

CAT Critically Appraised Topic

Titel: Identificatie van filamenteuze fungi: de waarde van MALDI-TOF MS

Auteur: Stefanie Lefever

Supervisors: Apr. A. De Bel, Dr. M. Boudewijns

Datum: 15/05/2018

CLINICAL BOTTOM LINE

Vandaag de dag worden filamenteuze fungi in de meeste routine laboratoria geïdentificeerd op basis van macroscopisch en microscopisch onderzoek van culturen. Deze methode vereist echter veel expertise en training. Bovendien kan het zeer lang duren voor de typische morfologische karakteristieken verschijnen in een cultuur. *Matrix-assisted laser desorption time-of-flight* massaspectrometrie (MALDI-TOF MS) biedt hiervoor mogelijk een oplossing. De identificatie gebeurt aan de hand van ribosomale proteïnen die na een extractieprocedure worden vrijgezet uit de fungale cel. In deze studie werd het Vitek MS systeem (bioMérieux) gebruikt voor de identificatie van dermatofyten en andere filamenteuze fungi. Er werd gebruik gemaakt van twee databases: de Vitek MS database v3.0 en het MSI platform (online database van Universiteit van Marseille en in samenwerking met BCCM/IHEM). De bekomen identificatiepercentages waren 59.0% voor de Vitek MS v3.0 en 85.9% voor het MSI platform. Dit volstond echter niet om deze als enige methode in te voeren in het labo van AZ Groeninge. MALDI-TOF MS kan wel een nuttige aanvulling zijn bij het klassieke microscopisch onderzoek.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het belang van zowel oppervlakkige als diepe mycosen in de klinische microbiologie is de laatste jaren sterk toegenomen.^[1] Enerzijds is de toename van het aantal diepe mycosen te wijten aan het stijgend aantal immuungecompromitteerde patiënten, ten gevolge van o.a. immunosuppressieve behandelingen of ten gevolge van het grote aantal HIV-patiënten. Voor deze kwetsbare patiënten is een snelle diagnostiek uiterst belangrijk.^[1]

Anderzijds werd ook een stijgende prevalentie van oppervlakkige mycosen, en in het bijzonder onychomycosen, gerapporteerd in de algemene populatie.^[1] Speciesidentificatie bij dermatofyten kan belangrijk zijn voor de bepaling van de behandeling en omwille van epidemiologische redenen (aantonen van de oorzakelijke bron van infectie).^[2]

Traditioneel worden filamenteuze fungi in de meeste routine laboratoria geïdentificeerd via macroscopisch en microscopisch onderzoek van culturen.^[3] Om een accurate identificatie te bekomen moeten de schimmels voldoende tijd krijgen om te groeien. Deze tijd varieert tussen drie tot veertien dagen, maar in het algemeen wordt aangeraden om fungale culturen tot vier weken te incuberen vooraleer ze als definitief negatief kunnen beschouwd worden.^[4,5] Om dimorfe fungi te kweken kan het zelfs drie tot zes weken duren vooraleer groei waarneembaar is.^[6] Anderzijds is de identificatie sterk afhankelijk van de training en ervaring van de onderzoeker.^[3] Bovendien is de kans om ervaring te ontwikkelen en onderhouden lager in een minder groot laboratorium gezien het gering aantal positieve stalen. Daarnaast kunnen bepaalde species morfologisch gelijkend zijn, maar genetisch en pathologisch verschillend zijn en verschillende antifungale gevoeligheid vertonen.^[3]

DNA sequencing wordt gezien als de gouden standaard voor de identificatie van schimmels.^[7] Deze methode is echter duur en arbeidsintensief, en bijgevolg niet praktisch in een routine klinische setting. Daarnaast gebeurt *DNA sequencing* in verschillende stappen waardoor er een hoog risico is op contaminatie uit de omgeving. De wijd verspreide implementatie van *matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry* (MALDI-TOF MS) in het routine laboratorium biedt mogelijk een oplossing. Voor de identificatie van bacteriën en gisten is het een reproduceerbare en accurate methode gebleken.^[7] In deze CAT wordt onderzocht of het mogelijk is om MALDI-TOF MS als primaire methode te gebruiken voor de identificatie van filamenteuze fungi in een routine klinische setting.

QUESTION(S)

- 1) Welke zijn de huidige methoden voor identificatie van filamenteuze fungi?
- 2) Welke zijn de huidige hindernissen bij de identificatie van filamenteuze fungi via MALDI-TOF MS?
- 3) Wat is het belang van de referentiedatabase?
- 4) Wat is de epidemiologie van fungi in België?
- 5) Kan MALDI-TOF MS de huidige werkwijze voor de identificatie van filamenteuze fungi verbeteren en/of versnellen in een routine laboratorium? Aanpassing werkwijze AZ Groeninge.

SEARCH TERMS

- 1) *MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization", "Fungi"*
- 2) *PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters ("fungi" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization", "filamentous fungi" + "identification" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" , "dermatophytes" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization", "filamentous fungi" + "epidemiology", "dermatophytes" + "epidemiology")*
- 3) *Pubmed (Medline; from 1966), "fungi" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization", "filamentous fungi" + "identification" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" , "dermatophytes" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization", "dermatophytes" + "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization" + "identification")*
- 4) *Website NRC: 'Mycosis'*

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- [1] Hayette M, Sacheli R. Rapport d'activité 2015. Cent Référence Mycoses 2016;1–24.
- [2] Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes - A polyphasic approach. *Mycopathologia* 2008;166:239–56.
- [3] Rychert J, Slechta ES, Barker AP, Miranda E, Babady NE, Tang Y-W, et al. Multi-Center Evaluation of the VITEK MS v3.0 System for the Identification of Filamentous Fungi. *J Clin Microbiol* 2017;JCM.01353-17.
- [4] Pihet M, Govic Y Le. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia* 2016;182:1–12.
- [5] Leber A. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2016.
- [6] Willinger B. Culture-Based Techniques. *Hum. Fungal Pathog. Identification*, 2017, p. 195–207.
- [7] Becker PT, De Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: Clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol* 2014;52:826–34.
- [8] Jorgensen JH, Pfaller MA, Carroll KC, Landry ML, Funke G, Richter SS, et al. *Manual of Clinical Microbiology*. vol. 2. 11th ed. Washington: American Society for Microbiology; 2015.
- [9] Van Eldere J, Verhaegen J, Lagrou K. *Medische mycologie. Handb. Mycol. en Parasitol.* 1st ed., Leuven: 2011, p. 11–46.
- [10] Lass-Flörl C. Current Challenges in the Diagnosis of Fungal Infections. *Hum. Fungal Pathog. Identification*, 2017, p. 3–17.
- [11] Schelenz S, Barnes RA, Barton RC, Cleverley JR, Lucas SB, Kibbler CC, et al. British Society for Medical Mycology best practice recommendations for the diagnosis of serious fungal diseases. *Lancet Infect Dis* 2015;15:461–74.
- [12] Brown GD, Denning DW, Gow NAR, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: Human fungal infections. *Sci Transl Med* 2012;4:1–10.
- [13] Blyth CC, Gilroy NM, Guy SD, Chambers ST, Cheong EY, Gottlieb T, et al. Consensus guidelines for the treatment of invasive mould infections in haematological malignancy and haemopoietic stem cell transplantation, 2014. *Intern Med J* 2014;44:1333–49.
- [14] Sharma C, Chowdhary A. Molecular bases of antifungal resistance in filamentous fungi. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50:607–16.
- [15] Arenas R, del Rocio Reyes-Montes M, Durarte-Escalante E, Guadalupe Frias-De-Leon M, Martinez-Herrera E. Dermatophytes and Dermatophytosis. In: Mora-Montes HM, Lopes-Bezerra LM, editors. *Curr. Prog. Med. Mycol.*, Springer International; 2017, p. 381–425.
- [16] Larone DH. *Medically important fungi*. 5th ed. Washington: American Society for Microbiology; 2011.
- [17] L'Ollivier C, Ranque S. MALDI-TOF-Based Dermatophyte Identification. *Mycopathologia* 2017;182:183–92.
- [18] Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: A fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:547–603.
- [19] Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 2006;5:1705–12.
- [20] Ramanan P, Wengenack NL, Theel ES. Laboratory Diagnostics for Fungal Infections: A Review of Current and Future Diagnostic Assays. *Clin Chest Med* 2017;38:535–54.
- [21] Bader O. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 2013;13:788–99.
- [22] De Hoog GS, Chaturvedi V, Denning DW, Dyer PS, Frisvad JC, Geiser D, et al. Name changes in medically important fungi and their implications for clinical practice. *J Clin Microbiol* 2015;53:1056–62.
- [23] Vermeulen E, Maertens J, De Bel A, Nulens E, Boelens J, Surmont I, et al. Nationwide surveillance of azole resistance in *Aspergillus* diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:4569–76.
- [24] Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009;9:789–95. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70265-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70265-8).

- [25] Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Rossi A. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 2008;166:369–83.
- [26] Ghannoum M. Azole Resistance in Dermatophytes: Prevalence and Mechanism of Action. *J Am Pod Med Assoc* 2016;106:79–86.
- [27] Cassagne C, Normand AC, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* 2016;59:678–90.
- [28] MALDI Biotyper CA system: Clinical Application for Identification of Microorganisms 2014.
- [29] Mutating AM. Just Do It with a MALDI! *IAFP Eur* 2017.
- [30] bioMerieux Inc. Make your routine extraordinary ... The newest component. Brochure 2014.
- [31] Theel ES, Hall L, Mandrekar J, Wengenack NL. Dermatophyte identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011;49:4067–71.
- [32] L'Ollivier C, Cassagne C, Normand AC, Bouchara JP, Contet-Audonneau N, Hendrickx M, et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Med Mycol* 2013;51:713–20.
- [33] De Respinis S, Monnin V, Girard V, Welker M, Arsac M, Cellière B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using the Vitek MS system for rapid and accurate identification of dermatophytes on solid cultures. *J Clin Microbiol* 2014;52:4286–92.
- [34] Longrong Z, Yongquan C, Yuanhong X. Performance of VITEK mass spectrometry V3 . 0 for rapid identification of clinical *Aspergillus fumigatus* in different culture conditions based on ribosomal proteins. *Infect Drug Resist* 2017:499–506.
- [35] Packeu A, De Bel A, L'Ollivier C, Ranque S, Detandt M, Hendrickx M. Fast and accurate identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: Validation in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52:3440–3.
- [36] Coulibaly O, Marinach-Patrice C, Cassagne C, Piarroux R, Mazier D, Ranque S. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycol* 2011;49:621–6.
- [37] Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Mould Routine Identification in the Clinical Laboratory by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS One* 2011;6:e28425.
- [38] Lau AF, Drake SK, Calhoun LB, Henderson CM, Zelazny AM. Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-Time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51:828–34.
- [39] Bader O. Fungal Species Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Hum. Fungal Pathog. Identification*, 2017, p. 323–37.
- [40] De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:475–84.
- [41] Sanguinetti M, Posteraro B. Identification of Molds by Matrix- Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2017;55:369–79. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5277505/>.
- [42] Normand AC, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiol* 2013;13.
- [43] Biotyper M. MBT Filamentous Fungi Library. Bruker Daltonik GmbH 2018.
- [44] Hendrickx M. <http://bccm.belspo.be/about-us/bccm-ihem> n.d.
- [45] Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol* 2017;17:1–17.
- [46] Sacheli R, Darfouf R, Adjety C, Pateet S, Lagrou K, Hayette M-P. A 5-year survey of dermatophytosis in Belgium. *8th Trends Epidemiol.*, vol. 1, 2017, p. 1. <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=72057031>.
- [47] Packeu A, Hendrickx M, Beguin H, Martiny D, Vandenberg O, Detandt M. Identification of the *Trichophyton mentagrophytes* complex species using MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Mycol* 2013;51:580–5.

- [48] Lagrou K, Maertens J, Van Even E, Denning DW. Burden of serious fungal infections in Belgium. *Mycoses* 2015;58:1–5.
- [49] Saegeman V, Maertens J, Meersseman W, Spriet I, Verbeken E, Lagrou K. Increasing incidence of Mucormycosis in university hospital, Belgium. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1456–8.
- [50] Hermans F, Ombelet S, Degezelle K, Testelmans D, Van Raemdonck DE, Verleden GM, et al. First-in-man observation of *Talaromyces marneffei*-transmission by organ transplantation. *Mycoses* 2017;60:213–7.
- [51] Meensel B Van, Laere E De, Dedeurwaerdere F, Vets B, Frans J. BILATERAL ADRENAL MASSES AS THE SOLE CLINICAL KEY FOR DIAGNOSING A HISTOPLASMA CAPSULATUM INFECTION Case reports BILATERAL ADRENAL MASSES AS THE SOLE CLINICAL KEY FOR DIAGNOSING A 2014;3286:2–6.
- [52] BCCM/IHEM. MALDI-TOF MS identification of fungi. 2018.
- [53] bioMerieux Inc. Vitek MS v3.0 Knowledge Base, 2016.
- [54] Clark RB, Lewinski MA, Loeffelholz MJ, Tibbetts RJ. Verification and Validation of Procedures in the Clinical Microbiology Laboratory. In: Sharp SE, editor. Cumitech, Washington: American Society for Microbiology; 2009, p. 1–26.
- [55] Susceptibility A, Systems T. M52 Verification of Commercial Microbial Identification and Antimicrobial Susceptibility. 2015.
- [56] Huang Y, Zhang M, Zhu M, Wang M, Sun Y, Gu H, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for the identification of clinical filamentous fungi. *World J Microbiol Biotechnol* 2017;33:1–7.
- [57] De Respinis S, Tonolla M, Pranghofer S, Petrini L, Petrini O, Bosshard PP. Identification of dermatophytes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycol* 2013;51:514–21.
- [58] Nenoff P, Erhard M, Simon JC, Muylowa GK, Herrmann J, Rataj W, et al. MALDI-TOF mass spectrometry - A rapid method for the identification of dermatophyte species. *Med Mycol* 2013;51:17–24.
- [59] Karabıçak N, Karatuna O, İlkit M, Akyar I. Evaluation of the Bruker Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) System for the Identification of Clinically Important Dermatophyte Species. *Mycopathologia* 2015;180:165–71.
- [60] Schulthess B, Ledermann R, Mouttet F, Zbinden A, Bloemberg G V., B?ttger EC, et al. Use of the Bruker MALDI Biotyper for identification of molds in the clinical mycology laboratory. *J Clin Microbiol* 2014;52:2797–803.
- [61] Park JH, Shin JH, Choi MJ, Choi JU, Park YJ, Jang SJ, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of 345 clinical isolates of *Aspergillus* species from 11 Korean hospitals: comparison with molecular identification. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;87:28–31.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.012>.
- [62] Shao J, Wan Z, Li R, Yu J. Species identification and delineation of pathogenic Mucorales by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2018;JCM.01886-17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29436422>.

INLEIDING

CLASSIFICATIE VAN FUNGI

Fungi zijn eukaryote micro-organismen.^[8] Ze worden omgeven door een celwand die opgebouwd is uit microfibrillen (hoofdzakelijk chitine en β -glucanen) die ingebed zijn in een matrix (bestaande uit o.a. mannanen).^[9] Traditioneel worden fungi onderverdeeld in gisten, dimorfe fungi en filamenteuze fungi (schimmels).^[8] Gisten komen voor als unicellulaire micro-organismen en planten zich voort door middel van knopvorming. Filamenteuze fungi of schimmels zijn multicellulair en opgebouwd uit vertakte draden, hyfen genoemd.^[9] Hyfen verlengen door apicale groei met mitotische celdeling. Ten slotte zijn er de dimorfe fungi.^[8] Bij kamertemperatuur en in de omgeving komen ze voor als schimmel, maar bij weefselinvasie of bij kweek op een rijke bodem boven 35°C komen ze voor in de gistfase.^[8,9]

BELANG FUNGALE INFECTIES

De laatste jaren is het belang van invasieve fungale infecties (opportunistische mycosen) in de gezondheidszorg zeer sterk toegenomen.^[1] Vandaag de dag worden ongeveer 10% van de nosocomiale infecties veroorzaakt door fungi.^[10] De toename van invasieve fungale infecties is enerzijds te wijten aan het stijgend aantal immuungecompromitteerde patiënten (transplant- en kankerpatiënten, HIV-patiënten).^[11] Anderzijds komen invasieve fungale infecties ook voor bij patiënten opgenomen op de dienst intensieve zorgen of bij mensen met chronische (long)ziekten. De morbiditeit en mortaliteit van invasieve fungale infecties is hoog ondanks de opkomst van nieuwe antifungale middelen.^[11] De uitkomst van een fungale infectie is zeer sterk afhankelijk van een snelle diagnose gekoppeld aan de snelle start van een antifungale behandeling.^[12] Identificatie tot op het species niveau is noodzakelijk want op basis hiervan kan de gevoeligheid of resistentie aan bepaalde antifungale middelen reeds voorspeld worden, nog voor een echte resistentiebepaling uitgevoerd werd.^[13,14] Het is dus van belang om de oorzakelijke micro-organismen zo snel en betrouwbaar mogelijk te identificeren.

Ook de prevalentie van oppervlakkige mycosen stijgt en in het bijzonder van onychomycosen.^[1] Ongeveer 15 tot 20% van de algemene populatie is geïnfecteerd met een dermatofyt.^[15] Oppervlakkige mycosen worden veroorzaakt door dermatofyten, die keratine kunnen afbreken en dit als groeisubstraat kunnen gebruiken.^[9] Er worden drie genera onderscheiden binnen de groep van de dermatofyten: *Trichophyton*, *Microsporum* en *Epidermophyton*.^[9] Species identificatie bij dermatofyten is belangrijk omwille van verschillende redenen.^[2] Ten eerste omwille van epidemiologische omstandigheden en het risico op reïnfectie. Door identificatie van het species kan vaak de oorzakelijke bron van infectie (bv. een dier) aangetoond worden. Ten tweede kunnen de behandelingsschema's (bv. de duur) verschillen afhankelijk van het species. Ten derde kunnen ook andere non-dermatofyten de oorzaak zijn van onychomycosen. Deze species reageren niet op klassieke therapie tegen dermatofyten en dus is identificatie essentieel voor de juiste therapie. Bovendien wordt klassiek geen antifungale gevoeligheidsbepaling uitgevoerd voor dermatofyten.

1. WELKE ZIJN DE HUIDIGE METHODEN VOOR IDENTIFICATIE VAN FILAMENTEUZE FUNGI?

1.1 CULTUUR

Cultuur is de gouden standaard voor de diagnose van mycosen.^[10] Zo kan het oorzakelijk micro-organisme geïdentificeerd worden en is het mogelijk om een antifungale gevoeligheidsbepaling uit te voeren (niet standaard uitgevoerd voor dermatofyten). Cultuur van fungi kan echter zeer lang duren en soms weinig sensitief zijn.^[4,6] Hoewel de meeste filamenteuze fungi groeien op een gewone bloedagar, worden meestal specifieke media gebruikt.^[6] Een veel gebruikt medium is een Sabouraud agar met gentamicine en chlooramfenicol (SGC agar) om overgroei van aanwezige bacteriën te verhinderen.^[6] Cycloheximide (SGCc) kan toegevoegd worden om overgroei van snelgroeiende saprofyten tegen te gaan zodat trage groeiers ook de kans krijgen om te groeien.^[6] Meestal worden schimmelculturen geïncubeerd bij 30°C.^[5,6,8] Er wordt aangeraden om de culturen vier weken te incuberen, zeker voor dermatofyten.^[4,5] Om dimorfe fungi te kweken kan het zelfs drie tot zes weken duren vooraleer groei waarneembaar is.^[6]

1.2 IDENTIFICATIE

Identificatie van filamenteuze fungi berust in de meeste laboratoria op beoordeling van de macroscopische en microscopische morfologie.^[6] Er worden kleuringen gebruikt om fungale elementen beter te visualiseren, zoals lactofenolblauw.^[16] Accurate identificatie vereist expertise en training.^[4,17] Verschillende morfologische criteria worden gehanteerd, zoals grootte en pigmentatie van de kolonies, de vorm van *macroconidia* en *microconidia*, groeisnelheid, etc.^[15] Het aantal criteria is echter gelimiteerd en deze moeten beoordeeld worden tijdens specifieke groeistadia. Het uitzicht van de groei kan zeer sterk variëren. Ook is het mogelijk dat bepaalde karakteristieken verdwijnen bij overenting wat leidt tot witte kolonies die hun capaciteit om te sporuleren verloren zijn.^[15] Bovendien wordt identificatie gecompliceerd omdat veel species morfologisch gelijkaardig zijn, maar genetisch verschillend, verschillend in hun pathogeen vermogen of in hun antifungale gevoeligheid.^[3,17,18] Zelfs in ervaren laboratoria kunnen verkeerde identificaties gerapporteerd worden.^[19]

DNA sequencing wordt beschouwd als de gouden standaard voor de identificatie van fungi.^[7] Deze methode is echter duur en zeer arbeidsintensief. Bovendien is er hoog risico op contaminatie vanuit de omgeving gezien het proces in verschillende stappen gebeurt. *DNA sequencing* kan wel een belangrijke aanvulling zijn, aangezien het lang kan duren voor de morfologische karakteristieken voldoende ontwikkeld zijn voor identificatie.^[20] Het meest gebruikte doelwit voor *DNA sequencing* is de *internal transcribed spacer* (ITS) van de rRNA regio.^[20] Deze regio heeft het beste vermogen om een onderscheid te maken tussen de verschillende species. Voor sommige species volstaat het echter niet om één doelwit te gebruiken. In deze gevallen kan het nuttig zijn om doelgericht extra *targets* te gebruiken voor species identificatie, zoals β -tubuline of elongatiefactor 1 α .^[7,21]

In het laatste decennium is *matrix-assisted laser desorption time-of-flight* massaspectrometrie (MALDI-TOF MS) aan een opmars bezig voor de identificatie van micro-organismen in klinische laboratoria.^[18]

Voor gisten en bacteriën is deze methode al wijd verspreid en is het een reproduceerbare en accurate methode gebleken.^[7] Ook naar de toepassing van MALDI-TOF MS voor de identificatie van filamenteuze fungi is al veel onderzoek verricht (**zie verder**). Deze methode zou zeker een meerwaarde kunnen bieden voor de snelle en accurate identificatie van filamenteuze fungi.

1.3 TAXONOMIE

Door de recente opkomst van moleculaire methoden neemt de kennis over de moleculaire fylogenie van medisch belangrijke schimmels en gisten toe.^[22] Polymorfe hogere fungi hebben historisch meerdere namen om hun seksuele (teleomorfe) en asexuele (anamorfe) stadia te benoemen. Vroeger was het moeilijk om de genetische verwantschap tussen deze verschillende stadia aan te tonen, maar dankzij de nieuwe moleculair genetische benaderingen is dit dubbele naamsysteem obsoleet geworden. De belangrijkste criteria voor classificatie zijn nu genotypisch in plaats van fenotypisch. Hierdoor dringen grote veranderingen in de nomenclatuur zich op en momenteel zitten we in de transitiefase. Zowel op genus- als op speciesniveau zijn er continue veranderingen.

Hoe juist om te gaan met deze veranderingen in dagelijkse klinische praktijk is een moeilijk vraagstuk. De Hoog *et al.* (2015) probeerden een antwoord te formuleren voor dit probleem.^[22] Op het niveau van het genus wordt aangeraden om momenteel een afwachtende houding aan te nemen in de klinische praktijk tot meer data beschikbaar zijn en meer consensus bereikt wordt, maar dit wel met zeer nauwe opvolging.

Op het niveau van het species worden door taxonomische studies voornamelijk *sibling* species (gemeenschappelijke voorouder) en *cryptic* species (genetisch verschillend, maar morfologisch gelijk) gedefinieerd.^[22] Verschillen kunnen taxonomisch en wetenschappelijk relevant zijn, doch klinisch niet altijd relevant. *Sibling* en *cryptic* species die identiek zijn voor de behandeling van patiënten, mogen voorlopig gegroepeerd en benoemd worden in 'complexen' tot meer data beschikbaar zijn over de mogelijke klinische relevantie van dit taxonomische onderscheid. Een complex is een cluster van *cryptic* species met identieke klinische relevantie.

Wanneer echter nieuwe species erkend worden die klinische relevante verschillen (virulentie, antifungale gevoeligheid) vertonen, moet de nieuwe benaming snel ingevoerd worden.^[22] Een voorbeeld hiervan is *Scedosporium aurantiacum*. Dit species hoorde vroeger bij *Scedosporium apiospermum* maar werd recent erkend als gescheiden species en is significant minder gevoelig aan antifungale middelen dan het oorspronkelijke species.

1.4 RESISTENTIE

De identificatie van filamenteuze fungi tot op species niveau kan richtinggevend zijn voor de empirische therapie van fungale infecties, omdat bepaalde species intrinsiek minder gevoelig of resistent zijn aan bepaalde antifungale middelen.^[14] De laatste jaren wordt meer verworven resistentie beschreven. Daarom kan het in bepaalde context, naast een correcte species identificatie, aangewezen

zijn om een antifungale gevoeligheidsbepaling uit te voeren. In de literatuur is reeds veel beschreven over de resistentie van filamenteuze fungi die invasieve infecties veroorzaken. De prevalentie van azoleresistentie in België bij *Aspergillus* species was 5.5% in een rapport uit 2015.^[23] Dit zou deels te wijten zijn aan het azole-gebruik in de landbouw.^[24] Ook zou het gebruik van profylaxe met antifungale middelen geleid hebben tot de opkomst van zeldzamere en resistentere fungi.^[14]

Bij dermatofyten is het onderzoek naar resistentie(mechanismen) minder uitgebreid omwille van de minder levensbedreigende aard van deze infecties. Resistentie bij dermatofyten werd wel beschreven en zou te wijten zijn aan meer dan één mechanisme.^[25] In een recente studie uit 2016 werd wel een wereldwijde azoleresistentie van 19% gerapporteerd onder de dermatofyten.^[26]

ANTWOORD OP VRAAG 1

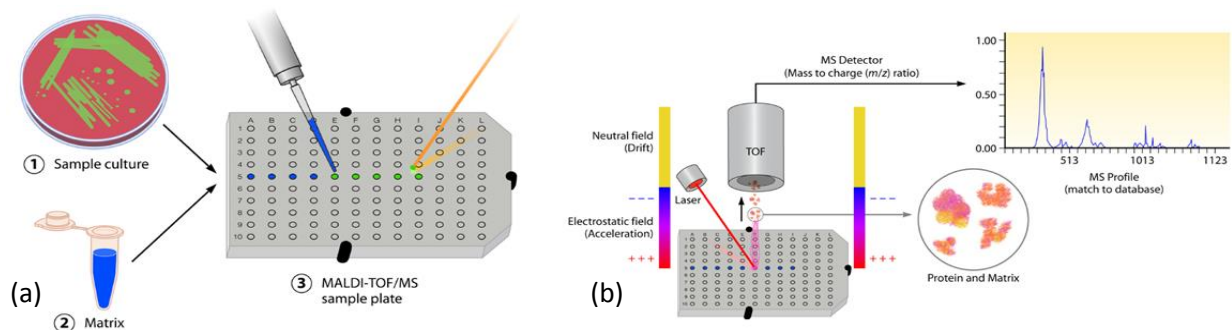
In de meeste klinische laboratoria worden filamenteuze fungi (gekweekt in cultuur) geïdentificeerd met behulp van macroscopisch en microscopisch onderzoek. Deze methode vereist echter veel tijd, expertise en training. Bovendien is het aantal morfologische criteria beperkt en kan het uitzicht van de groei zeer sterk variëren. De gouden standaard voor fungale identificatie is *DNA sequencing*. Deze techniek is echter te duur en arbeidsintensief voor een routine klinische laboratorium. De opkomst van MALDI-TOF MS biedt een aantrekkelijk alternatief. Door de opkomst van de moleculaire methoden en de bijhorende expansie van het aantal erkende species, wordt het bovendien meer en meer relevant om andere technieken dan morfologische karakterisering te gebruiken.

2. WELKE ZIJN DE HUIDIGE HINDERNISSEN BIJ DE IDENTIFICATIE VAN FILAMENTEUZE FUNGI VIA MALDI-TOF MS?

2.1 BESCHRIJVING VAN MALDI-TOF MS

In 1987 werd *matrix-assisted laser desorption ionization* (MALDI) voor het eerst geïntroduceerd als een zachte ionisatietechniek.^[18] MALDI liet toe om grote biomoleculen zoals ribosomale proteïnen te analyseren, wat essentieel was voor identificatie van micro-organismen. Bij identificatie van micro-organismen wordt een kolonie gespot op een metalen targetplaatje (**figuur 2.1**). Deze spot wordt vervolgens bedekt met matrix, een gesatureerde oplossing van een organische component met lage massa. Bij het drogen treedt co-kristallisatie van de matrix en het staal op. Vervolgens wordt het spotje, bestaande uit matrix en staal, bestraald met een UV-lasterstraal. De matrix absorbeert de laserenergie waardoor gecontroleerde ionisatie kan plaatsvinden. Door interactie tussen de laserfotonen en de matrixmoleculen zal de matrix sublimeren met vorming van een pluim, gevolgd door ionisatie van het staal (protonen worden hiervoor aangeleverd door de matrix).

De gevormde ionen bewegen doorheen de *time of flight* (TOF)-tube tot aan de detector. De tijd die ze hiervoor nodig hebben, wordt gemeten en is recht evenredig met de massa over ladingsverhouding (m/z). Er wordt een spectrum gegenereerd waarbij de relatieve intensiteit van voorkomen van de ionen wordt uitgezet in functie van hun m/z .^[17] Het gegenereerde spectrum wordt vergeleken met alle referentiespectra aanwezig in de database. Indien een match met voldoende overeenkomst gevonden wordt, leidt dit uiteindelijk tot identificatie van het micro-organisme.

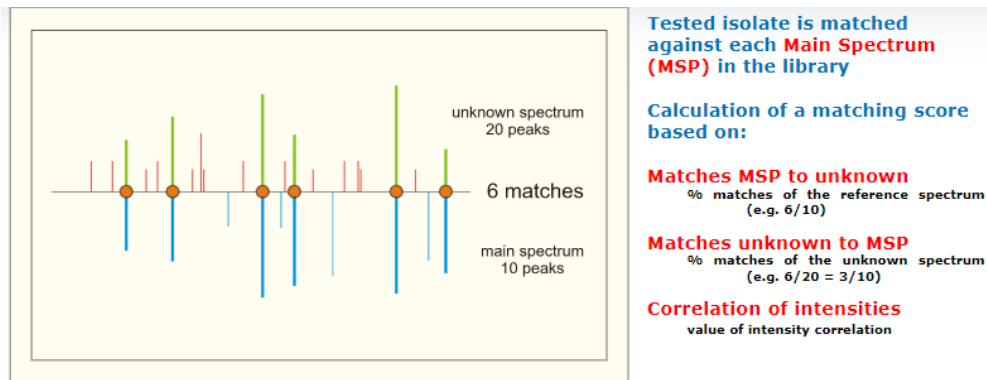


Figuur 2.1: Schematische voorstelling van MALDI-TOF MS. (uit Clark *et al.*, Clin Microbiol Rev., 2013, 26 (3),547-603)^[18] (a) Intacte cel methode: Bacteriële/ fungale groei wordt geïsoleerd uit een cultuur en aangebracht op het testplaatje. De stalen worden bedekt met matrix en gedroogd. Het plaatje wordt in het MALDI-TOF MS instrument geladen. (b) De spot wordt bestraald met de laser wat leidt tot sublimatie en ionisatie van het staal en de matrix. In de TOF-buis worden de ionen gescheiden op basis van hun massa over ladingsverhouding (m/z). Vervolgens wordt een spectrale representatie van deze ionen gegenereerd en geanalyseerd door de software, wat resulteert in een MS profiel. Dit spectrum wordt vergeleken met een database van referentiespectra, wat uiteindelijk leidt tot de identificatie van het organisme in het staal.

2.2 BESCHIKBARE MALDI-TOF MS INSTRUMENTEN IN BELGIË

In België zijn twee belangrijke MALDI-TOF MS systemen op de markt: de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Duitsland) en de Vitek MS (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrijk).^[27] De systemen verschillen voornamelijk in de manier waarop referentiemassaspectra (RMS) gecreëerd worden, de vergelijking van een onbekend spectrum met de referentiedatabase en de samenstelling van de referentiedatabase.

In de database van de MALDI Biotyper komen de referenties voor als een *main spectrum* (MSP).^[28] Een MSP bestaat uit de meest voorkomende pieken in de set van ruwe spectra (± 20 per unieke stam).^[27] De pieken worden gekarakteriseerd door hun gemiddelde massa en intensiteit. De database kan verschillende MSP's van eenzelfde species bevatten. Bij de identificatie van een onbekende stam wordt het ruwe spectrum omgezet naar een pieklijst, die vervolgens vergeleken wordt met de RMS pieklijst (**figuur 2.2**).^[29] Er wordt een logscore gegenereerd, met een theoretisch maximum van 3.0. Hoe hoger deze score, hoe hoger de mate van vergelijking met het RMS.



Figuur 2.2: Basis voor de berekening van de logscore bij de MALDI Biotyper.^[29]

Bij het Vitek MS platform wordt een RMS gecreëerd op basis van een 'mass binning' algoritme. Het spectrum wordt verdeeld in 1300 intervallen (*bins* genoemd). In elke bin wordt enkel die piek weerhouden met de hoogste intensiteit. Dan wordt elke piek gewogen op basis van zijn specificiteit op species, genus of taxonomisch niveau. Elk 'SuperSpectrum' wordt geconstrueerd met verschillende stammen van hetzelfde species (dus 1 spectrum per species i.t.t. de Biotyper database). Een onbekend spectrum wordt eveneens in *bins* verdeeld, waarna de piekpatronen vergeleken worden met alle species in de database.^[30] Er wordt een waarschijnlijkheidspercentage bepaald en de identificatie wordt aanvaard als het percentage groter dan 60% is.^[27,30]

Het voordeel van de MALDI Biotyper RUO (*Research use only*) is dat de gebruiker zelf nieuwe referenties kan toevoegen, wat onmogelijk is bij de Vitek MS. Het nadeel hiervan is de mogelijkheid tot identificatiefouten wanneer een referentie foutief geïdentificeerd werd (*garbage in, garbage out*-principe). Ook is de vraag of het haalbaar zou zijn voor een routine klinisch laboratorium om zelf referenties toe te voegen nadat hun identiteit voldoende betrouwbaar bepaald werd.

2.3 IDENTIFICATIE VAN FILAMENTEUZE FUNGI

In tegenstelling tot bacteriën en gisten is de identificatie van schimmels aan de hand van MALDI-TOF MS moeilijker gebleken. Filamenteuze fungi zijn in vergelijking met bacteriën en gisten meer complex en steviger.^[17] Fungi kunnen door hun stevigere celwand moeilijker gelyseerd worden en de ribosmale proteïnen worden dus minder gemakkelijk vrij gezet.^[21] Bovendien worden ze gekenmerkt door een meer variabel groeipatroon en kunnen ze in één cultuur verschillende structuren (hyfen en/of *conidia*) vertonen.^[17,18] In het centrum van de kolonie worden secundaire metabolieten en pigmenten

geproduceerd door het reeds verouderde mycelium terwijl aan de rand van de kolonie het mycelium eerder jong en ongedifferentieerd is.^[27] Door deze variabele karakteristieken is het moeilijker om een gestandaardiseerd inoculum en reproduceerbare spectra te bekomen.^[18,27] De meest kritische factoren voor de identificatie van filamenteuze fungi die werden beschreven in de literatuur zijn de incubatieomstandigheden en de methode voor staalvoorbereiding (**bijlage 2**).

2.2.1 Incubatieomstandigheden

Afhankelijk van de condities waaronder ze gekweekt worden, kunnen de fysiologie en het proteïne expressieprofiel van fungi verschillen.^[17] In de literatuur werd vastgesteld dat cultuurcondities van invloed kunnen zijn op de spectra verkregen via MALDI-TOF MS.^[7] Er werden reeds verschillende variabelen onderzocht: het cultuurmedium, de incubatietemperatuur en de incubatietijd.^[31-33]

Theel *et al.* (2011) konden niet aantonen dat het type bodem van invloed was op de identificatie van dermatofyten bij gebruik van zes verschillende bodems (chocolade agar, Mycosel agar, Sabouraud agar, dermatofyt test medium met cycloheximide en nutrient agar).^[31] L'Ollivier *et al.* (2013) rapporteerden een gelijkaardige performantie voor de identificatie van dermatofyten van culturen gegroeid op SGC en SGCc. De Respinis *et al.* (2014) toonden daarentegen wel aan dat er een verschil kan bestaan tussen de identificatiepercentages van culturen op Sabouraud dextrose agar (SDA) en SGC2 agars.^[33] Zij stelden dit wel enkel vast bij *Trichophyton rubrum*. Ook rapporteerden zij een verschil in homogeniteit van spectra verkregen vanuit SDA en *potato dextrose agar* (PDA). Dit zou te wijten zijn aan de aanwezigheid van meerdere groeistadia op PDA omdat schimmels hierop sneller sporuleren. Longrong *et al.* (2017) toonden geen verschil tussen drie verschillende bodems bij de identificatie van *Aspergillus fumigatus* (vloeibare Sabouraud, SDA en Chalet agar).^[34]

De incubatietemperatuur voor fungi varieert in de verschillende studies tussen 25 en 35°C (**bijlage 2**). Longrong *et al.* (2017) rapporteerden geen verschil in identificatiepercentage bij een verschillende incubatietemperatuur (28 of 35°C).^[34] De incubatietemperatuur kan vermoedelijk behouden worden op 30°C, zoals voorgeschreven staat in de *Manual of clinical microbiology*.^[8]

In verschillende studies over dermatofyten varieerde de incubatietijd van drie dagen tot drie weken.^[17] Cassagne *et al.* (2016) beschreven variatie in spectra wanneer fungaal materiaal verzameld werd van dezelfde kolonie, maar na verschillende incubatietijden.^[27] Volgens De Respinis *et al.* (2014) leidde een verlenging van de incubatietijd (vijf naar tien dagen) niet tot een verbetering van de identificatiepercentages van dermatofyten.^[33] Anderzijds toonden Packeu *et al.* (2014) aan dat de identificatie van dermatofyten verbeterde bij verlenging van de incubatietijd van drie naar veertien dagen.^[35] Longrong *et al.* (2017) stelden vast dat het identificatiepercentage van *Aspergillus fumigatus* isolaten beter was na 72 uur incubatie dan na 48 uur incubatie.^[34] Het identificatiepercentage bleef stabiel vanaf 72 uur incubatie. Ook al verbeterde de kwaliteit van de identificatie volgens Coulibaly *et al.* (2011) naarmate de cultuur van *Scedosporium* species langer geïncubeerd werd, toch was volgens hen drie dagen voldoende om een accurate identificatie te bekomen.^[36]

Wat betreft de incubatieduur is er dus nog geen volledige consensus in de literatuur. Algemeen wordt wel besloten dat MALDI-TOF MS de identificatie van filamenteuze fungi zou kunnen versnellen aangezien identificatie kan gebeuren vooraleer de karakteristieke morfologie zichtbaar wordt.^[17,37,38]

2.2.2 Methoden voor staalvoorbereiding

Voor de identificatie van bacteriën volstaat het om een kleine hoeveelheid intacte cellen op het targetplaatje te brengen en deze vervolgens met matrix te bedekken^[21]. De cellen worden voldoende gelyseerd door het solvent dat aanwezig is in de matrix waardoor de proteïnen in de cel worden vrij gezet.^[21] Deze manier van werken wordt de 'intacte-cel methode' (ICM) genoemd. Fungi hebben echter een meer rigide celwand waardoor ze niet zo sterk gelyseerd kunnen worden. Hierdoor komen hun intracellulaire componenten niet in voldoende mate vrij voor MALDI-TOF MS analyse.

Voor gisten wordt gebruik gemaakt van de '*on-target lysis*'.^[21] Bij deze methode wordt een gistkolonie gespot op het targetplaatje en vervolgens bedekt met 1 µL mierenzuur (formic acid, FA) in een concentratie van 25% (Vitek® MS systeem) tot 70% (MALDI Biotyper).^[18,39] FA zorgt ervoor dat de cellen beter gelyseerd worden.^[39] Na opdroging van FA wordt het spotje bedekt met matrix.

Voor filamenteuze fungi blijkt dit niet voldoende te zijn. In de literatuur werden verschillende staalvoorbereidingen beschreven.^[18] Cassagne *et al.* (2011) hebben onderzoek gedaan naar verschillende methoden voor de extractie van fungaal materiaal.^[37] Na zorgvuldige evaluatie kozen ze voor de volgende methode: (1) een deeltje van de fungale cultuur (op SGC) wordt gemengd met 300 µL steriel water en 900 µL ethanol, (2) deze suspensie wordt gecentrifugeerd bij 13000g gedurende 10 min, (3) de pellet wordt vervolgens geïncubeerd in 10 µL 70% FA voor 5 minuten, (4) na toevoeging van 10µL acetonitril (ACN) wordt de suspensie 5 minuten geïncubeerd, (5) deze oplossing wordt gecentrifugeerd bij 13000g voor 2 minuten, (6) 1 µL van het supernatans wordt gespot op het targetplaatje en (7) na opdrogen wordt de spot bedekt met 1 µL matrix (CHCA).^[37] Deze methode werd omwille van zijn goede performantie in meerdere studies herhaald (**bijlage 2**). Er werd wel gewerkt met verschillende hoeveelheden FA en ACN, verschillende incubatietijden of centrifugeeromstandigheden, maar het principe blijft hetzelfde.

Lau *et al.* (2013) werkten volgens ditzelfde principe maar voorafgaand aan deze extractie maakten zij gebruik van *zirconia-silica beads* voor mechanische lysis.^[38] Packeu *et al.* (2014) experimenteerden met de *on-target lysis* methode voor dermatofyten.^[35] Hierbij kwamen ze echter maar tot een identificatiepercentage van 40%. De Carolis *et al.* (2011) experimenteerden eveneens met *on-target lysis* voor de identificatie van *Aspergillus*, *Fusarium* en *Mucorales* species waarbij ze een identificatiepercentage van 96.8% bereikten.^[40]

De beste identificatieresultaten worden verkregen met de extractieprocedure die gebruikt werd om de referentiedatabase op te bouwen.^[21] Op deze manier is de concordantie tussen het verkregen spectrum en het referentiespectrum het hoogste en is de kans op een juiste identificatie hoger.

Becker *et al.* (2014) beschreven nog een aantal factoren die de kwaliteit van de spectra kunnen beïnvloeden.^[7] Pigmentatie verstoort het desorptie/ionisatie proces waardoor het ionsignaal vermindert. Dit bleek de identificatie van verschillende donker gepigmenteerde fungi te bemoeilijken. Andere mogelijk interfererende factoren zijn artefacten van de bodem, clusters van de matrix, quaternaire ammoniumionen als achtergrondionen of een onzuiver MALDI-TOF MS instrument dat contaminerende kationen genereert.

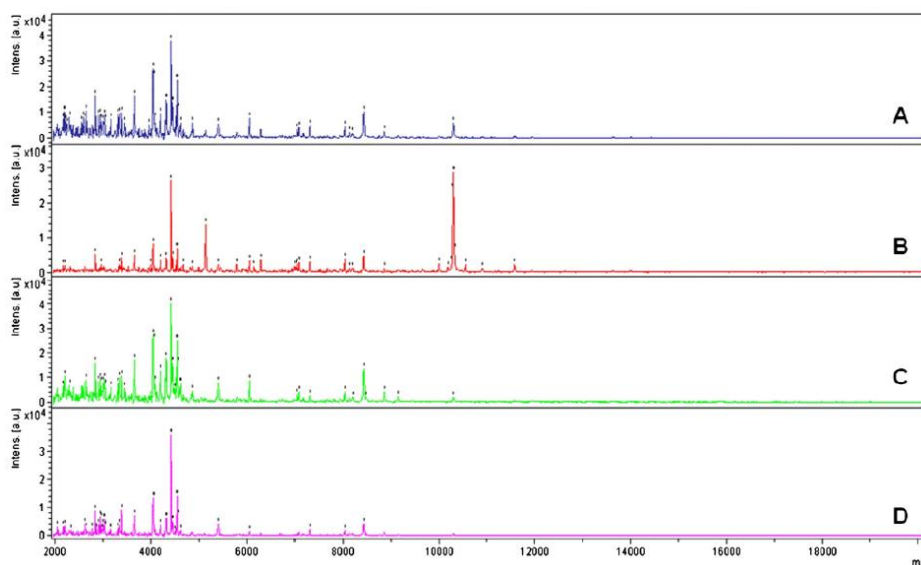
ANTWOORD OP VRAAG 2

De belangrijkste hinderpaal voor de identificatie van filamenteuze fungi met behulp van MALDI-TOF MS is het gebrek aan standaardisatie in de cultuurcondities en de methoden voor staalvoorbereiding. De gepubliceerde studies verschilden in de manier waarop de fungi gekweekt werden. Ook wordt best dezelfde extractieprocedure gebruikt voor de identificatie als deze gebruikt bij het opstellen van de referentiedatabase.

3. WAT IS HET BELANG VAN DE REFERENTIEDATABASE?

Een robuuste bibliotheek met referentiespectra is veruit het belangrijkste om accuraat filamenteuze fungi te identificeren.^[7,41] Sanguinetti en Posteraro (2017) benoemen de referentiedatabase als de Achilleshiel van de huidig beschikbare MALDI-TOF MS systemen.^[41]

Zoals hierboven beschreven wordt de MALDI-TOF MS identificatie sterk beïnvloed door de heterogene morfologie van filamenteuze fungi.^[42] Dit weerspiegelt zich niet alleen op het niveau van de microscopische identificatie, maar ook bij de MALDI-TOF MS identificatie. Deze heterogeniteit is aanwezig zowel tussen verschillende stammen van hetzelfde species als tussen subculturen van dezelfde stam (**figuur 3.1**). Dit heeft een negatieve invloed op de reproduceerbaarheid van de spectra.



Figuur 3.1 Vergelijking van massaspectra bekomen uit vier subculturen van een *A. flavus* stam. (uit Normand *et al.*, BMC Microbiol., 2013) Van een *Aspergillus flavus* stam werden vier subculturen gemaakt op vier verschillende agarbodems. De spectra vertonen verschillende gemeenschappelijke pieken, toch zijn een aantal variabele pieken duidelijk zichtbaar en karakteristiek voor één subcultuur.

Normand *et al.* (2013) hebben onderzoek gedaan naar de invloed van verschillende parameters om referentiedatabases te verbeteren.^[42] De invloed van drie belangrijke parameters bij de constructie van een referentiedatabase werd nagegaan: (1) het aantal technische kopieën om een referentiespectrum te genereren (het aantal geanalyseerde spots uit één cultuur), (2) het aantal biologische kopieën (het aantal referentiespectra afgeleid van verschillende subculturen van één stam) en (3) het aantal verschillende stammen van één species gebruikt voor de referentiedatabase. De auteurs concludeerden in hun studie dat voornamelijk de twee laatste parameters van belang zijn.

Door de diversiteit van de spectra te verbreden, is de kans groter dat een gemeten spectrum een match vertoont met de referentiedatabase.^[7] Dit is zeker van belang gezien de heterogeniteit van fungi in cultuur.^[17] Door gebruik te maken van meer massaspectra in de referentiedatabase kan gecompenseerd worden voor variabele eiwitexpressie, groeiomstandigheden en ouderdom van de cultuur.^[31] Dit kan echter een probleem zijn voor een aantal fungi aangezien soms slechts één of enkele stammen in internationale collecties bewaard zijn. Dit probleem kan ten dele opgelost worden door het aantal biologische kopieën (het aantal massaspectra vanuit verschillende subculturen) te verhogen.

De meeste studies maakten gebruik van een commerciële database, aangevuld met hun eigen geconstrueerde *in-house* database (**bijlage 2**). Er is meermaals beschreven dat de referentiebibliotheken van commercieel beschikbare MALDI-TOF MS systemen ontoereikend zouden zijn voor routine analyse.^[41] De commercieel beschikbare database van de MALDI Biotyper (v2.0) bevat 152 species(groepen).^[43] Versie 3.0 van de Vitek MS database bevat slechts 79 filamenteuze fungi.^[3] Sinds de opkomst van moleculaire methoden voor identificatie van fungi is er een significante uitbreiding van het aantal klinisch relevante fungi.^[22] Momenteel worden ongeveer 560 species erkend.^[22]

Recent werd het MSI (mass spectrometry identification) platform geïntroduceerd door de universiteit van Marseille in samenwerking met de BCCM/IHEM (Belgian coordinated collection of microorganisms/Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology).^[44] Deze database is publiek toegankelijk en spectra kunnen opgeladen worden, gemeten met Bruker systeem. Dankzij deze database wordt deels tegemoet gekomen aan het feit dat commercieel beschikbare systemen ontoereikend zijn voor de dagelijkse klinische praktijk. Deze database is uitgebreider en bevat meer dan 800 species.^[45] In een studie van Normand *et al.* (2017) werd een panel van 422 isolaten (126 species) getest met deze database en werd een identificatiepercentage van 87.4% bekomen.

3.1 PERFORMANTIE VAN MALDI-TOF MS VOOR DE IDENTIFICATIE VAN FILAMENTEUZE FUNGI

In de literatuur werden een heel aantal studies gepubliceerd die de identificatie van filamenteuze fungi met MALDI-TOF MS beschreven (**bijlage 2**). Het is duidelijk dat er veel variatie is tussen de verschillende studies, op gebied van de referentiedatabase, cultuurcondities, extractieprocedure, etc. Het identificatiepercentage varieerde van 0.7% tot 100%. Het identificatiepercentage bij het gebruik van een commerciële database varieerde van 0.7% tot 98.9%. Bij uitbreiding met een eigen geconstrueerde *in-house* database varieerde het percentage van 59.6% tot 100.0%. Bij de meeste studies steeg het identificatiepercentage wanneer de commerciële database werd uitgebreid met een *in-house* database.

L'Ollivier *et al.* (2013) onderzochten de waarde van MALDI-TOF MS voor de identificatie van dermatofyten.^[32] Volgens hun bevindingen kon de identificatie sneller gebeuren met behulp van MALDI-TOF MS omdat slechts een kleine kolonie nodig is en omdat de analyse kan gebeuren voordat de morfologische karakteristieken verschijnen (nodig voor microscopisch onderzoek). Dit zou de *turn around time* (TAT) kunnen verbeteren. In hun studie konden de dermatofyten accuraat geïdentificeerd worden binnen de drie tot zes dagen voor morfologische karakteristieken zichtbaar werden.

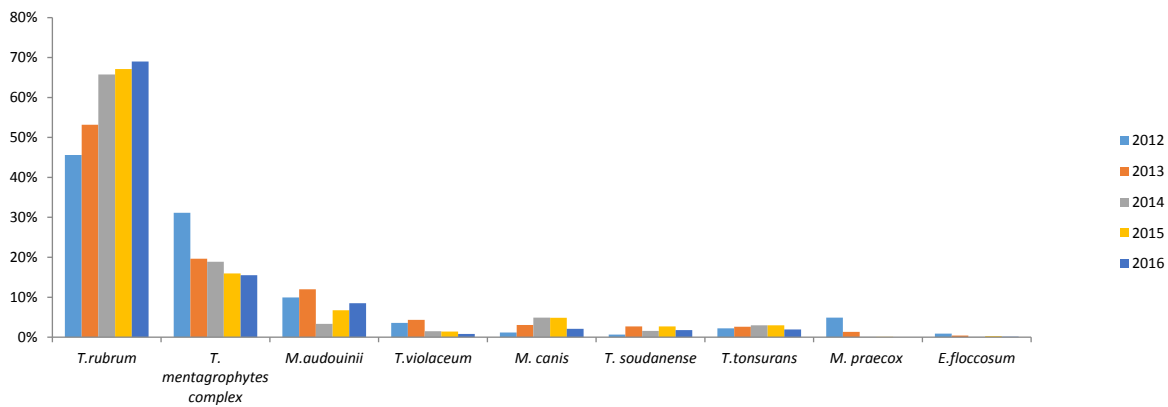
ANTWOORD OP VRAAG 3

De samenstelling van de referentiedatabase is essentieel om een accurate identificatie van filamenteuze fungi te bekomen met MALDI-TOF MS. De huidige commercieel beschikbare systemen zijn ontoereikend voor de klinische praktijk. In de meeste studies worden betere resultaten verkregen bij het gebruik van een *in-house* database. De kwaliteit van de referentiedatabase hangt af van het aantal species opgenomen in de database en van de kwaliteit van de referentiespectra.

4. EPIDEMIOLOGIE VAN FILAMENTEUZE FUNGI IN BELGIË

4.1 EPIDEMIOLOGIE VAN DERMATOFYTEN

Van 2012 tot 2016 voerde de nationale referentiecentra (NRC, CHU Luik en KU Leuven) voor mycosen een surveillance uit van de in België circulerende dermatofyten.^[46] Zowel de stammen opgestuurd naar de NRC's als de stammen uit de routine van de twee referentiecentra werden opgevolgd.



Figuur 4.2: Distributie van de dermatofyten geïsoleerd uit huid, haar en nagels tussen 2012 en 2016. (uit Sacheli *et al.*, 8th Trends in Medical Mycology, 2017) *Trichophyton rubrum* was het meest voorkomende species, ongeacht het staaltje.

Trichophyton rubrum was het meest voorkomende species tijdens alle jaren, en dit ongeacht het staaltje. Deze wordt gevolgd door *Trichophyton mentagrophytes complex* en *Microsporum audouinii* (figuur 4.2). *M. audouinii* was het meest voorkomende species in haarstalen als verwekker van tinea capitis. *T. rubrum* was de belangrijkste oorzaak van oppervlakkige mycosen, zowel van onychomycosen als van huidinfecties. Het belang van *T. rubrum* als oorzakelijke kiem van onychomycosen nam jaar na jaar toe, terwijl het belang van *T. mentagrophytes complex* afnam. Het complex *Trichophyton mentagrophytes* is eveneens een frequente verwekker van oppervlakkige mycosen.

In AZ Groeninge werden tussen januari 2016 en april 2018 203 stalen ontvangen voor de kweek van dermatofyten, waarvan 64 positief. De stalen waren huidschilfers of stalen afkomstig van nagels. Uit huidschilfers werd naast dermatofyten ook *C. albicans* gekweekt in vijf stalen. Uit drie stalen van nagels werden geen dermatofyten gekweekt maar tweemaal *S. brevicaulis* en driemaal *Fusarium* species. Binnen de groep van de dermatofyten was *T. rubrum* veruit het meest voorkomende species in 68% van de stalen, gevolgd door *T. interdigitale* en *T. mentagrophytes*. Deze twee laatste species behoren tot het *T. mentagrophytes complex*.^[47] Dus het voorkomen van dermatofyten in AZ Groeninge weerspiegelt duidelijk de Belgische epidemiologie.

4.2 EPIDEMIOLOGIE VAN ANDERE FILAMENTEUZE FUNGI

In 2015 onderzochten Lagrou *et al.* het voorkomen van ernstige fungale infecties in België.^[48] Uit deze studie bleek dat *Aspergillus* de belangrijkste humane pathogeen is binnen de groep van de filamenteuze fungi. In een studie van Vermeulen *et al.*, ook uit 2015, werd onderzoek gedaan naar azole resistentie bij *Aspergillus* species.^[23] Uit deze studie bleek dat *Aspergillus fumigatus complex* het meest voorkomende species is, gevolgd door *Aspergillus flavus complex* en *Aspergillus niger complex*.

Ook blijkt uit een studie van Saegeman *et al.* (2010) dat de incidentie van invasieve mucromycosis (veroorzaakt door *Mucorales*) stijgt in UZ Leuven. Dit is het gevolg van het toenemend aantal hoogrisicopatiënten, voornamelijk diegenen met onderliggende hematologische maligniteiten.^[49]

In AZ Groeninge waren tussen januari 2016 en april 2018 362 stalen positief voor schimmels, andere dan dermatofyten. De positieve stalen waren afkomstig van de bovenste en de onderste luchtwegen. Daarnaast waren er ook enkele positieve stalen afkomstig van een longbiopt of een pleuravocht. Het meest voorkomende species was *A. fumigatus* complex in 83% van de stalen. Andere species waren veel minder voorkomend, bv. *A. flavus* complex, *S. apiospermum* en *Mucorales* species.

Mycosen veroorzaakt door filamenteuze fungi die niet endemisch zijn in België kwamen zelden voor. Door de recente globalisering worden deze micro-organismen echter meer en meer gezien als importpathologie. Er zijn reeds gevallen beschreven in België van *Histoplasma capsulatum* en *Talaromyces marneffe*.^[50,51]

ANTWOORD OP VRAAG 4

Binnen de groep van de dermatofyten is het meest voorkomende species in België *T. rubrum*, gevolgd door *T. mentagrophytes complex* en *M. audouinii*. Binnen de groep van de andere filamenteuze fungi is *A. fumigatus* de koploper gevolgd door andere *Aspergillus* species. Ook mucormycose kent een toenemende incidentie in België. Het is bijgevolg essentieel dat minstens deze species opgenomen zijn in de gebruikte database.

5. KAN MALDI-TOF MS DE HUIDIGE WERKWIJZE VOOR IDENTIFICATIE VAN FILAMENTEUZE FUNGI VERBETEREN EN/OF VERSNELLEN? AANPASSING WERKWIJZE AZ GROENINGE.

5.1 WERKWIJZE CAT

In het laboratorium AZ Groeninge worden filamenteuze fungi momenteel geïdentificeerd aan de hand van hun macroscopisch uitzicht en via microscopisch onderzoek. Het doel van deze CAT was om na te gaan of MALDI-TOF MS de huidige methode voor identificatie van filamenteuze fungi kan verbeteren.

5.2.1 Materiaal en methoden

5.2.1.1 Extractieprocedure filamenteuze fungi

In deze studie werd gekozen voor het extractieprotocol beschreven door Cassagne *et al.* (2011).^[37] Van dit extract worden vier spots van 1 µL gemaakt op het targetplaatje. Na opdrogen worden de spots bedekt met matrix, α-cyano-4-hydroxy-kaneelzuur (CHCA). Wanneer voor minstens drie van de vier spots dezelfde identificatie wordt bekomen, dan wordt de identificatie aanvaard.

5.2.1.2 Cultuur

In eerste instantie worden schimmelculturen gebruikt op bodems gevalideerd door bioMérieux voor de analyse op VITEK MS, i.e. de SGC2 agar. Vervolgens zal nagegaan worden of een ander medium, de Dermatofyt agar (DA, bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankrijk), ook geschikt is voor identificatie. Culturen worden geïdentificeerd na drie, zeven en veertien dagen.

5.2.1.3 MS instrument en analyse spectra

In AZ Groeninge wordt gebruik gemaakt van een Vitek MS van bioMérieux voor de identificatie van bacteriën en gisten. Recent werd een nieuwe versie van de database, v3.0, geïntroduceerd in het VITEK MS systeem. Deze bevat voor het eerst filamenteuze fungi (79).^[3] Daarnaast wordt ook gewerkt met het vrij beschikbare MSI platform waarin spectra kunnen opgeladen worden.^[45] Deze database is uitgebreider en bevat meer dan 800 species.^[52]

Er worden drie types stammen gebruikt om de performantie van de twee databases na te gaan:

1. Stammen afkomstig van externe kwaliteitscontroles (QC-stammen: Instand en Ringtest)
2. Een stammencollectie van UZ Leuven (mycologiecursus)
3. Stammen uit de routine van AZ Groeninge

5.2.3 Analyse QC-stammen

Er werden tien externe kwaliteitscontroles geïdentificeerd via de MALDI-TOF MS (**zie bijlage 1; tabel 1.1**). Acht stammen werden gekweekt op een SGC2 bodem. Twee stammen groeiden enkel op een TSH agar. Wanneer gekeken wordt naar het totale identificatiepercentage over de totale incubatieduur van veertien dagen, werd in totaal 90.0% van de stammen juist geïdentificeerd met het Vitek MS systeem en 100.0% met het MSI platform. Voor het Vitek MS systeem werd 60.0% juist geïdentificeerd na drie dagen, 50.0% na zeven dagen en 30.0% na veertien dagen. Voor het MSI platform werd 60.0% juist

geïdentificeerd na drie dagen, 80.0% na zeven dagen en 70.0% na veertien dagen. Een conclusie over de beste incubatietijd kan dus niet gemaakt worden.

Enmalig werd een foutieve identificatie bekomen, waarbij *T. mentagrophytes* geïdentificeerd werd als *T. concentricum*. Dit was voor het MSI platform na zeven dagen incubatietijd. Ervoor en erna werd de stam wel juist geïdentificeerd.

5.2.4 Analyse stammencollectie UZ Leuven

Er wordt een onderscheid gemaakt tussen dermatofyten en andere filamenteuze fungi (**zie bijlage 1; tabel 1.2 en 1.3**). Voor de dermatofyten werd een totaal identificatiepercentage van 69.2% voor het Vitek MS systeem en 76.9% voor het MSI platform waargenomen. Dit betreft over de volledige incubatieduur van veertien dagen. Voor de dermatofyten steeg het identificatiepercentage van 23.1% naar 53.8% na veertien dagen voor het Vitek MS systeem. Voor het MSI platform was het identificatiepercentage redelijk stabiel onafhankelijk van de incubatieduur. Sommige species groeiden nog niet na drie dagen en konden pas na zeven dagen incubatie voor het eerst geïdentificeerd worden.

Het MSI platform maakte drie foutieve identificaties na veertien dagen. Tweemaal werd het *T. mentagrophytes complex* als *T. tonsurans* geïdentificeerd en *T. verrucosum* werd geïdentificeerd als *A. benhamiae*. Beide foutieve identificaties werden gemaakt tussen genetisch sterke verwante species.

Binnen de groep van de andere filamenteuze fungi bedroeg het totale identificatiepercentage (over de gehele incubatieduur van veertien dagen) 36.8% voor het Vitek MS systeem en 81.6% voor het MSI platform. Voor het Vitek MS systeem werden de meest identificaties bekomen na drie dagen en daalde het identificatiepercentage naar 16.7% na zeven en veertien dagen incubatie. Ook voor het MSI platform daalde het identificatiepercentage van 68.4% naar 50.0% na veertien dagen incubatie. Sommige species groeiden nog niet na drie dagen en konden pas na zeven dagen incubatie voor het eerst geïdentificeerd worden.

S. brevicaulis werd foutief geïdentificeerd als *P. chrysogenum* door beide systemen na drie dagen incubatie. Na zeven en veertien dagen incubatie kon het species wel juist geïdentificeerd worden. Ook *S. prolificans* werd foutief geïdentificeerd als *P. chrysogenum* na zeven dagen incubatie. Na veertien dagen incubatie kon het species wel juist geïdentificeerd worden.

5.2.5 Analyse klinische stalen

Er werden 17 stalen uit de routine geïdentificeerd met behulp van MALDI-TOF MS (**zie bijlage 1; tabel 1.4**). Door gebruik te maken van de database van het Vitek MS systeem werd een totaal percentage van 82.4% bereikt. Na drie dagen was het identificatiepercentage 76.5%. Door de incubatieduur van de dermatofyten naar zeven dagen te verhogen werd het uiteindelijke identificatiepercentage 82.4%. Bij gebruik van de uitgebreide database van het MSI platform werd een identificatiepercentage van 94.0% bereikt. Na drie dagen was het identificatiepercentage 88.2%. Door de incubatieduur van de dermatofyten te verlengen naar zeven dagen werd een identificatiepercentage van 94.1% bereikt. Er

was één discrepantie tussen de identificatie via het microscopisch onderzoek en de MALDI-TOF MS identificatie. Een staal gerapporteerd als *Scedosporium apiospermum* in het verleden, werd nu met de database van het MSI platform geïdentificeerd als *S. aurantiacum* (species niet aanwezig Vitek MS database).^[53] Deze laatste is een nieuw erkend species, dat vroeger als *S. apiospermum* werd erkend.^[22] Deze stam wordt opgestuurd naar het NRC voor *DNA sequencing*.

5.2.6 Validatie dermatofyt agar

Een tweede medium voor cultuur werd uitgetest, namelijk de DA. Hiervoor werden de dermatofyten gebruikt van de externe kwaliteitscontroles (diegenen die groeiden op een SGC plaat), van de stammencollectie uit UZ Leuven en twee dermatofyten uit de routine. Dit waren 22 stammen in totaal. De stammen werden tot nu toe slechts zeven dagen geïncubeerd. De incubatie tot veertien dagen is nog lopende, maar wegens tijdsgebrek nog niet afgerond.

Een totaal identificatiepercentage van 54.5% voor het Vitek MS systeem en 63.6% voor het MSI platform werd bekomen over een incubatieduur van zeven dagen. Dit percentage ligt iets lager dan de identificatie na kweek op een SGC2 agar. Het MSI platform gaf twee foutieve identificaties. *T. mentagrophytes* werd verkeerdelijk geïdentificeerd als *T. concentricum* en *T. verrucosum* werd geïdentificeerd als *A. benhamiae*.

5.2.7 Discussie

De identificatie van schimmels met MALDI-TOF MS blijkt moeilijker te zijn in de praktijk dan vermoed op basis van de meest recente literatuurgegevens. In deze studie werd vastgesteld dat een goed spectrum verkrijgen niet altijd gemakkelijk is. Het Vitek MS systeem gaf frequent aan dat een gebrekkig spectrum werd waargenomen. Dit zou misschien kunnen liggen aan het feit dat *in-house* reagentia en de methode beschreven door Cassagne *et al.* (2011) gebruikt werden en niet de 'Vitek MS Mould Kit' (en bijbehorend *in vitro diagnostics* protocol) aangeboden door bioMérieux. Beiden volgen hetzelfde principe maar verschillen in de hoeveelheid gebruikt fungaal materiaal, de hoeveelheden van de gebruikte vloeistoffen en de centrifugeeromstandigheden. Ook werd vastgesteld dat het opmeten van een spectrum bij filamenteuze fungi beduidend langer duurt dan voor bacteriën of gisten.

In het algemeen wordt een identificatiepercentage van 59.0% bekomen voor het Vitek MS systeem en 85.9% voor het MSI platform. Dus het criterium van 90% opgelegd door het Cumitech Document 31A en het CLSI document M52 wordt niet gehaald.^[54,55] Voor de stammen waarvoor geen identificatie bekomen werd, was de meest voorkomende reden dat een slecht spectrum bekomen werd tijdens acquisitie. Een ander deel werd gewoon niet geïdentificeerd. Slecht een beperkte hoeveelheid foutieve identificaties werden vastgesteld. **(zie verder)**

Het identificatiepercentage is gelijkaardig ligt in de lijn van de geraadpleegde studies, zij het misschien iets lager **(bijlage 2)**. Dit kan o.a. te wijten zijn aan het gebruik van het Vitek MS systeem, terwijl de meeste studies het Bruker systeem gebruiken. Ook kan het te wijten zijn aan een deel van de stammen

die getest werden. De stammencollectie van UZ Leuven is reeds enkele jaren aanwezig in het labo en werd bewaard door overenting. Dit kan leiden tot het ontstaan van atypische stammen, wat deels een verklaring zou kunnen zijn voor het lagere identificatiepercentage. Het identificatiepercentage van het Vitek MS systeem ligt lager dan dat van het MSI platform. Dit is deels te wijten aan het feit dat een deel van de species die getest werden niet aanwezig zijn in de database van het Vitek MS systeem. In een recente studie van Rychert *et al.* werd een identificatiepercentage bereikt van 91%, zij het wel getest op species enkel aanwezig in de database van het Vitek MS systeem.^[3] Wanneer voor deze studie het identificatiepercentage berekend wordt voor enkel die stammen aanwezig in de Vitek MS database, wordt een identificatiepercentage van 80.0% bekomen.

Het gebruik van het MSI platform, verhoogde het identificatiepercentage. Dit lijkt logisch aangezien deze database meer stammen bevat. Enkel het Vitek MS systeem voor de routine zou ontoereikend zijn. Er werden meer foutieve identificaties bekomen voor het MSI platform (5), terwijl het Vitek MS systeem slechts één foutieve identificatie gaf. Momenteel worden bewerkte spectra opgeladen in het MSI platform. Onderhandelingen zijn gaande met bioMérieux om onbewerkte spectra te verkrijgen. Dit zou de identificatieresultaten eventueel (positief) kunnen beïnvloeden.

Het maken van vier spotjes blijkt nuttig te zijn (dit in plaats van één zoals in de routine gedaan wordt voor bacteriën en gisten). Ook al duurt het langer om vier spots te analyseren, toch kan het helpen bij het vermijden van foutieve identificaties.

De stalen voor schimmelkweek in het laboratorium van AZ Groeninge kennen eerder een nauwe distributie. Voornamelijk *Aspergillus* species komen frequent voor in het laboratorium. De aanvragen voor dermatofytenkweek zijn beperkt. Het identificatiepercentage van de stalen uit de routine (n=17) die in deze studie getest werden, voldoet aan het acceptatiecriterium van 90% vooropgesteld in de het Cumitech document 31A en het CLSI document M52 wanneer gebruik wordt gemaakt van het MSI platform.^[54,55] Er werden echter nog onvoldoende klinische isolaten getest om de methode te aanvaarden voor routine gebruik. Er moet dus nog steeds voorzichtig omgesprongen worden met de resultaten van de identificatie. Daarom wordt gepland om in de komende tijd morfologisch onderzoek en MALDI-TOF MS identificatie in parallel uit te voeren.

ANTWOORD OP VRAAG 5

Het vooropgestelde percentage van 90% voor microbiologische identificatiesystemen uit het Cumitech document 31A en uit de CLSI M52 wordt niet bereikt.^[54,55] De identificatie met behulp van MALDI-TOF MS kan een nuttige aanvulling en hulpmiddel zijn bij de identificatie van filamenteuze fungi via macroscopisch en microscopisch onderzoek. Daarom zullen zij voorlopig in de toekomst in parallel uitgevoerd worden. Het onderzoek naar MALDI-TOF MS identificatie en de verbetering van de databanken is onderhevig aan verandering. Er wordt dus verwacht dat de performantie van MALDI-TOF MS zal verbeteren zodat deze als enige methode gebruikt zou kunnen worden in een routine laboratorium.

COMMENTS

Er gaat speciale dank uit naar Anne-Cécile Normand, Renaud Piarroux en Marijke Hendrickx voor het ter beschikking stellen van het MSI platform.

TO DO/ACTIONS

1) Momenteel is er een commerciële kit beschikbaar, de VITEK[®] MS Mould Kit (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, Frankrijk), om een extractie uit te voeren. Deze kit volgt dezelfde methode zoals beschreven door Cassagne *et al.* (2011), zij het met licht gewijzigde hoeveelheden reagentia en andere centrifugeeromstandigheden.^[37] Er zal nog een vergelijkende studie uitgevoerd worden tussen de gebruikte extractiemethode in deze CAT en de VITEK[®] MS Mould Kit.

2) Het gebruik van de dermatofyt agar voor kweek gevolgd door identificatie met MALDI-TOF MS moet nog verder geëvalueerd worden naarmate de incubatietijd op zijn einde loopt. Hierna zal gekeken worden welke cultuurcondities best toegepast zullen worden in de praktijk.

Bijlage 1: Overzicht van de gebruikte stammen**Tabel 1.1: Distributie van de stammen uit externe kwaliteitscontroles (INSTAND en Ringtest).**

Naam	Voorkomen
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3
<i>Trichophyton rubrum</i>	1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1
<i>Microsporum gypseum</i>	1
<i>Microsporum canis</i>	1
<i>Microsporum audouinii</i>	1
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	1

Tabel 1.2: Dermatofyten uit stammencollectie UZ Leuven.

Nummer	Naam
1.2	<i>Trichophyton spp</i>
3.1	<i>Trichophyton ajelloi</i>
3.3	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
3.4	<i>Trichophyton interdigitale</i>
3.6	<i>Trichophyton violaceum</i>
3.9	<i>Trichophyton verrucosum</i>
3.10	<i>Trichophyton schoenleinii</i>
3.11	<i>Trichophyton terrestre</i>
3.12	<i>Microsporum canis</i>
3.13	<i>Microsporum audouinii</i>
3.14	<i>Microsporum cookei</i>
3.15	<i>Microsporum gypseum</i>
3.16	<i>Epidermophyton floccosum</i>

Tabel 1.3: Andere filamenteuze fungi uit stammencollectie UZ Leuven.

Nummer	Naam
1.1	<i>Rhizopus spp</i>
1.3	<i>Geotrichum candidum</i>
1.4	<i>Penicillium spp</i>
1.5	<i>Paecilomyces variotii</i>
1.6	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>
1.7	<i>Cladosporium spp</i>
1.8	<i>Scedosporium apiospermum</i>
1.9	<i>Scedosporium prolificans</i>
1.10	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i>
1.11	<i>Scytalidium hyalinum</i>
1.13	<i>Trichothecium roseum</i>
1.15	<i>Pleurostomophora richardisiae</i>
2.2	<i>Microascus spp.</i>
2.3	<i>Aspergillus nidulans</i>
2.4	<i>Fusarium</i>
2.5	<i>Verticillium</i>
2.6	<i>Acremonium</i>
2.7	<i>Sporotrix schenckii</i>
2.9	<i>Curvularia spp.</i>
2.10	<i>Alternaria spp.</i>
2.11	<i>Pithomyces spp.</i>
2.12	<i>Exophiala (Wangiella) dermatitidis</i>
2.13	<i>Cryosporium spp.</i>
2.14	<i>Aureobasidium pullulans</i>
4.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>
4.2	<i>Aspergillus clavatus</i>
4.3	<i>Aspergillus flavus</i>
4.5	<i>Aspergillus candidus</i>
4.6	<i>Aspergillus orchraceus</i>
4.8	<i>Aspergillus terreus</i>
4.9	<i>Aspergillus glaucus</i>
4.10	<i>Aspergillus versicolor</i>
4.11	<i>Aspergillus calidoustus</i>
5.1	<i>Mucor spp</i>
5.2	<i>Rhizopus spp</i>
5.4	<i>Lichteimia spp</i>
5.5	<i>Cunninghamella bertholletiae</i>
5.6	<i>Syncephalastrum racemosum</i>

Tabel 1.4: Distributie geteste routinestalen voor MALDI-TOF MS identificatie.

Naam	Voorkomen
<i>Aspergillus fumigatus</i>	10
<i>Aspergillus flavus</i>	2
<i>Trichophyton rubrum</i>	1
<i>Trichophyton tonsurans</i>	1
<i>Scedosporium apiospermum</i>	1
<i>Geotrichum candidum</i>	1
<i>Geotrichum capitatum/Saprochaete clavatum</i>	1

Bijlage 2: Overzicht van publicaties (over MALDI-TOF MS identificatie van filamenteuze fungi) met hun belangrijkste kenmerken.

Publicatie	Cultuurmedium	Incubatie- Omstandigheden	Extractiemethode	MALDI-TOF Instrument	Database	% species identificatie	% genus identificatie	Referentie
Rychert <i>et al.</i> (2018)	PDA SGC SDA	30°C, bij zichtbare groei (Snel: na 2-8d; Traag: na 5 -25d)	Vitek®MS Mould reagent kit	Vitek®MS	Vitek®MS 3.0	91%	93%	[3]
Huang <i>et al.</i> (2017)	Sabouraud liquid medium	28°C Rotatie 24-48u tot zichtbaar mycelium	<ul style="list-style-type: none"> • Wassen met ethanol 70% • Sediment homogeniseren met 0.1mm beads • Extractie met ACN/FA 	Bruker Microflex LT Xiamen Microtyper	Filamentous fungi library v3.1 /	98.9% 99.2%	99.7% 100%	[56]
Cassagne <i>et al.</i> (2011) ⁽¹⁾	SGC	72h bij 27°C	<ul style="list-style-type: none"> • Stukje fungus mengen met 300µL steriel water en 900µL ethanol • Centrifuge: 10min bij 13000g • Pellet in 10µL FA 5min • +10µL ACN (10min) • Centrifuge: 2min bij 13000g 	Bruker - Autoflex speed™ I of II - UltrafleXtreme™	In-house database	87%	/	[37]
Normand <i>et al.</i> (2017)	SGC SGC Actidion (D)	Minstens 48h, 30°C Minstens 48h, 27°C (D)	Idem (1)	Bruker	In-house database Bruker V3.2.1.1	87.41% 35.15%	/	[45]
Longrong <i>et al.</i> (2017)	SDA liquid, SDA Chalet agar	Voor 48, 72, 96 en 120h ⁽²⁾ bij 28 en 35°C	Idem (1), maar FA/ACN 40µL/40µL	Vitek®MS	Vitek®MS 3.0	88.5%	/	[34]
De Respinis <i>et al.</i> (2014)	SDA SGC	5d bij 30°C (tragere 9-10d)	Idem (1), maar centrifuge 2min bij 10600g en FA/ACN 40µL/40µL	Vitek®MS	Vitek®MS V2.0.0 + SARAMIS v 4.09 + in-house expansie van database	88.5%	/	[33]
De Respinis <i>et al.</i> (2013)	SGC2	3d bij 30°C	<ul style="list-style-type: none"> • Extractie met 25% FA • Methanol/chloroform lipide eliminatie • Centrifugeren • Supernatans mixen met matrix 	AXIMA	SARAMIS	95.8%	/	[57]
Nenoff <i>et al.</i> (2013)	SDA	7d bij 28°C Trage groeiers: langer	Lysis op het plaatje met 0.3mL matrix ⁽³⁾	AXIMA	SARAMIS	98.8%- 99.3%	/	[58]
Theel <i>et al.</i> (2011) ⁽⁴⁾	Mycosel agar	3d bij 30°C	<ul style="list-style-type: none"> • Stukje fungus mengen met 70% ethanol • 10 min drogen bij <i>speed vacuüm</i> • Extractie FA/ACN (50µL/50µL) • Vortexen 	Bruker	Bruker database Bruker database aangevuld met in- house spectra	20.5% 59.6%	37.4% 93%	[31]
Karabiçak <i>et al.</i> (2015)	SDA	72h bij 27°C	Idem als (4)	Bruker Autoflex III	Bruker database Bruker database aangevuld met in- house spectra	51.6% 89.7%	70.6% 96.8%	[59]

Packeu <i>et al.</i> (2014)	Sabouraud met chlooramfenicol	3d bij 25°C 7d bij 25°C 14d bij 25°C	On-target lysis met 70% FA Idem als (1) Idem als (1)	Bruker MicroFlex	In house database	40% 80% 100%	/	[35]
Becker <i>et al.</i> (2014)	/	/	/	Bruker MicroFlex	Bruker database aangevuld met in-house spectra	95.4%	96.4%	[7]
Schultless <i>et al.</i> (2014) ⁽⁵⁾	BBL Sabouraud vloeibaar medium	KT 24-48h op een rotator	<ul style="list-style-type: none"> • Centrifuge: 1mL medium, 16000g, 5min • Pellet suspenderen in 300µL water en 900µL ethanol • Centrifuge: 16000g, 2 min • Suspensie in FA/ACN (10-60µL elk) 	Bruker MicroFlex	Bruker Daltonik Filamentous Fungi Library 1.0	71.1%*	78.3%	[60]
Park <i>et al.</i> (2016)	PDL	KT Rotator	Idem als (5)	Bruker MicroFlex	Bruker Daltonik Filamentous Fungi Library 1.0	98.8%*	/	[61]
Packeu <i>et al.</i> (2013)	Verdunde Sabouraud vloeibaar medium	12d bij 25°C	Idem als (1) maar FA/ACN (50µL/50µL)	Bruker MicroFlex	In-house database	89%	/	[47]
Shao <i>et al.</i> (2018)	Vloeibaar medium	/	Idem als (1) maar centrifuge bij 15600g, gedurende 2 min	Bruker	Bruker Daltonik Filamentous Fungi Library 1.0 + in-house database	49.5% 81.1%	66.7% 100%	[62]
Coulibaly <i>et al.</i> (2011)	SGC en malt extract agar	3-6d bij 27°C	Idem als (1), maar vergelijking tussen FA en TFA	Bruker AutoFlex I	In house database	/	/	[36]
Lau <i>et al.</i> (2013)	SDA	5d bij 28°C	<ul style="list-style-type: none"> • Stukje fungus in 250µL ethanol en 50µL beads (zirconia-silica) • Emulsificatie + vortexen voor 15min • Centrifugeren: 2min, 9447g • Pellet in 50µL 70% FA: Vortex 5 min • + 50µL ACN: vortexen 5min • Centrifugeren: 2min, 9447g 	Bruker MicroFlex LT	Bruker V3.3.1.0 In house database Bruker + in-house database	0.7% 88.9% 88.9%	6.9% 93.2% 93.2%	[38]
De Carolis <i>et al.</i> (2011)	SDA	30°C	<ul style="list-style-type: none"> • Stukje fungus in 200µL gedistilleerd water • 1µL op spotje • Bedekken met 1µL ethanol • 1µL matrix hierover 	Bruker MicroFlex LT	Bruker 2.0 + in-house database	96.8%	/	[40]
L'Ollivier <i>et al.</i> (2013)	SGC SGCc	30°C, 3-15 dagen	Idem als (1)	Bruker UltraFlex	In-house database	97.8%	/	[32]

Afkortingen: PDA: potato dextrose agar; SDA: Sabouraud dextrose agar SGC: Sabouraud met gentamicine en chloramfenicol; ACN: acetonitril; FA: mierenzuur; (D): dermatofyten; PDL: potato dextrose liquid; KT: kamertemperatuur; TFA: trifluoroazijnzuur

(1) Cassagne *et al.* (2011) onderzocht verschillende methoden: enkel de resultaten van de finale methode worden weergegeven in de tabel

(2) In deze publicatie wordt uiteindelijk voor 72h incubatie gekozen

(3) De matrix bestond in deze studie uit 2,5-dihydroxybenzoëzuur in 1mL H₂O/ACN 1:1 aangezuurd met 1% trifluoroazijnzuur

*Weergegeven percentages voor identificatie zijn deze waarbij de cut-off verlaagd wordt van 2.0 naar 1.7