

15 MEI 2018

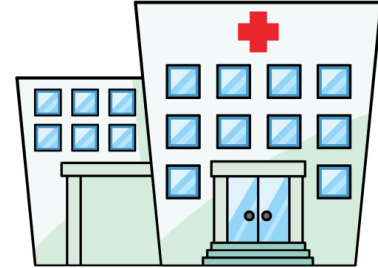
Identificatie van filamenteuze fungi

DE WAARDE VAN MALDI-TOF MS

SUPERVISIE: APR. A. DE BEL, DR. M. BOUDEWIJNS

BELANG VAN IDENTIFICATIE

- 10% van de nosocomiale infecties
- Toename invasieve mycosen:
 - Voorspelling gevoeligheid aan antifungale middelen
 - Prognose
 - Virulentie
- Toename oppervlakkige mycosen:
 - Epidemiologie
 - Behandelingsschema
 - Identificatie van non-dermatofyten

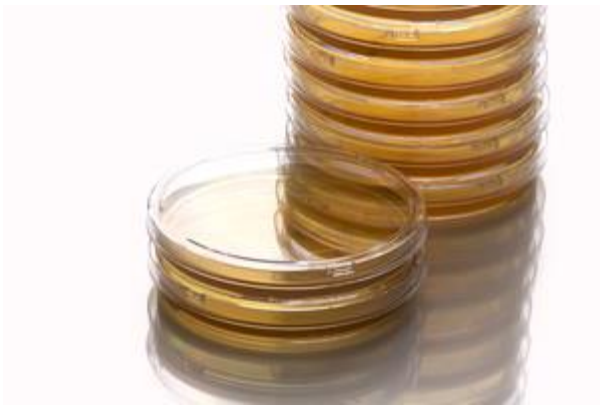


ONDERZOEKSVRAGEN

1. Huidige methoden
2. Hindernissen MALDI-TOF MS
3. Referentiedatabase
4. Aanpassing werkwijze AZ Groeninge.

1. HUIDIGE METHODEN

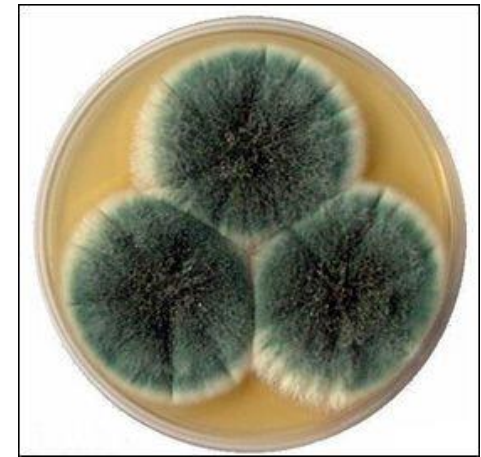
CULTUUR



30°C

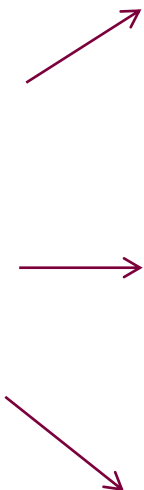
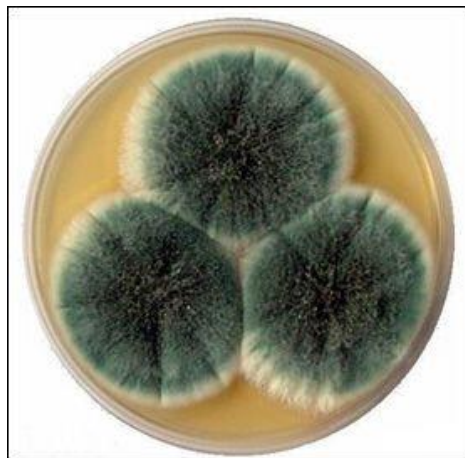


Tot 4 weken



Sabouraud agar met
chlooramfenicol en gentamicine
± cycloheximide

IDENTIFICATIE



Expertise en training
Morfologische criteria
Morfologische verwantschap



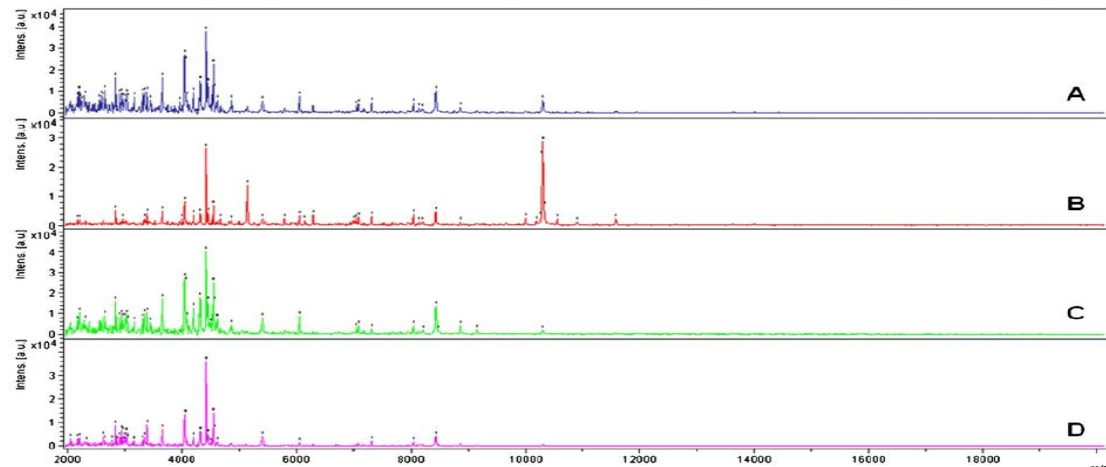
Duur
Arbeidsintensief
Gouden standaard



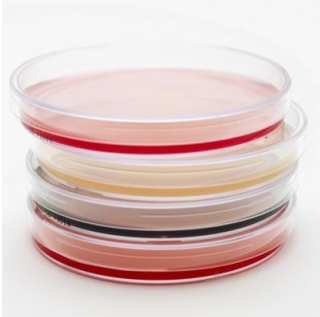
2. HINDERNISSEN

MOEILIJKHEDEN

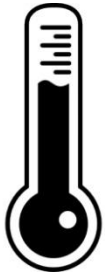
- Stevigere celwand → moeilijkere cellysis
- Meer variabel groeipatroon
 - Meerdere structuren in één cultuur
 - Centrum versus rand kolonie
- Gestandaardiseerd inoculum
- Minder reproduceerbare spectra



INCUBATIEOMSTANDIGHEDEN



- Cultuurmedium
 - Meeste studies weinig verschil



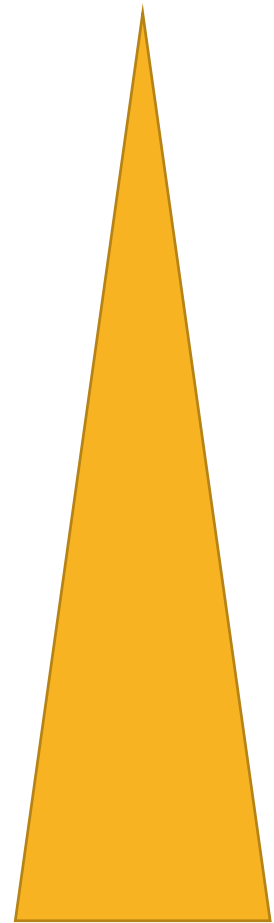
- Incubatietemperatuur
 - Longrong *et al.* (2017): 28 of 35°C geen verschil



- Incubatietijd
 - Variatie van drie dagen tot drie weken

METHODEN VOOR STAALVOORBEREIDING

- Intacte cel methode
 - Bacteriën
- On-target lysis met mierenzuur of ethanol
 - Gisten
- Inactivatie-extractiemethode met ethanol en mierenzuur/acetonitril
 - Meest beschreven in de literatuur
- Mechanische lysis methode



Hands-on time

3. REFERENTIEDATABASE

BELANGRIJKE PARAMETERS REFERENTIEDATABASE

1. Aantal technische kopieën
2. Aantal biologische kopieën
3. Aantal verschillende stammen van één species

BELANGRIJKE PARAMETERS REFERENTIESPECTRUM

- ~~1. Aantal technische kopieën~~
 2. Aantal biologische kopieën
 3. Aantal verschillende stammen van één species
- Diversiteit spectra in referentiedatabase verbreden

VITEK MS (BIOMERIEUX)

- Vitek MS database v3.0:
 - 79 filamenteuze fungi



MALDI BIOTYPER (BRUKER)

- Filamentous fungi library v2.0:
 - 152 species



VITEK MS (BIOMERIEUX)

- Vitek MS database v3.0:
 - 79 filamenteuze fungi



MALDI BIOTYPER (BRUKER)

- Filamentous fungi library v2.0:
 - 152 species



- MSI platform: > 800 species

IDENTIFICATIEPERCENTAGES LITERATUUR

Vitek MS	Vitek MS + in-house	Bruker	Bruker + in- house	In-house
88.5-91.0%	88.5%	0.7%-98.9%	59.6%-96.8%	87%-100%
n=2	n= 1	n=8	n=7	n=6

In-house database > Commerciële database

4. AANPASSING WERKWIJZE AZ GROENINGE.

STUDIEOPZET

- Drie types stammen
 - Externe kwaliteitscontroles
 - Stammencollectie UZ Leuven
 - Klinische stalen
- Kweek: 30°C, SGC2 agar
- Identificatie na 3, 7 en 14 dagen
- Extractieprotocol: Cassagne *et al.* (2011)
 - Inactivatie-extractie procedure met ethanol en FA/ACN

STUDIEOPZET

- 4 spots per extract
 - Identificatie bij 3/4
- Spectra met Vitek MS
- Twee databases:
 - Database Vitek MS v3.0
 - MSI platform



RESULTATEN

	Vitek MS v3.0	MSI platform
QC-stammen (n=10) (dermatologisch)	90,0%	100,0%
Stammencollectie		
Dermatofyten (n=14)	69,2%	76,9%
Andere (n=38)	36,9%	81,6%
Routine stalen (n=17)	82,4%	94,0%
Totaal	59,0%	85,9%

→ Criterium van 90% wordt niet gehaald

→ MSI platform > Vitek MS

SPECIES IDENTIFICATIE?

- “Bad spectrum during acquisition”
- “NO ID”
- Foutieve identificatie

Species	Foutieve identificatie	Database
<i>T. mentagrophytes complex</i>	<i>T. concentricum</i>	MSI platform
<i>T. mentagrophytes complex</i>	<i>T. tonsurans</i>	MSI platform
<i>T. verrucosum</i>	<i>A. benhamiae</i>	MSI platform
<i>S. prolificans</i>	<i>P. chrysogenum</i>	MSI platform
<i>S. brevicaulis</i>	<i>P. chrysogenum</i>	MSI platform/Vitek MS

- 1 klinisch staal: *S. aurantiacum* ipv *S. apiospermum*
 - ID bevestiging met DNA sequencing

INCUBATIETIJD?

- Geen duidelijkheid
- Dermatofyten: incubatietijd van 7 tot 14 dagen
 - 3 dagen lijkt onvoldoende
- Andere filamenteuze fungi: daling percentage bij verlengde incubatie
 - 3 dagen lijkt voldoende

CONCLUSIE

CONCLUSIE

- In vgl met identificatie van bacteriën/gisten:
 - Technisch moeilijker/langer
 - Langere spectrumgeneratie
- In parallel met morfologische identificatie
 - Bevestiging expertise
 - Steriel mycelium?
- Referentiedatabase?
 - Vitek MS < MSI platform



TO DO

1. Vitek MS Mould Kit
2. Dermatofyt agar

