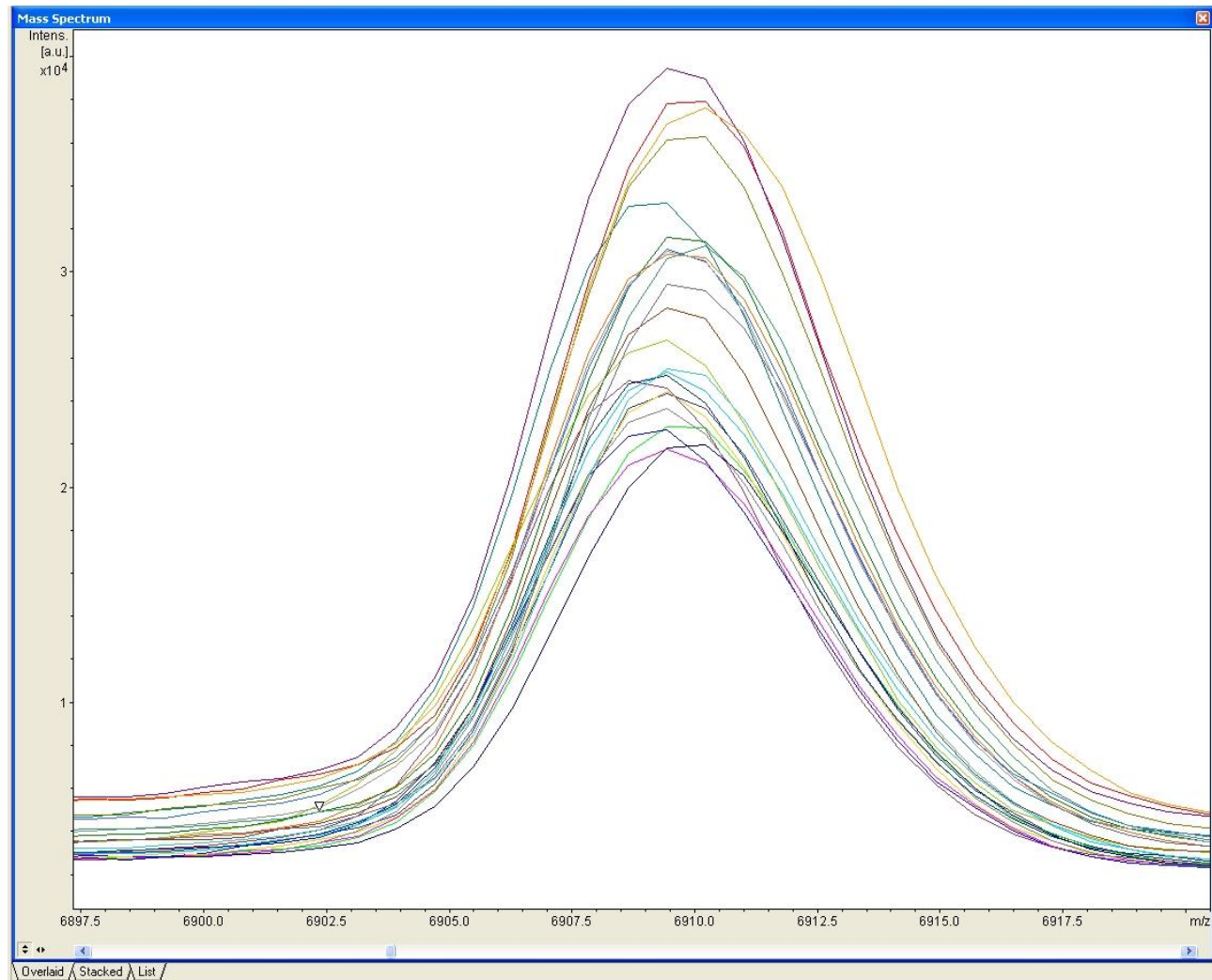
Inspectie in FlexAnalysis

36



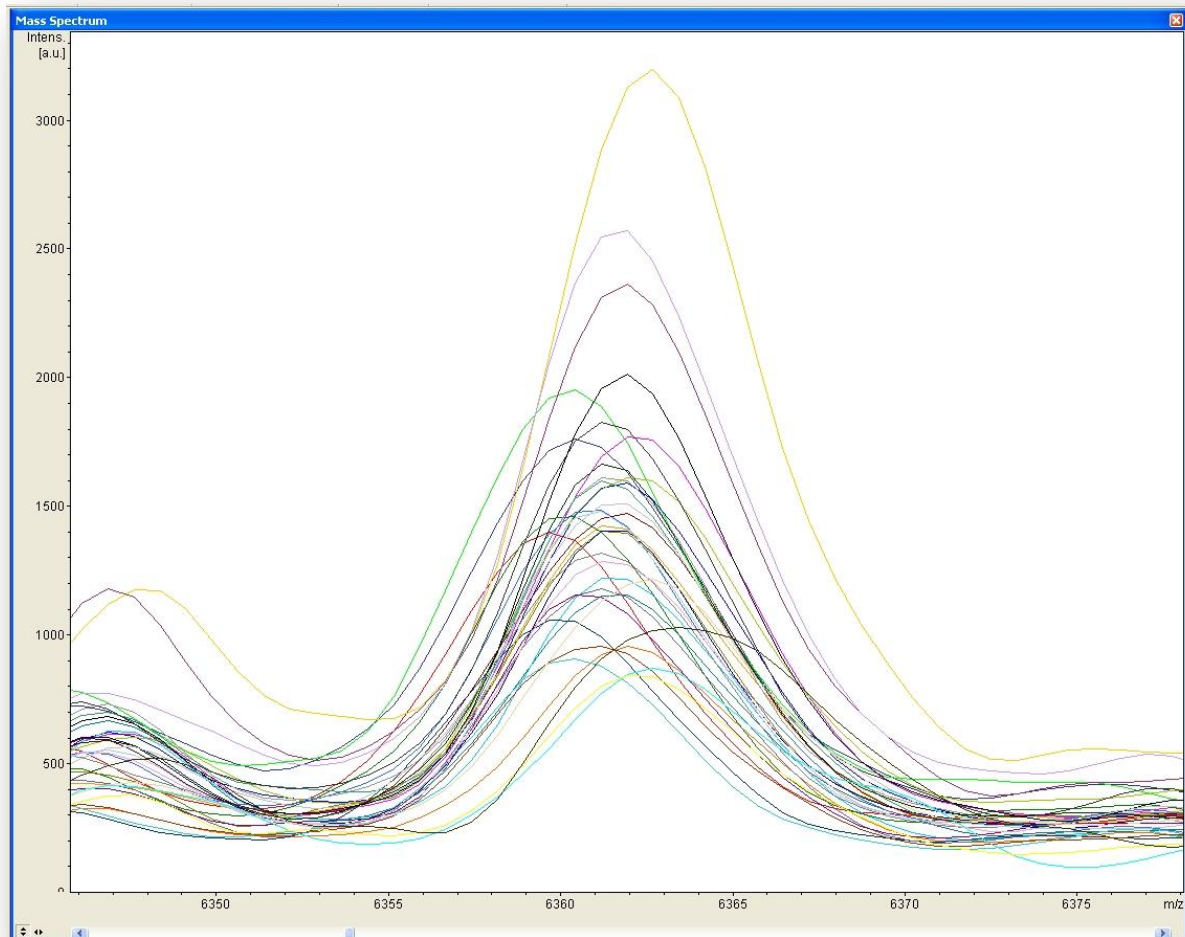
Inspectie in FlexAnalysis

37



Inspectie in FlexAnalysis

38



Materialen en methoden

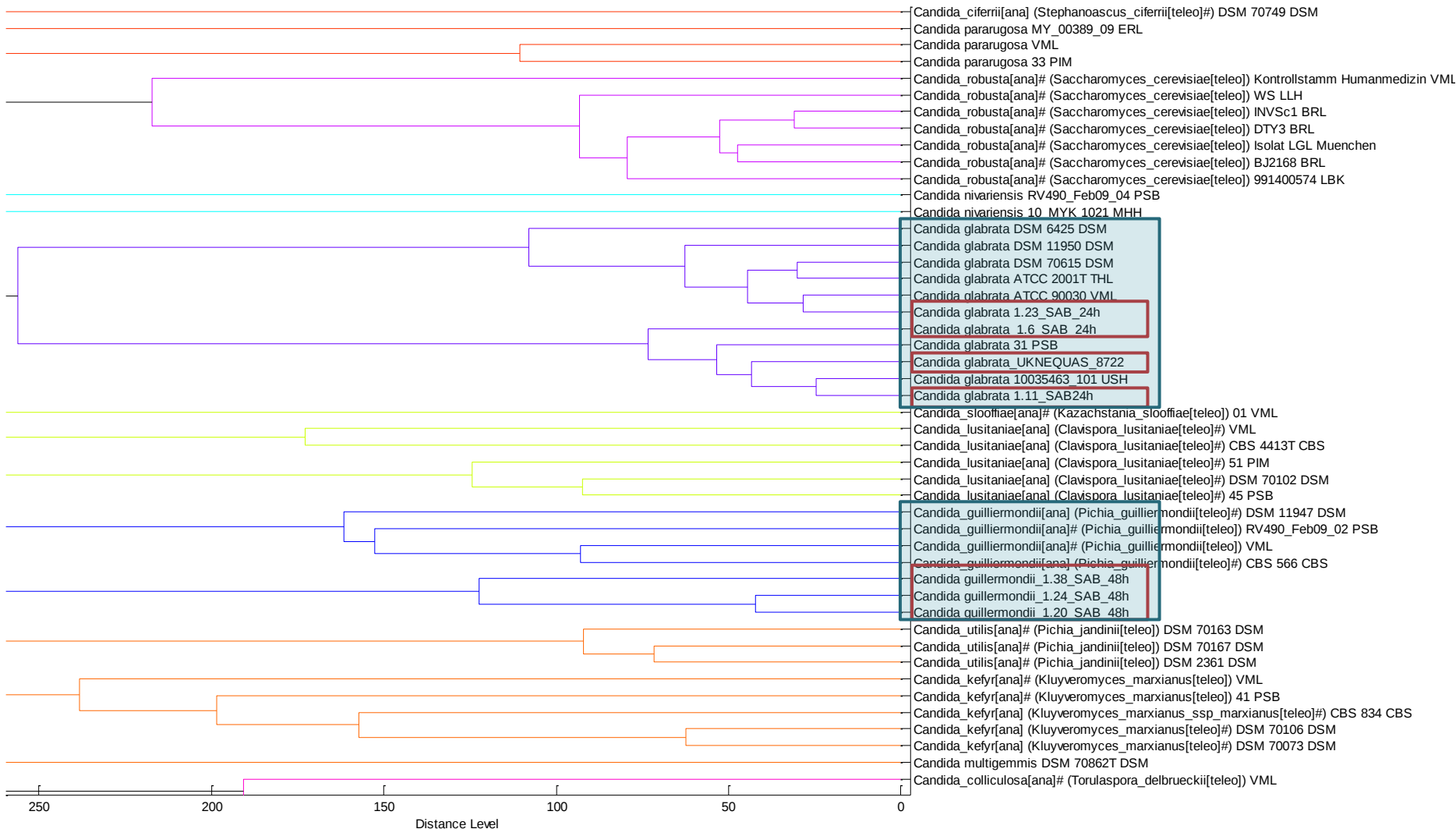
39

1. EtOH-mierenzuur extractie (Bruker)
2. Analyse op MALDI-TOF.
 - ▣ Settings cfr. routine
 - ▣ Minimum 20x.
3. Inspectie van spectra in FlexAnalysis.
 - ▣ Eventuele verwijdering van afwijkende spectra.
4. Generatie van MSP uit ten minste 20 spectra.
5. Controle
 - ▣ Analyse van gekende stammen na toevoeging nieuwe MSP's
 - ▣ Analyse dendrogram

Vergelijking eigen MSPs met Bruker MSPs.

40

MSP Dendrogram



Retrospectieve analyse

41

□ Voor uitbreiding:

N	Single-bepaling	Duplo-bepaling
396	72%	82%

□ Na uitbreiding:

N	Single-bepaling	Duplo-bepaling
396	88%	92%

□ Opvallend: **90%** van de beste scores
= **zelf toegevoegd** MSP

Frequente problemen

42

- 10x *C. albicans*, slechte score. Bij herhaling wel OK.

Detected Species	Log(Score)
 Candida albicans ATCC 10231 THL	1.604
 Candida albicans DSM 5817 DSM	1.591
 Candida albicans VA 17248 07 04 UKE	1.492
 Candida albicans DSM 6569 DSM	1.486
 Candida albicans DSM 1577 DSM	1.447
 Candida albicans DSM 1665 DSM	1.437
 Candida albicans DSM 3454 DSM	1.363
 Candida albicans DSM 6659 DSM	1.346
 Candida albicans DSM 11943 DSM	1.299
 Candida albicans DSM 11949 DSM	1.259



Detected Species	Log(Score)
 Candida albicans UKNEQUAS9162	1.791
 Candida albicans ATCC 10231 THL	1.604
 Candida albicans DSM 5817 DSM	1.591
 Candida albicans VA 17248 07 04 UKE	1.492
 Candida albicans DSM 6569 DSM	1.486
 Candida albicans DSM 1577 DSM	1.447
 Candida albicans DSM 1665 DSM	1.437
 Candida albicans DSM 3454 DSM	1.363
 Candida albicans DSM 6659 DSM	1.346
 Comamonas kerstersii DSM 16026T HAM	1.307

- 4x *C. glabrata* (5 sequentiële hits nodig voor acceptatie)

Detected Species	Log(Score)
 Candida glabrata 10035463 101 USH	1.882
 Candida glabrata ATCC 2001T THL	1.736
 Candida glabrata 31 PSB	1.728
 Candida glabrata ATCC 90030 VML	1.384
 Candida maltosa DSM 15531 DSM	1.136
 Candida nivariensis RV490 Feb09 04 PSB	1.100
 Debaryomyces hansenii DSM 70590 DSM	1.073
 Candida glabrata DSM 70615 DSM	1.053
 Candida dubliniensis 20 UKE	1.041
 Candida glabrata DSM 11950 DSM	1.029



Detected Species	Log(Score)
 Candida glabrata 1.11 SAB24h	2.203
 Candida glabrata 1.6 SAB 24h	1.952
 Candida glabrata UKNEQUAS 8722	1.938
 Candida glabrata 10035463 101 USH	1.882
 Candida glabrata ATCC 2001T THL	1.736
 Candida glabrata 31 PSB	1.728
 Candida glabrata ATCC 90030 VML	1.384
 Candida glabrata 1.23 SAB 24h	1.379
 Candida maltosa DSM 15531 DSM	1.136
 Candida nivariensis RV490 Feb09 04 PSB	1.100

Prospectieve evaluatie

43

- Periode 2 maanden
- N = 497 analyses

	N	Single-bepaling	Duplo-bepaling	Yeast_Extended beste score
Retrospectief voor uitbreiding	396	72%	82%	
Retrospectief na uitbreiding	396	88%	92%	90%

- Bevestigt resultaten uit retrospectieve studie

Vragen

44

1. Welke factoren zijn belangrijk voor een goede identificatie van gisten?
2. Evaluatie huidige procedure. Optimalisatie?
3. Welke mogelijkheden zijn er voor de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS.

Vragen

45

1. Welke factoren zijn belangrijk voor een goede identificatie van gisten?
2. Evaluatie huidige procedure. Optimalisatie?
3. Welke mogelijkheden zijn er voor de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS.

Analyse van cryptokokken

46

- Slechts 12 MSP's in Bruker databank
 - ▣ *Filobasidiella neoformans*: 4
 - ▣ *C. bacillisporus* (= *C. gattii*) : 2
 - ▣ *C. albidus*: 1
 - ▣ *C. flavus*: 1
 - ▣ *C. laurentii*: 1
 - ▣ *C. macerans*: 1
 - ▣ *C. uniguttalatus*: 2

Literatuur

47

- Pinto et al.
 - ▣ Bruker databank v3.2.1.0
 - ▣ Slechts 2/6 Cryptokokken werden geïdentificeerd.
- Stevenson et al.
 - ▣ Lage logscores met *C. neoformans*
 - ▣ Eigen databank met 22 cryptokokken
 - ▣ Identificatie 3 à 5/6 geteste stammen ($\sim CO \geq 2.0$ of 1.8)
- Dhiman et al.
 - ▣ Lagere scores voor *C. neoformans*
 - ▣ Bruker databank (v.3, n=3740)
 - ▣ Identificatie 4/6 geteste stammen (cutoff ≥ 2.0)

Pinto A. et al. PLoS One (2011) 6: p. e25712

Stevenson LG et al. J. Clin. Microbiol. (2010) 48: pp. 3482-3486.

Dhiman N et al. J. Clin. Microbiol. (2011) 49: pp. 1614-1616

Literatuur

48

- McTaggart et al.
 - ▣ Constructie eigen databank
 - ▣ 100% identificatie op speciesniveau.
 - ▣ 85/86 *C. neoformans* differentiatie tussen var. *neoformans* en var. *grubii*

<i>Cryptococcus</i>	
<i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>	ATCC ^d MYA-4564, ATCC MYA-4565
<i>C. neoformans</i> var. <i>neoformans</i>	ATCC MYA-4567
<i>C. gattii</i>	CBS ^e 6289, ATCC MYA-4561, CBS 6955, ATCC MYA-4563
<i>C. albidus</i>	ATCC 10666 ^T , NRRL ^f YB-195, NRRL YB-219, NRRL YB-253, NRRL YB-295
<i>C. laurentii</i>	ATCC 18803 ^T , NRRL YB-443, NRRL YB-449, NRRL YB-481, NRRL YB-482
<i>C. magnus</i>	NRRL Y-2537 ^T
<i>C. terreus</i>	CBS 1895 ^T , ATCC 32422, ATCC 34145, ATCC 32046
<i>C. unigutulatus</i>	JCM ^g 3685 ^T , ATCC 32048, ATCC 32047, ATCC 66033

Literatuur

49

□ Firacative et al.

Current taxonomy and classification of pathogenic *Cryptococcus* spp

Species	Varieties	Serotypes	Molecular types
<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>grubii</i>	A	VNI, VNII
	<i>neoformans</i>	D	VNIV
	—	AD ^a	VNIII
<i>Cryptococcus gattii</i>	—	B	VGI, VGII, VGIII, VGIV
	—	C	

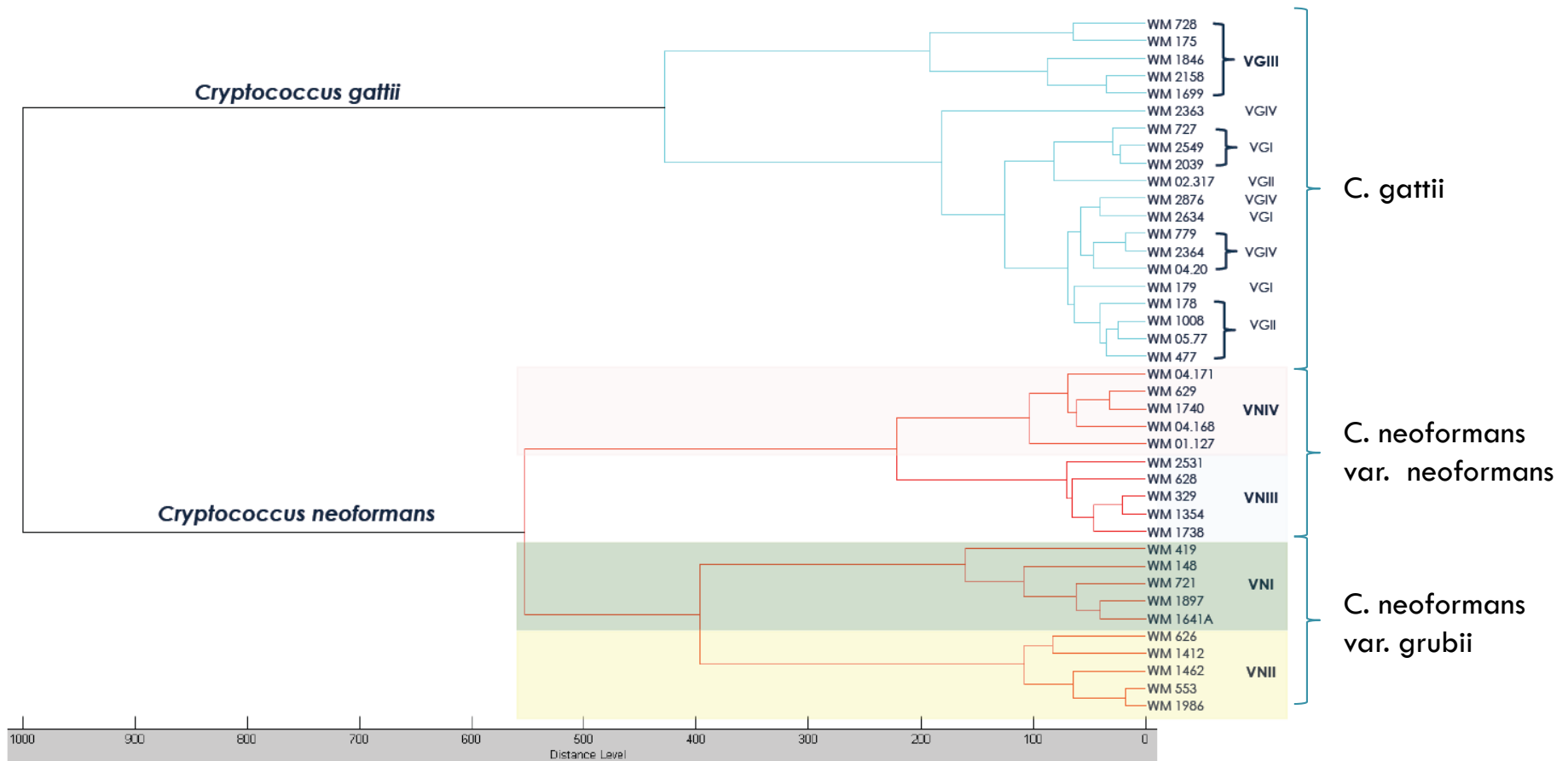
^a hybrid diploid

- Onderzoek van de 8 moleculaire types via MALDI-TOF MS.
- Databank met 5 isolaten van elk type.

Literatuur

50

□ Firacative et al.



Experimenteel: opzet

51

- Uitbreiding met extra stammen van cryptokokken:
(2 uit eigen collectie, 18 IHEM stammen)
 - ▣ *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A): 6
 - ▣ *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype D): 6
 - ▣ *C. gattii* { (serotype B): 4
(serotype C): 4

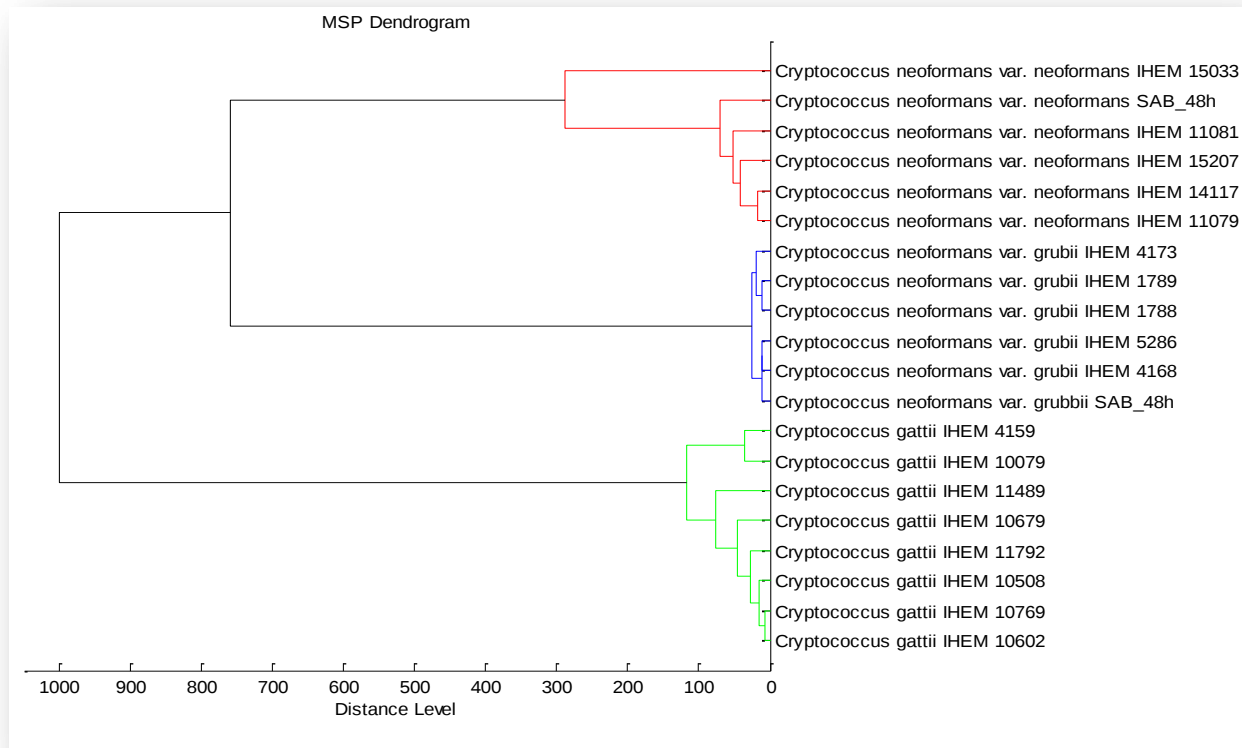
Experimenteel: resultaten

52

□ Duidelijke differentiatie

▣ *C. neoformans* vs. *C. gatti*

▣ *C. neoformans* var. *neoformans* vs. var. *grubii*



Controle met referentiestammen

53

□ Verkorte extractie:

▣ Acceptatiegraad: single: **62%** , duplo: **68%**

- Gemiddelde score: 1,860 (range 1,545 – 2,071)

- *C. neoformans* var. *grubii*

 - 8/10 analyses tonen op 4^e of 5^e plaats ander species.
(*C. gattii*, ENFC, ...)

- Beste hit slechts 1x verkeerd subspecies. Score echter < 1,7

□ Volledige extractie:

▣ Acceptatiegraad **100%**

- Gemiddelde score: 2,593 (range 2,10 - 2,744)

- Correcte ID tot op subspeciesniveau

Analyse van cryptokokken

54

- Betrouwbare differentiatie op speciesniveau mogelijk.
- Conventionele extractie beste resultaten.
- Typering op subspeciesniveau lijkt mogelijk, maar dient nog verder te worden gevalideerd.

Acties/ToDo

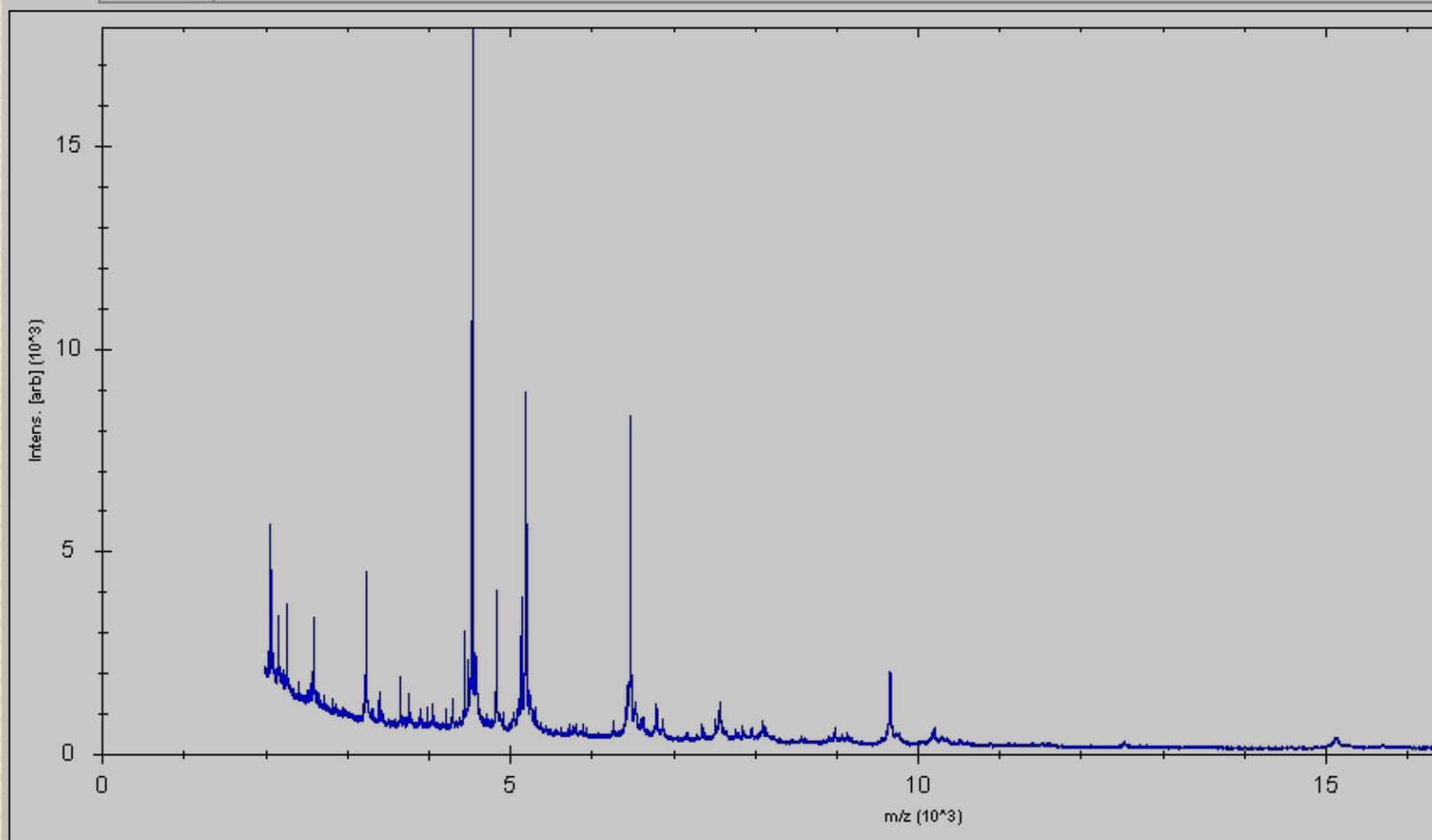
55

- Sabouraud buizen worden vertikaal bewaard.
- Verdere validatie Cryptokokkendatabank.

Take home message

56

- Verkorte extractieprocedure doorgaans goede resultaten met $\text{cutoff} \geq 1,7$.
- Manuele 'beschiëting'
- Duplobepaling + (beperkte) uitbreiding van de databank: acceptatiegraad $72 \rightarrow 92\%$.
- Identificatie cryptokokken mogelijk tot op speciesniveau. + evtl. subspeciesniveau (conventionele extractie).



57

Dank u voor uw aandacht!