



MALDI-TOF identificatie van atypische mycobacteriën (NTM)

Matthias Weemaes
22/05/2018

CAT vragen

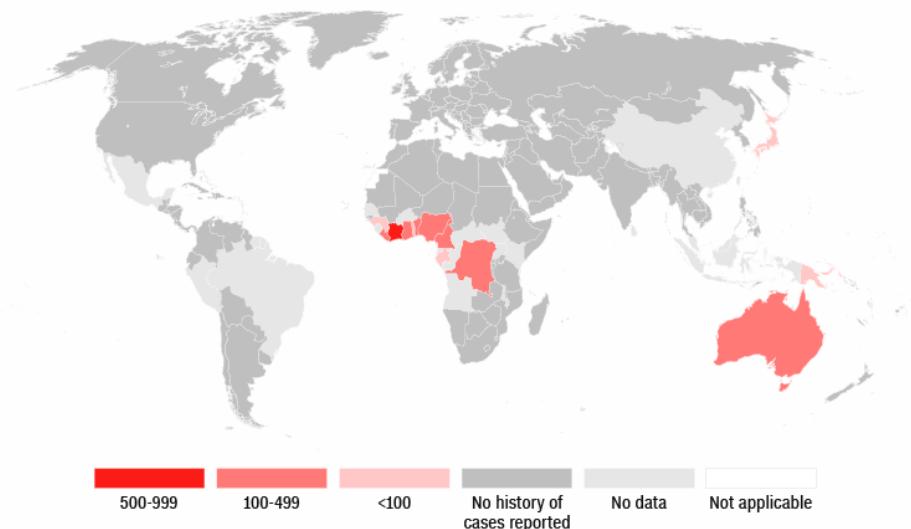
- **Wat is het klinisch diagnostisch belang van mycobacteriën en hun identificatie?**
- **Wat is de performantie van MALDI-TOF MS ter identificatie van atypische mycobacteriën in het labo microbiologie in het ZOL? (literatuur + validatie)**
- **Wat is de plaats van MALDI-TOF MS in het labo microbiologie?**

There were 1900, which rises to 2000-2500.

The environmental reservoir of the disease and how it spreads between humans are unknown. Most cases in Africa are associated with living near marshes and other aquatic environments. But in Australia cases, are often linked to specific modes of transmission such as mosquitoes and possums, according to [Andres Garchitorená](#), researcher at the Institute of Research and Development in France and an expert on Buruli ulcers, who was not involved in the most recent report.



Distribution of Buruli ulcer, 2015 ← *M. ulcerans*

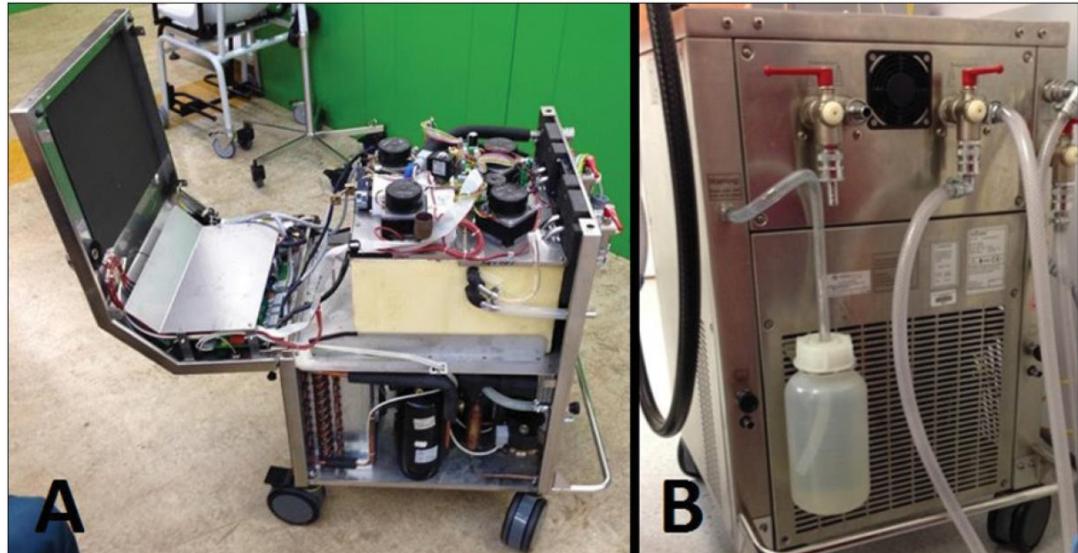


CNN Source: World Health Organisation

"In Australia, it seems more to be a terrestrial transmission whereas in Africa, for example, the strain is very different and is mostly transmitted through aquatic ecosystems," Gachitoren said.

Doctors also do not know why cases are becoming more severe.





Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study



Jakko van Ingen*, Thomas A Kohl*, Katharina Kranzer*, Barbara Hasse, Peter M Keller, Anna Katarzyna Szafrańska, Doris Hillemann, Meera Chand, Peter Werner Schreiber, Rami Sommerstein, Christoph Berger, Michèle Genoni, Christian Rüegg, Nicolas Trillet, Andreas F Widmer, Sören L Becker, Matthias Herrmann, Tim Eckmann, Sebastian Höller, Christiane Höller, Sylvia B Debast, Maurice J Wolfhagen, Joost Hopman, Jan Kluytmans, Merel Langelaar, Daan W Notermans, Jaap ten Oever, Peter van den Belselaar, Alexander B A Vonk, Margreet C Vos, Nada Ahmed, Timothy Brown, Derrick Crook, Theresa Lamagni, Nick Phin, E Grace Smith, Maria Zambon, Annerose Serr, Tim Göting, Winfried Ebner, Alexander Thürmer, Christian Utpatel, Cathrin Spröer, Boyke Bunk, Ulrich Nübel, Guido V Bloemberg†, Erik C Böttger‡, Stefan Niemann‡, Dirk Wagner‡, Hugo Sax†

Summary

Background Since 2013, over 100 cases of *Mycobacterium chimaera* prosthetic valve endocarditis and disseminated disease were notified in Europe and the USA, linked to contaminated heater-cooler units (HCUs) used during cardiac surgery. We did a molecular epidemiological investigation to establish the source of these patients' disease.

Lancet Infect Dis 2017
Published Online
July 12, 2017
<http://dx.doi.org/10.1016/>



European Heart Journal (2015) 36, 2745–2753
doi:10.1093/eurheartj/ehv342

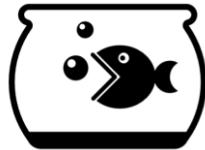
FASTTRACK CLINICAL RESEARCH
Cardiovascular surgery

Healthcare-associated prosthetic heart valve, aortic vascular graft, and disseminated *Mycobacterium chimaera* infections subsequent to open heart surgery

Philipp Kohler¹, Stefan P. Kuster¹, Guido Bloemberg², Bettina Schulthess^{2,3}, Michelle Frank⁴, Felix C. Tanner⁴, Matthias Rössle⁵, Christian Böni⁶, Volkmar Falk^{7,8}, Markus J. Wilhelm⁷, Rami Sommerstein¹, Yvonne Achermann¹, Jaap ten Oever⁹, Sylvia B. Debast¹⁰, Maurice J.H.M. Wolfhagen¹⁰, George J. Brandon Bravo Bruinsma¹¹, Margreet C. Vos¹², Ad Bogers¹³, Annerose Serr¹⁴, Friedhelm Beyersdorf¹⁵, Hugo Sax¹, Erik C. Böttger^{2,3}, Rainer Weber¹, Jakko van Ingen^{16†}, Dirk Wagner^{17†}, and Barbara Hasse^{1†*}

“The growing threat of nontuberculous mycobacteria”

- Alomtegenwoordig
 - Water
 - Grond
 - Aërosol



J.O. Falkinham. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. Journal of Applied Microbiology. 2008

Marras et al. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. Clin Chest Med. 2002

Feazel LM et al. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. Proc Natl Acad Sci USA. 2009

Steve Titmarsh. The growing threat of nontuberculous mycobacteria. 2017

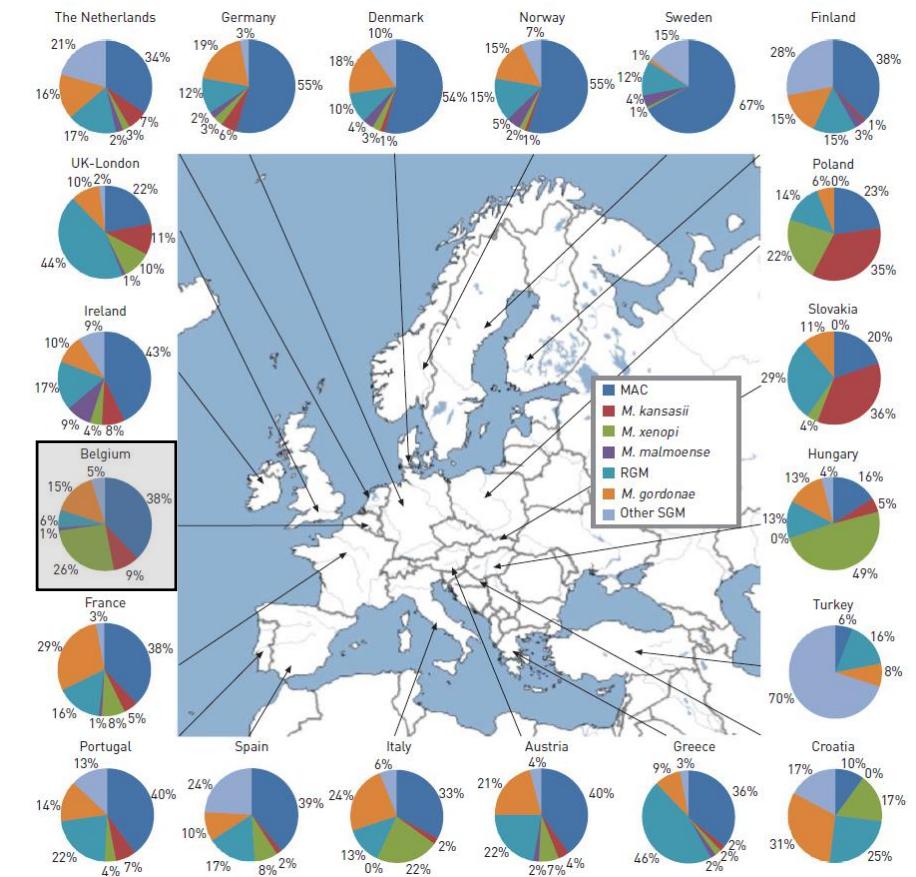
NTM ziektebeelden

- Symptomatologie varieert + aspecifiek
- Orgaanspecifiek + koorts, anorexie, G↓
- Pulmonaire infecties
- Cervicale lymfadenitis
- Huid- en weke delen infecties
- Gedissemineerde infecties



Taxonomie NTM

- >150 species
- Non-TBC en non-lepra mycobacteriën
- Diverse groep
 - Δ Biochemisch
 - Δ Geografisch voorkomen
 - Δ Intrinsieke pathogeniciteit
 - Δ Antibiotica- en desinfectantia- gevoeligheid



Taxonomie NTM

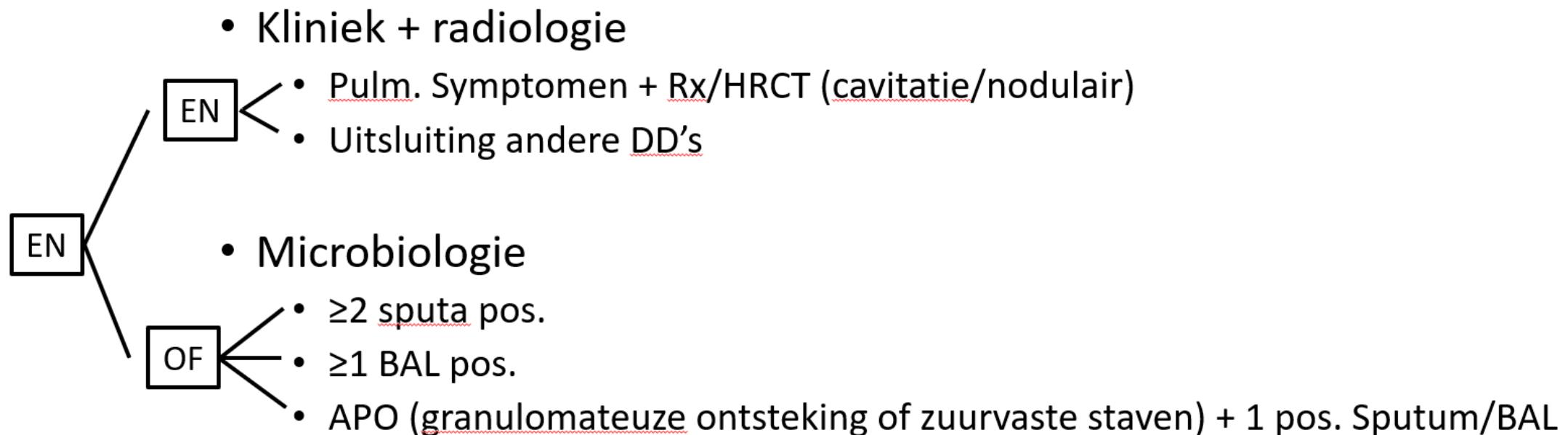
- Runyon 1959
 - O.b.v. groeisnelheid + pigmentaanmaak:
 - Trage groeiers (>7d):
 - Type I: **photochromogeen** d.w.z. pigmentproductie o.i.v. lichtblootstelling
 - Type II: **scotochromogeen** d.w.z. pigmentproductie ondanks groei in het donker
 - Type III: **nonphotochromogeen** d.w.z. niet-sterk gepigmenteerd
 - Snelle groeiers (<7d, maar trager dan meeste andere bacteriën)

Taxonomie NTM

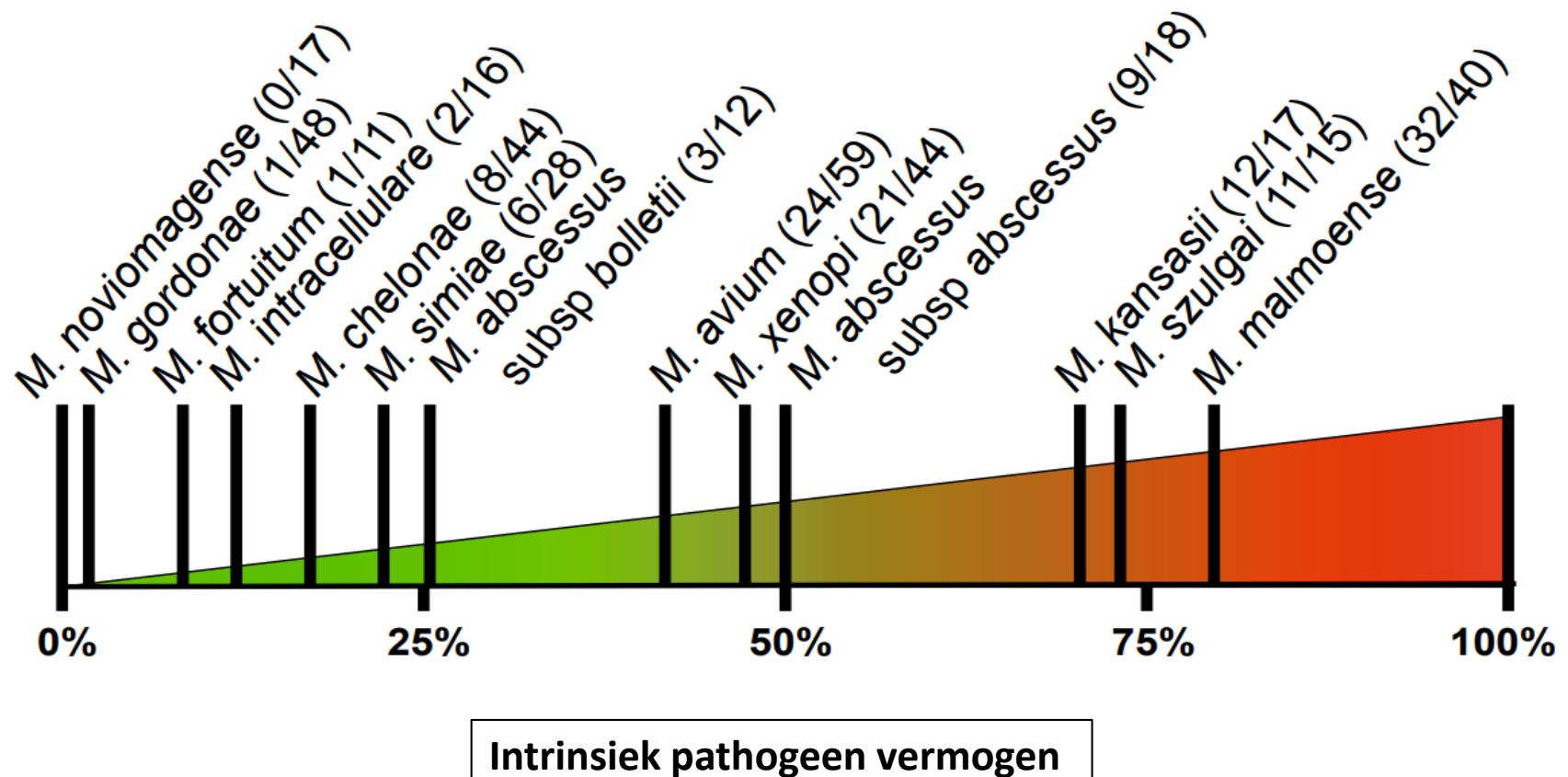
Traag groeiende NTM		Snel groeiende NTM	
<i>Mycobacterium arupense</i>		<i>Mycobacterium kubicae</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycobacterium asiaticum</i>		<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	2	<i>Mycobacterium malmoense</i>	<i>Mycobacterium massiliense</i>
<i>Mycobacterium branderi</i>		<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium celatum</i>		<i>Mycobacterium palustre</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i>
<i>Mycobacterium chimaera</i>	2	<i>Mycobacterium saskatchewanense</i>	<i>Mycobacterium phocaicum</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>		<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium septicum</i>
<i>Mycobacterium florentinum</i>		<i>Mycobacterium shimodei</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium gordonaiae</i>	1	<i>Mycobacterium simiae</i>	<i>Mycobacterium thermoresistible</i>
<i>Mycobacterium heckeshornense</i>		<i>Mycobacterium szulgai</i>	
<i>Mycobacterium intermedium</i>		<i>Mycobacterium triplex</i>	
<i>Mycobacterium interjectum</i>		<i>Mycobacterium terrae</i>	
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	2	<i>Mycobacterium ulcerans</i>	
<i>Mycobacterium kansasii</i>		<i>Mycobacterium xenopi</i>	3

Diagnose NTM-infectie

- IDSA guideline 2007



Klinische relevantie NTM



Identificatie NTM

- ID tot species/subspecies-niveau = belangrijk
- **Zuurvaste** staven -- Ziehl-Neelsen-kleuring 
- **Cultuur:**

- Solide media:
 - Kolonie morfologie (+pigmentatie)
 - Groeisnelheid
 - Kwantificatie
- Vloeibare media:
 - Snellere time-to-detection
 - Contaminatie!
- Combinatie vloeibaar en vast = sensitiviteit ↑



Nauwelijks/niet kweekbaar:

- *M. ulcerans*
- *M. genavense*

Fe-suppl. in medium

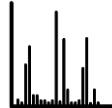
- *M. haemophilum*

MGIT specifiek probleem:

---> *M. xenopi*

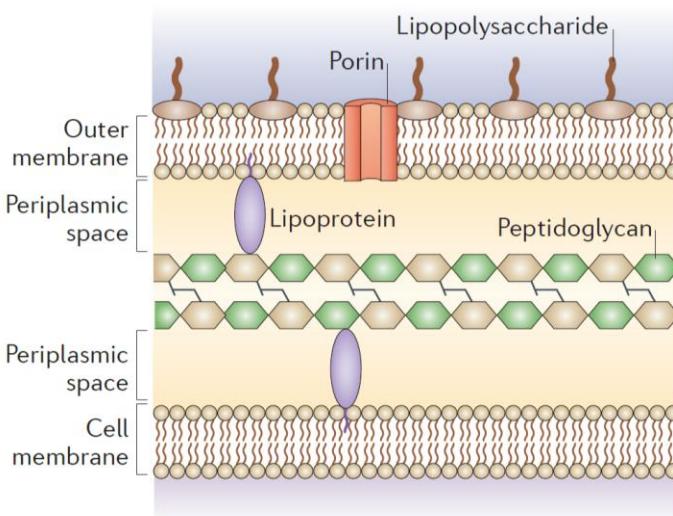
Identificatie NTM

- Groeisnelheid + pigment + biochemie
- Andere methodes:
 - HPLC
 - Maldi-ToF MS
 - Moleculair:
 - PCR
 - Sequencing
- Sequencing:
 - 16S rRNA: ID species/complex
 - Verdere ID subspecies
 - Seq. andere targets
 - hsp65
 - rpoB
 - 16S-23S internal transcribed spacer
 - sod

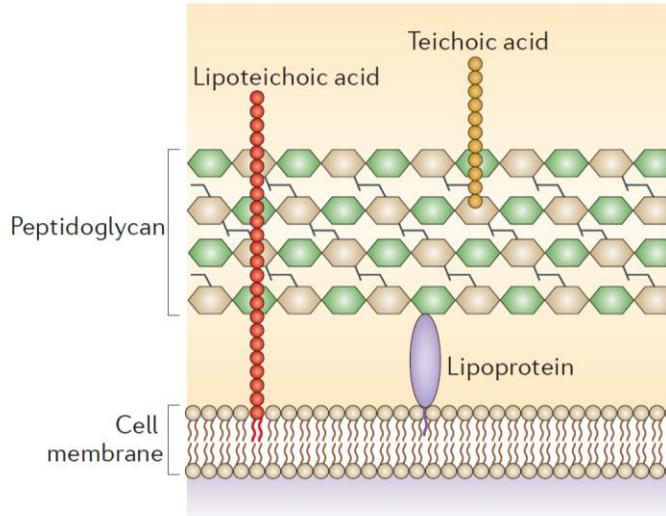


MALDI-TOF MS

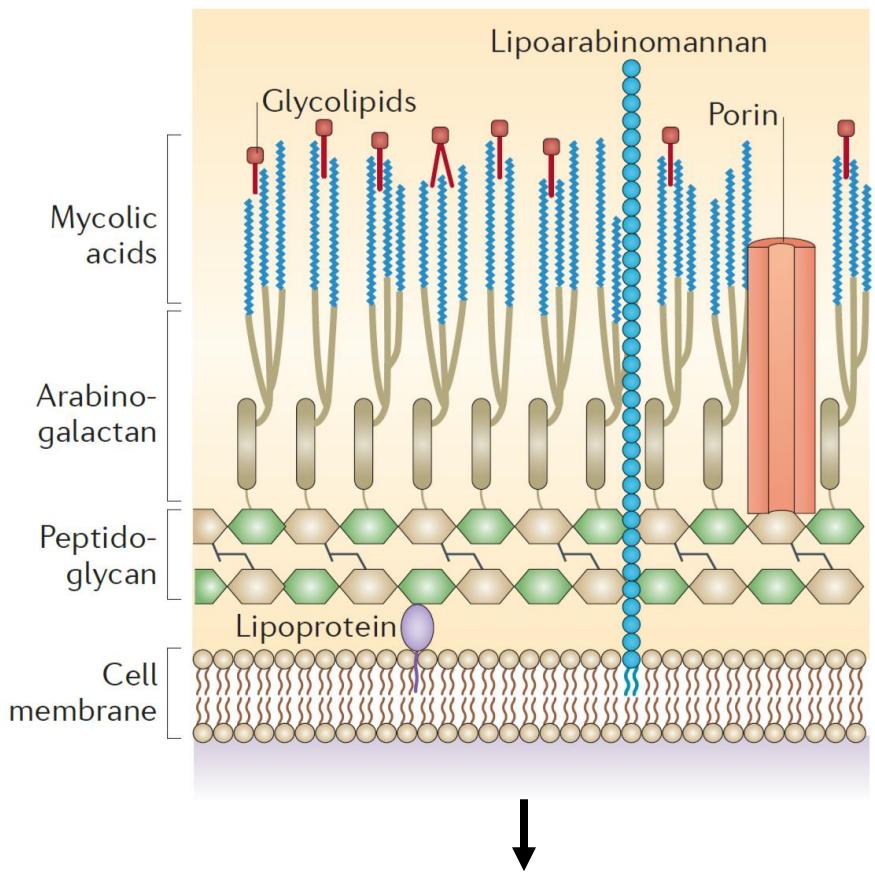
a Gram-negative bacteria



b Gram-positive bacteria



c Mycobacteria



Nood aan extractieprotocol

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

- Literatuur
 - Δ extractieprotocollen
 - Aantal spots
 - Ouderdom stalen
 - Vloeibaar vs. vast medium
 - Effect database
 - Leercurve
 - Mogelijke interferenties
- Praktisch luik
- Plaats MALDI-TOF MS in labo microbiologie (NTM)

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

Artikel	Stalen	Beschrijving stalen		Toestel	Bibliotheek	Spots	'ID rate' MALDI-TOF MS	
Lotz et. al. 2010	82 MGIT 311 LJ	72 NTM 276 NTM →31 species	Klinisch Klinisch + ref.	Bruker Microflex	Andromas database Eigen database	5 spots	LJ: 97% MGIT: 77% → SN: 99% → TR: 79%	
Balada et. al. 2013	70 MGIT (klinisch) 99 7H10/7H11 9LJ	142NTM →13 species	80% klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v1.0	1 spot	Globaal: 98,3% Solide ≈ MGIT	
Buchan et. al. 2014	88 VersaTREK 88 7H11	53 NTM → 15 species	Klinisch	Bruker Microflex	Biolyper v3.1 en Mycobacteria v1.0	2 spots	7H11 v3.1: 50.6% v1.0: 89.8%	VersaTREK v3.1: 68.2% v1.0: 98.8%
Mediavilla et.al. 2014	66 LJ → MALDI 66 MGIT → GenoType	66 NTM →15 species	klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v1.0	3 spots	LJ: 98,5%	
Rodriguez et. al. 2015	125 LJ (klinisch+ref.)	125 NTM →27 species	Klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v2.0	3 spots	LJ: 94,4%	
Van Eck et.al. 2016	54 MGIT	54 NTM →10 species	klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v.2.0	1 spot	Default settings 7H11: 46.3% MGIT: 22.2%	Manual laser+ subcultuur 7H11: 79.6% MGIT: 57.4%
Chien et. al. 2016	151 MGIT	98 NTM →9 species	klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v.2.0	1 spot	MGIT: 25%	
Leyer et.al. 2017	111 7H10 → 108 MGIT	111 NTM →21 species	Klinisch?	Vitek MS	Saramis v4.12 RUO en IVD3.0	2 spots	7H10 Saramis: 67% IVD 3.0: 94%	MGIT Saramis: 62% IVD 3.0: 91%
Huang et. al. 2018	89 MGIT	89 NTM →10 species	klinisch	Vitek MS	IVD V3.0	1 spot	1 ml aliquot MGIT Zonder SDS: 86.7% Met SDS: 89.2%	3 ml aliquot MGIT Zonder SDS: 96.4% Met SDS: 100%

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- Protocollen

	ZOL en ZNA	Mediavilla et al. 2014 / Rodriguez et al. 2015 (enkel L)	Chien et al. 2016	Bruker MycoEX / Van Eck et al. 2016	Balada et al. 2013	Buchan et al. 2014	MS Vittek protocol / Leyer et al. 2017	Huang et al. 2018	
Voorbereiding MGIT	Microtube (schijf)er ID op) Omgaan MGIT breng 1-1,5 ml over in microtube		Duidelijke groei -> A // Geen duidelijke pallet; B				Omgaan MGIT breng ml over in microtube	Omgaan MGIT breng 1 ml over in microtube	
			pipetteer 1,2 ml vanaf de bodem van MGIT over in microtube	Al pipetteer 1,2 ml vanaf de bodem van MGIT over in microtube B1. hele MGIT in centrifugebare tube (max speed gedurende 15min) B2. verwijder alle supernatans behalve laaste 1 ml B3. meng opnieuw op->1,2 ml in microtube overpipetteren	15 min 4100 rpm 100-200 microL van bodem MGIT in microtube (1,5 ml)	2ml uit VersaTREK fles in microtube			
			Verwarm: 30 min op 100°C centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af vortex	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	
	doe 300 microL ultrapore bij overblijvend sediment	doe 300 microL ultrapore bij overblijvend sediment	doe 300 microL ultrapore bij overblijvend sediment	doe 300 microL ultrapore bij overblijvend sediment Verwarm: 30 min op 100°C centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min laat afkoelen tot RT toevoegen 300 microL ultrapore	doe 300 microL ultrapore bij overblijvend sediment Verwarm: 30 min op 100°C centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min laat afkoelen tot RT toevoegen 300 microL ultrapore	doe 300 microL ultrapore bij overblijvend sediment Verwarm: 30 min op 100°C centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min laat afkoelen tot RT toevoegen 300 microL ultrapore			av. wasstap met 500 microL 0,1% SDS voeg 1 ml absolute ethanol toe
Extractie 1	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans toevoegen 500 microL ultrapore	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans toevoegen 500 microL ultrapore	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans toevoegen 500 microL ultrapore	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans toevoegen 500 microL ultrapore Vortex	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het laatste overblijvende vloeistof supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het laatste overblijvende vloeistof supernatans	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans toevoegen 500 microL ultrapore Vortex	voeg 0,9 ml absolute ethanol toe incubatie: 10 min op 37°C Vortex centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans toevoegen 500 microL ultrapore Vortex	av. wasstap met 500 microL 0,1% SDS voeg 1 ml absolute ethanol toe	
	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het laatste overblijvende vloeistof supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het laatste overblijvende vloeistof supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het laatste overblijvende vloeistof supernatans		
	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C 2ml afkoelen tot RT	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C 2ml afkoelen tot RT	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C 2ml afkoelen tot RT	voeg 50 microL ultrapore toe en suspender Verwarm: 30 min op 100°C 2ml afkoelen tot RT		
	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)	voeg 1,2 ml ijskoude (20°C) absolute ethanol bij suspensie (microtube)		
	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Verwijder het supernatans	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af		
	laat sediment drogen aan de lucht	laat sediment drogen aan de lucht	laat sediment drogen aan de lucht	laat sediment drogen aan de lucht					
	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe	Brng alcohol suspensie over in andere microtube	Brng alcohol suspensie over in andere microtube	
Extractie 2	Voeg 10 microL pure Acetonitrile toe (bij duidelijk sediment: 20 microL) Vortex: maximum snelheid gedurende 1 min Visag 10 microL 70% formic acid toe (levenveertje als AN)	Voeg 10 microL pure Acetonitrile toe Vortex: maximum snelheid gedurende 1 min Visag 10 microL 70% formic acid toe	Voeg 10 microL pure Acetonitrile toe Vortex: maximum snelheid gedurende 1 min Visag 10 microL 70% formic acid toe	Voeg 10 microL pure Acetonitrile toe Vortex: maximum snelheid gedurende 1 min Visag 10 microL 70% formic acid toe	Voeg 10 microL pure Acetonitrile toe Vortex: maximum snelheid gedurende 1 min Visag 10 microL 70% formic acid toe	Voeg 10 microL pure Acetonitrile toe Vortex: maximum snelheid gedurende 1 min Visag 10 microL 70% formic acid toe	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe Vortex: maximum snelheid gedurende 15 min Visag 10 microL 70% formic acid toe Centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe Vortex: maximum snelheid gedurende 15 min Visag 10 microL 70% formic acid toe Centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min Decanteer het supernatans centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min pipetteer supernatans af	
	Vortex: 5 sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	Vortex: maximum snelheid gedurende 5 sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	Vortex: plus/minus 5 sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	Vortex: maximum snelheid gedurende 5 sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	Vortex: maximum snelheid gedurende 5 sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	Vortex: maximum snelheid gedurende 5 sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	Vortex: sec centrifugatie: 13.000 RPM gedurende 2 min	
Spotvoorbereiding	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (4x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (3x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (1x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (1x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (1x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (1x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (2x)	SPOT 1ml supernatans op targetplaat (1x)	
	elk stuk: 4 spots 2 met 1 microL supernatans 2 met 2 microL supernatans			opm: meenemen IVD-BTS solution (1ml)	opm: meenemen IVD-BTS solution (1ml)				
	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	
	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix (MOET binnen 30 min)	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	Laat drogen	SPOT onmiddellijk, na het drogen, 1 microL matrix	
				Laat drogen (in MalDI voor ID binnen 24h na klaarmaken)					

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- **Aantal spots**
 - 1-5 spots
 - Meestal 1µL supernatans
- Meer spots = meer kans op ID?
- Lotz et al.
 - Meer spots = kans op ID↑
 - Traag groeiende NTM!

Type (no.) of species	Probability (%) of obtaining good acquisition with:			
	2 replicates	3 replicates	4 replicates	5 replicates
All species tested (337)	67	74	80	87
Fast-growing mycobacteria (159)	79	86	92	99
Slow-growing mycobacteria (178)	57	65	72	79



Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- **Effect Database**

Bibliotheek	Aantal spectra	Aantal species
Bruker Biotyper v3.1	79	42
Bruker Mycobacteria v1.0	173	94
Bruker Mycobacteria v2.0	313	127
Bruker Mycobacteria v5.0/IVD 3.0	912	164
Biomerieux SARAMIS v4.12	1286	45
Biomerieux Vitek IVD 3.0	?	49

- Hoe meer spectra en species = kans op ID ↑
- Vnl. meerwaarde voor ID zeldzamere mycobacteriën
 - Non-identificatie ↓

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- **Vloeibaar vs. Vast**

- Vloeibare media = time-till-detection↓
- **MAAR:**
 - Lagere mycobacteriële load
 - Na extractie: geen (goede) spectra met MALDI-TOF MS
 - Vnl. problematisch voor traag groeiende NTM
- **Oplossing?**
 - Groter aliquot voor extractie
 - Verlengd incuberen na BACTEC incubatie

'ID rate' MALDI-TOF MS	
LJ: 97%	MGIT: 77%
→ SN: 99%	→ TR: 79%
Globaal: 98,3%	Solide ≈ MGIT
7H11 v3.1: 50.6% v1.0: 89.8%	VersaTREK v3.1: 68.2% v1.0: 98.8%
LJ: 98,5%	
LJ: 94,4%	
Default settings 7H11: 46.3% MGIT: 22.2%	Manual laser+ subcultuur 7H11: 79.6% MGIT: 57.4%
MGIT: 25%	
7H10 Saramis: 67% IVD 3.0: 94%	MGIT Saramis: 62% IVD 3.0: 91%
1 ml aliquot MGIT Zonder SDS: 86.7% Met SDS: 89.2%	3 ml aliquot MGIT Zonder SDS: 96.4% Met SDS: 100%

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- **Ouderdom stalen**
 - Stel: analyse MGIT's in batch --> negatieve invloed?
 - Oudere stalen
 - > Slechtere spectra
 - > Spectrum blijft herkenbaar
 - Actieve eiwittranslatie = belangrijk!
- Ouderdom staal = mycobacteriële load ↑
 - Vnl. Traag groeiende NTM!

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- **Leercurve**

- Meer ervaring met extractieprotocol
= betere scores op MALDI-TOF MS
- Belang goede opleiding laboranten

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Literatuur

- **Mogelijke interferenties**

- Decontaminatieprocedure
- Groeisupplement
- Lecithine (löwenstein-jensen agar)
- Staalname
 - Interfererende eiwitten oropharyngeale flora
 - Interfererende humane eiwitten
- Multi-species cultures

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Praktisch luik

- ZOL: validatie MALDI-TOF MS op MGIT (identificatie NTM)
- Stalen: mei 2016 – maart 2018
 - 10 klinische MGIT's → uitgeënt op LJ → MALDI-TOF MS extractie
 - 9 microbank-isolaten → uitgeënt op LJ → MALDI-TOF MS extractie
- Bruker Mycobacteria Library v5.0 (164 species, 912 spectra)
- Bruker MicroFlex MALDI-TOF MS

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Praktisch luik

- Protocol

Voorbereiding vanuit LJ en 7H10	Voorbereiding MGIT	Extractie (deel 1)	Extractie (deel 2)	MALDI-TOF
<ol style="list-style-type: none"> Breng een markeerstreepje aan op een Microtube en identificeer met een (staal)nummer Breng 300µl ultrapore water in de Microtube Breng met behulp van een blauwe (10µl) entlus enkele kolonies in suspensie in de Microtube (vermijd het overbrengen van voedingsbodem) 	<ol style="list-style-type: none"> Breng een markeerstreepje aan op een Microtube en identificeer met een (staal)nummer Meng MGIT op met pasteurpipet Breng 1 à 1.5 ml over in de Microtube met pasteurpipet Centrifugeer 2 min bij 13000rpm →hou rekening met markering! Pipetteer het supernatans af →Pipetteer 'weefselbrok' eraf indien aanwezig Voeg 300µl ultrapore water bij het sediment 	<ol style="list-style-type: none"> Voeg 900 µL absolute ethanol toe aan de suspensie Vortex 5 seconden Incubeer 10 minuten bij kamertemp. Centrifugeer 2 minuten bij 13000 rpm Pipetteer het supernatans af en laat wat vocht achter Voeg 500µL ultrapore water toe en suspender Centrifugeer 2 minuten bij 13000 rpm Pipetteer het supernatans af Voeg 50µL ultrapore water toe en suspender (water over sediment laten lopen, opzuigen en terug over laten lopen) Verwarm gedurende 30 min. op 100°C. →condens = centrifugeer kort! Voeg 1200µL ijskoude absolute ethanol toe (vanuit vriezer: -20°C, opmengen met pasteurpipet!) Centrifugeer 2 min. bij 13000 rpm Pipetteer het supernatans af en laat wat vocht achter Centrifugeer 2 min. bij 13000 rpm Pipetteer het supernatans voorzichtig af Laat het sediment aan de lucht drogen --> kan lang duren (30-45 min) 	<ol style="list-style-type: none"> Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe (400nm) (zie foto lepeltje) Voeg (10µl) pure acetonitrile (AN) toe. →Bij een duidelijk sediment 20µl Vortex gedurende 1 minuut op maximum snelheid Voeg, eenzelfde hoeveelheid als toegevoegde AN, 70% formic acid (FA) toe Vortex 5 seconden Centrifugeer 2 min. bij maximum snelheid Spotten op MALDI-targetplaat (per staal): = 4 spots in toto per staal <ul style="list-style-type: none"> - 2 spots met 2µL supernatans 1µl => drogen => 1µl => drogen - 2 spots met 1µL supernatans 1µl => drogen Laat drogen 	<ol style="list-style-type: none"> Ga na het drogen onmiddellijk naar het L2-lab voor het aanbrengen van matrix Spot 1µl matrix Laat drogen Breng targetplaat in Malditof Gebruik Database op MycobacteriënV3.0 (be ad method!) Lees af door eventueel manueel te beschieten (indien slechte MALDI-TOF MS score: manueel herschieten)

Totale tijd uitvoering: 2 uur
 Hands-on time: 1 uur en 10 min
 Kost extractie per staal: 6 euro

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Praktisch luik

Stammen gegroeid op löwenstein-jensen agar					
		Score			
Stam	Aantal (17)	<1.7	1.7-2.0	>2.0	% ID
M. celatum	1			1	100%
M. avium	6		2	4	100%
M. chimaera/intracellulare	6		1	5	100%
M. immunogenum	1			1	100%
M. gordonae	1			1	100%
M. peregrinum	1		1		100%
M. kansasii	1			1	100%
Totaal Identificatie %					100%

1 *M. chimaera/intracellulare*
= onvoldoende groei

1 *M. marinum/ulcerans*
= niet gegroeid op 37°C
→ opnieuw uitgeënt en
geïncubeerd op 30°C

Klinische stammen (MGIT)					
Stam	Aantal (10)	<1.7	1.7-2.0	>2.0	% ID
M. celatum	1			1	100%
M. avium	3	1	1	1	66%
M. chimaera/intracellulare	4	1	3		75%
M. marinum/ulcerans	1	1			0%
M. kansasii	1			1	100%
Totaal Identificatie %					70%

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Praktisch luik

- Oudste staal = *M. avium* (dec 2016)
= geen ID op MGIT, wel op LJ
- 2 stalen: *M. avium* en *M. kansasii* (Jun 2017)
= beide ID op MGIT

Performantie MALDI-TOF MS op MGIT

--> Praktisch luik

- Meer kans op ID indien:
 - Visueel pellet observeerbaar?
= geen duidelijk effect
 - 2 μ L spot?
= geen verschil tussen 1 μ L of 2 μ L spot
- Belang van manueel herschieten en hogere laserintensiteit!
- Supernatans afpipetteren = verlies mycobacterieel materiaal?
 - Neen, indien voorzichtig
- Spikingexperiment (in MGIT)
 - Zonder incubatie = mislukt
 - Met incubatie = voorlopig succesvol

--> Belang actieve eiwittranslatie (ribosomen) voor analyse MALDI-TOF MS

Antwoorden 3 vragen

- **Wat is het klinisch diagnostisch belang van mycobacteriën en hun identificatie?**

Antwoorden 3 vragen

- **Wat is de performantie van MALDI-TOF MS ter identificatie van atypische mycobacteriën in het labo microbiologie in het ZOL? (literatuur + validatie)**

Antwoorden 3 vragen

- **Wat is de plaats van MALDI-TOF MS in het labo microbiologie?**

Positieve MGIT: Ziehl kleuring uitvoeren

- Indien Ziehl + => rechtstreekse PCR op staal
- Indien MGIT + en Ziehl negatief: macroscopisch bekijken (vlokjes, troebel):
 - Niet suggestief: Ziehl (+ eventueel gram) => indien negatief: buis opnieuw decontamineren
 - Suggestief: sneltest TB

Positief: MTB

doorsturen naar ref. centrum voor AB

negatief: NTM

MALDI-TOF MS voor ID

doorsturen naar ref. centrum voor AB indien klinisch relevant

To do

- Validatie verder afwerken + prospectieve stalen analyseren
- Indien validatie afgerond: overleg met kliniek