

**Critically Appraised Topic**  
**Identificatie van gisten met MALDI-TOF massaspectrometrie.**

Author: Apr. Christophe Indevuyst

Supervisor: Prof. Apr. Katrien Lagrou

Date: 20 maart 2012

**CLINICAL BOTTOM LINE**

---

De identificatie van gisten via MALDI-TOF MS is voornamelijk afhankelijk van de gebruikte extractieprocedure en de aanwezigheid van voldoende referentiespectra in de databank. De invloed van andere factoren zoals voedingsbodem, incubatieduur en -temperatuur, matrix en apparatuur is zeer beperkt.

De klassieke extractie met ethanol en mierenzuur levert de beste resultaten, maar is arbeidsintensief en tijdrovend. Een verkorte procedure met directe applicatie van mierenzuur 70% levert eveneens goede resultaten. De cutoff voor identificatie werd in verschillende studies verlaagd tot logscore  $\geq 1.7$ , met eveneens goede resultaten.

Persoonlijke ervaring leert dat de manuele 'beschieting' van het target en opname van massaspectra die niet aan de strikte criteria van de automatische meting beantwoorden, toch in veel gevallen leidt tot goede identificaties.

Een beperkte uitbreiding van de Bruker databank met 26 goed getypeerde gisten verhoogde de acceptatiegraad van 72% tot 88%. Bij inclusie van duplobepalingen steeg de acceptatiegraad van 82% tot 92%. Opvallend is dat in 84% tot 90% van de identificaties, een zelf gegenereerd referentiespectrum als beste match werd gevonden.

De analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS wordt gehinderd door het beperkt aantal referentiespectra in de Bruker databank. Door uitbreiding van deze databank met 20 extra MSP's (Main Spectra) kunnen de species *C. neoformans* en *C. gattii* betrouwbaar van elkaar te onderscheiden worden. Differentiatie tussen *C. neoformans* var. *grubii* en var. *neoformans* is in theorie mogelijk, maar dient nog verder te worden geëvalueerd met klinische stammen.

## INHOUDSTAFEL

---

<b>Clinical bottom line</b>	<b>1</b>
<b>Inhoudstafel</b>	<b>2</b>
<b>Clinical/Diagnostic scenario</b>	<b>3</b>
<b>Question(s)</b>	<b>3</b>
<b>Search terms</b>	<b>3</b>
<b>Relevant evidence/References</b>	<b>4</b>
<b>Appraisal</b>	<b>7</b>
<b>I. Inleiding</b>	<b>7</b>
a) Principe van MALDI-TOF massaspectrometrie.	7
b) Factoren met invloed op het MALDI-TOF MS resultaat	7
<b>II. Evaluatie huidige procedure</b>	<b>11</b>
a) Acceptatiecriteria (technische validatie)	11
b) Acceptatiegraad	14
<b>III. Literatuuronderzoek</b>	<b>16</b>
a) Overzicht	16
b) Analyse van cryptokokken	17
<b>IV. Experimenteel onderzoek</b>	<b>18</b>
a) Materialen en methoden	18
b) Resultaten	18
1) Uitbreiding databank	18
2) Herevaluatie acceptatiegraad	20
3) Analyse van cryptokokken	21
<b>Comments</b>	<b>22</b>
<b>To do/Actions</b>	<b>22</b>
<b>Bijlagen</b>	<b>23</b>
<b>Bijlage 1: Literatuuroverzicht</b>	<b>23</b>
<b>Bijlage 2: Protocol extractieprocedure Bruker</b>	<b>28</b>
<b>Bijlage 3: Protocol verkorte extractieprocedure<sup>[6][7]</sup></b>	<b>28</b>
<b>Bijlage 4: Protocol uitbreiding MALDI-TOF MS databank</b>	<b>29</b>
<b>Bijlage 5: Protocol acceptatiegraad</b>	<b>31</b>
<b>Bijlage 6: Overzicht van de stammen toegevoegd aan de databank Yeast_Extended</b>	<b>31</b>
<b>References</b>	<b>33</b>

## CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

---

Het gebruik van matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight massspectrometrie (MALDI-TOF MS) voor de identificatie van bacteriën heeft de laatste jaren een hoge vlucht genomen. De identificatie vergt slechts enkele minuten tijd en gebeurt rechtstreeks op gegroeide kolonies. In steeds meer laboratoria vervangt deze nieuwe techniek de klassieke biochemische identificatie van micro-organismen.

Ook voor de identificatie van gisten en schimmels is MALDI-TOF MS een bruikbare techniek. Echter, in tegenstelling tot de identificatie van bacteriën vereist de identificatie van gisten een voorafgaandelijke extractieprocedure om een goed eiwitspectrum te bekomen. Aangezien deze extractie heel wat meer tijd vraagt wensen we met deze CAT op basis van de beschikbare literatuur naar eventuele alternatieven te zoeken. Indien mogelijk zullen eveneens maatregelen worden genomen om de huidige procedure te optimaliseren.

In tweede instantie wensen we de analyse van *Cryptococcus* species via MALDI-TOF te evalueren en na te gaan of het mogelijk is om *C. gatti* en *C. neoformans* via MALDI-TOF tot op (sub)speciesniveau te identificeren.

## QUESTION(S)

---

1. Welke factoren zijn belangrijk voor het bekomen van een goed resultaat voor de MALDI-TOF MS identificatie van gisten?
2. Evaluatie van de huidige manier van werken. Wat is momenteel de acceptatiegraad voor de analyse van gisten en hoe kunnen we deze verbeteren.?
3. Is het mogelijk om het cryptococcon te typeren tot op (sub)speciesniveau d.m.v. MALDI-TOF MS?

## SEARCH TERMS

---

- PubMed: "MALDI TOF yeast"
- MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Spectrometry, Mass, Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization/methods\*; Clinical Laboratory Techniques"

## RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

---

### Reviews

- Wieser A, Schneider L, Jung J & Schubert S. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond (mini review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2011) (Epub ahead of print)
- Croxatto A, Prod'hom G & Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev.* (2011) (Epub ahead of print)
- Steensels D, Verhaegen J & Lagrou K. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of bacteria and yeasts in a clinical microbiological laboratory: a review. *Acta Clin Belg* (2011) **66**: pp. 267-273.

### Original Articles

- Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M & Wilks M. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* (2011) **49**: p. 3441.
- Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I & Mertens AH. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2011) (Epub ahead of print.)
- Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, Iredell JR, Meyer W & Chen SC. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* (2011) **6**: p. e25712.
- Hendrickx M, Goffinet J, Swinne D & Detandt M. Screening of strains of the candida parapsilosis group of the BCCM/IHEM collection by maldi-tof ms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2011) **70**: pp. 544-548.
- Seyfarth F, Wiegand C, Erhard M, Gräser Y, Elsner P & Hipler U. Identification of yeast isolated from dermatological patients by MALDI-TOF mass spectrometry. *Mycoses* (2011) (Epub ahead of print.)
- Quiles-Melero I, García-Rodríguez J, Gómez-López A & Mingorance J. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for identification of candida parapsilosis, C. orthopsilosis and C. metapsilosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2011) (Epub ahead of print).
- Putignani L, Del Chierico F, Onori M, Mancinelli L, Argentieri M, Bernaschi P, Coltella L, Lucignano B, Pansani L, Ranno S, Russo C, Urbani A, Federici G & Menichella D. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic phenotyping of clinically relevant fungi. *Mol Biosyst* (2011) **7**: pp. 620-629.

- Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP & Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J. Clin. Microbiol.* (2011) **49**: pp. 1614-1616.
- McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A & Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* (2011) **49**: pp. 3050-3053.
- Ferroni A, Suarez S, Beretti J, Dauphin B, Bille E, Meyer J, Bougnoux M, Alanio A, Berche P & Nassif X. Real-time identification of bacteria and candida species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* (2010) **48**: pp. 1542-1548.
- Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM & Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* (2010) **48**: pp. 3482-3486.
- van Veen SQ, Claas ECJ & Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* (2010) **48**: pp. 900-907.
- Marinach C, Alanio A, Palous M, Kwasek S, Fekkar A, Brossas J, Brun S, Snounou G, Hennequin C, Sanglard D, Datry A, Golmard J & Mazier D. MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* (2009) **9**: pp. 4627-4631.
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A & Sahl H. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* (2009) **47**: pp. 2912-2917.
- Qian J, Cutler JE, Cole RB & Cai Y. MALDI-TOF mass signatures for differentiation of yeast species, strain grouping and monitoring of morphogenesis markers. *Anal. Bioanal. Chem.* (2008) **392**: pp. 439-449.

#### Reference Works, Handbooks and Databases

- *Cryptococcus gattii* (Vanbreuseghem & Takashio) Kwon-Chung & Boekhout. *Atlas of Clinical Fungi*, CBS 2011.

#### Posters, "grey literature", presentations

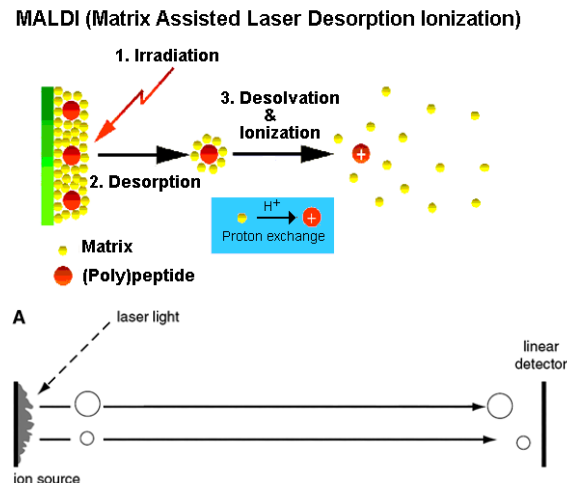
- Firacative C, Maszewska K, Castañeda E & Meyer W. MALDI-TOF mass signatures for the differentiation of the major molecular types/species within the *cryptococcus neoformans/c. gattii* species complex. <http://www.asm2011.org/posters/713.pdf>. (Accessed 11/1/2012).
- Buchan BW; Riebe KM; Anderson NW & Ledebor NA. Evaluation of MALDI-TOF MS for the identification of clinical yeast isolates. Bruker, MALDI Biotyper Poster Hall 2011. Poster 2562.

- Coppens G; Martens K; De Sutter G; Heyligen J & Oris E. Replacement of classical non-automated methods by MALDI-TOF MS for routine identification of bacteria and yeasts. 21<sup>st</sup> ECCMID, 7-10/5/2011, Milan, Italy. P1829.
- Putignani L; Del Chierico F; Fiscarelli E et al. MALDI-TOF mass spectrometry proteome profiling for identification of clinically relevant moulds. 21<sup>st</sup> ECCMID, 7-10/5/2011, Milan, Italy. P97.

## I. Inleiding

### a) Principe van MALDI-TOF massaspectrometrie.

*Matrix-assisted laser desorption/ionisation massspectrometrie*, kortom MALDI-TOF MS, is een relatief nieuwe techniek waarbij een precipitaat van UV-absorberende matrix (hier HCCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid) en een biomolecuul (hier: kolonie) beschoten worden met een laser. Deze beschieting leidt tot ionisatie van het te onderzoeken molecuul. Doordat de meeste energie van de laser wordt geabsorbeerd door de matrix vermijdt dit ongewenste fragmentatie van het te analyseren materiaal. MALDI is dan ook een ‘zachte’ ionisatietechniek.



De geïoniseerde moleculen worden vervolgens versneld in een elektrisch veld en komen terecht in een vacuümbuis. In deze ‘flight tube’ worden de moleculen gescheiden op basis van hun massa over ladingsverhouding waarbij kleine moleculen de detector sneller bereiken dan grote.

Op deze manier kan een compleet eiwitspectrum (‘proteoom’) bekomen worden van een bepaald micro-organisme, wat vervolgens wordt vergeleken met referentiespectra in een databank. Op basis van deze gelijkenis kan met een zekere waarschijnlijkheid de identiteit van een kolonie worden achterhaald. Hoe beter de gelijkenis, hoe hoger de score.

### b) Factoren met invloed op het MALDI-TOF MS resultaat

Heel wat factoren spelen een rol in de resultaten van een MALDI-TOF MS analyse. Dit zijn onder meer matrix, temperatuur, groeimedia, groeifase, analysetoestel en dergelijke meer. De invloed van deze factoren werd reeds vroeger onderzocht<sup>[1][2][3][4]</sup>.

#### 1) Matrix

HCCA-matrix werd weerhouden als de optimale matrix voor de rechtstreekse identificatie van micro-organismen. Andere matrixoplossingen zoals 2,5-dihydroxybenzoëzuur (DHB), ‘ferulic acid’ (FA), ‘sinapinic acid’ (SA) en 2,6-dihydroxyacetofenon (DHAP) resulteerden in vergelijkbare piekpatronen, maar hadden nadelen inzake homogeniteit van het preparaat, automatisatie van de meting, reproduceerbaarheid en aantal pieken.<sup>[5]</sup>

#### 2) Groeimedia

Verschillende samenstellingen van groeimedia hebben eveneens weinig effect op het eiwitpatroon. Voornamelijk in de range van 4000 tot 12000 Da is er quasi geen invloed van het medium op het eiwitspectrum. Ook de aanwezigheid van agar op de MALDI target heeft geen effect en leidt niet tot het verschijnen van additionele pieken.

### **3) Incubatietijd en -omgeving**

Aangezien cellen in de lagfase van groei een zeer gelijkaardig eiwitpatroon hebben als cellen in de logfase, stationaire fase of vroege dood, heeft ook de incubatieduur geen invloed op de accurateheid van MALDI-TOF MS analyses. Dit geldt eveneens voor verschillen in incubatietemperatuur en de aan- of afwezigheid van CO<sub>2</sub>.

### **4) Apparatuur**

Ook de analyse van stalen op verschillende toestellen gaf, indien een gestandaardiseerde voorbereiding werd toegepast, een zeer vergelijkbaar eiwitspectrum. Spectra opgenomen van eenzelfde preparaat met verschillende toestellen van Bruker (Microflex, Autoflex en Ultraflex) waren quasi identiek<sup>[2]</sup>. Dit laat toe dat spectra van verschillende MALDI-TOF MS toestellen kunnen gebruikt worden voor het opbouwen van een betrouwbare MALDI-TOF MS referentiedatabank.

De reproduceerbaarheid van de methodologie is gebaseerd op de meting van constitutief geëxprimeerde eiwitten met hoge abundantie. Dit zijn voornamelijk ribosomale proteïnen. In de massarange 2000-20000 Da bevinden zich zeer weinig metabolieten.

### **5) Extractieprocedure**

In tegenstelling tot de analyse van bacteriën vereist de analyse van gisten via MALDI-TOF MS, wegens hun dikke celwand, een extractieprocedure om een acceptabel eiwitspectrum te bekomen. Daartoe zijn verschillende procedures beschreven.

De conventionele extractieprocedure (zie bijlage 2: is deze zoals beschreven door de fabrikant (Bruker). Deze extractieprocedure met mierenzuur en acetonitrile vergt ongeveer 15 à 20 minuten tijd en omvat 3 centrifugatiestappen. Dit maakt deze procedure moeilijker implementeerbaar in de routine workflow van het laboratorium.

Naast de klassieke extractieprocedure bestaat ook een verkorte procedure<sup>[6][7]</sup> (zie p.28). Hierbij wordt de kolonie op het target gespot en vervolgens bedekt met 1 µL mierenzuur 70%. Na opdrogen wordt vervolgens matrix toegevoegd, waarna het staal op dezelfde wijze als bacteriën wordt geanalyseerd. Deze procedure vergt slechts een 3-tal minuten en bevat geen centrifugatiestappen. De belangrijkste tijdsbepalende factor is de droogtijd van het mierenzuur 70%.

Van Herendael et al.<sup>[6]</sup> rapporteerden in 2011 een acceptatiegraad van 82.8% (op 167 isolaten) voor de identificatie van gisten m.b.v. deze procedure, weliswaar met een verlaagde cutoff (logscore) van  $\geq 1.7$  voor acceptatie op speciesniveau. Er waren geen verkeerde identificaties. Deze manier van werken wordt ook in het UZ Leuven reeds meerdere jaren gebruikt (cfr. infra). Haigh et al.<sup>[7]</sup> rapporteerden eveneens het gebruik van deze verkorte procedure, waarbij echter zuiver mierenzuur wordt gebruikt ipv een 70% oplossing, eveneens met goede resultaten.



## 6) Maldi Biotyper analyse instellingen

Een factor waar in de literatuur weinig aandacht aan wordt besteed, is het manueel 'beschieten' van het target. Persoonlijke ervaring leert dat dit voornamelijk bij gisten, maar ook bij grampositieve staven, een verbetering van de acceptatiegraad kan opleveren. De noodzaak tot manueel beschieten van het target ontstaat wanneer er geen spectra gevonden worden bij de automatische beschieting die aan de strenge criteria voor aanvaarding voldoen. Deze criteria staan standaard beschreven in het bestand MBT\_AutoX en zijn afhankelijk van het bekomen spectrum en de verwerkingsmethode (beschreven in MBT\_Process). Zie ook Figuur 1 en Figuur 2.

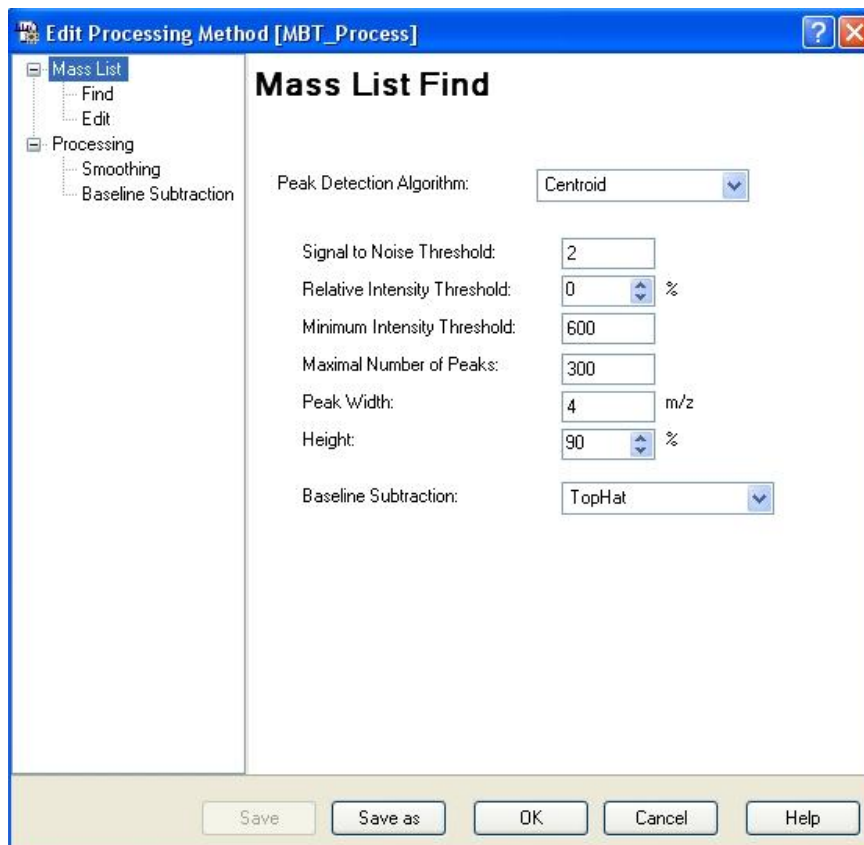
**Figuur 1: evaluatiecriteria voor de automatische acceptatie van spectra.**

The screenshot displays the 'AutoXecute Method Editor' window, version 3.3.142.0, with the method set to 'MBT\_AutoX (Read-only)'. The 'Evaluation' tab is active, showing the following settings:

- AutoXecute Method:** MBT\_AutoX
- General:** Laser, Evaluation (selected), Accumulation, Movement, Processing, MS/MS
- Peak Selection:**
  - Use masses from: 4000 Da to 10000 Da for evaluation and processing
  - Use background list: none for evaluation and processing
- Peak Exclusion:**
  - Ignore the 1 largest peaks in the defined mass range
- Peak Evaluation:**
  - Processing Method: MBT\_Process
  - Smoothing:  On,  Off
  - Baseline Subtraction:  On,  Off
  - Peak: Resolution must be higher than 400
- Fuzzy Control:**
  - Digest/Peptides, Signal Intensity: High
  - Proteins/Oligonucleotides, Maximal Resolution: 10 times above threshold

Buttons at the bottom include Save, Save As, OK, Cancel, and Help.

**Figuur 2: Piekverwerkingsmethode MBT\_Process**



Indien niet aan deze criteria (voornamelijk piekresolutie) voldaan wordt, wordt het spectrum niet opgeslagen. Vooral bij een sterk signaal in de lage massarange (oplopende basislijn) worden spectra vaak verworpen. Indien er manueel geschoten wordt, kan er een dikker of dunner uitgestreken gebied van het preparaat worden gekozen, waar mogelijk een beter resultaat wordt gehaald. Ook is het mogelijk om manueel de intensiteit van de laser te verhogen of te verlagen. Deze instelling kan ook standaard aangepast worden, maar aangezien deze nieuwe instelling dan eveneens gebruikt wordt voor de analyse van bacteriële stalen, wensen wij dit niet te doen.

De ervaring leert ook dat het accepteren van spectra die op het eerste zicht niet optimaal zijn, toch vaak leidt tot goede resultaten. Dit is zeker het geval wanneer gebruik gemaakt wordt van de verkorte extractieprocedure en aangepast acceptatiecriteria (cfr. infra).

#### **Samengevat:**

MALDI-TOF MS is een robuuste analysemethode gebaseerd op de analyse van het eiwitspectrum van micro-organismen. De voornaamste factor voor het verkrijgen van een goede identificatie van gisten is de extractieprocedure.

De conventionele procedure is vrij omslachtig maar leidt tot de beste resultaten. Een verkorte procedure met versoepelde acceptatiecriteria, gebaseerd op de directe applicatie van mierenzuur 70% op de target, leidt eveneens tot goede resultaten en is makkelijk implementeerbaar in het routine laboratorium. Manuele beschieting van het target kan in een aantal gevallen de acceptatiegraad nog verhogen.

## II. Evaluatie huidige procedure

### a) Acceptatiecriteria (technische validatie)

De criteria waaraan een resultaat dient te voldoen voor acceptatie zijn beschreven in het kwaliteitssysteem in document SOP 110: "Identificatie van micro-organismen, uitgevoerd met MALDI BIOTYPER massaspectrometrie", bijlage 2: "Acceptatiecriteria voor MaldiBiotyper". Deze zijn een aanpassing van de originele criteria zoals deze door Bruker zijn vooropgesteld.

Onze acceptatiecriteria luiden als volgt: een identificatie tot op speciesniveau zal aanvaard worden als:

- Alle groene en gele matches van hetzelfde species of complex zijn.
- De beste groene match meer dan 0.200 verschilt ten opzichte van de beste groene of gele match van een ander genus of species.
- Bij een resultaat zonder groene matches, er 5 consecutieve gele en/of rode matches zijn met dezelfde species of complex-identificatie met als hoogste score tenminste één gele match. Ook hier dient er voldoende differentiatie te zijn met de beste gele of rode match van een ander genus of species ( $> 0.200$ ).

Hierbij is een groene match deze met een log-score  $\geq 2.0$ ; een gele match met log-score  $\geq 1.7$  en  $< 2.0$  en een rode met log-score  $< 1.7$ .

Een identificatie zal NIET aanvaard worden:

- Indien alle matches rood zijn.
- Indien er onvoldoende differentiatie is met een goede match van een ander genus of species: identificatie aanvaarden tot op genusniveau OF bijkomende testen uitvoeren voor een definitieve identificatie tot op species niveau.

Naast deze algemene interpretatieregels zijn in dit document eveneens een aantal gevallen beschreven waarvoor bijkomende tests dienen te gebeuren: vb. *S. pneumoniae*, *Shigella* species, *Salmonella* species ea.

Bij deze criteria moet vermeld worden dat er voor bepaalde species geen 5 MSP's (Main Spectra) aanwezig zijn in de databank. Dit betekent dat, wanneer het beste resultaat niet groen is, er nooit een identificatie kan geaccepteerd worden, aangezien er nooit 5 consecutieve gele of rode matches kunnen zijn van hetzelfde species. Enkele voorbeelden hiervan zijn *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. metapsilosis*, *C. orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* ea. Een (beperkt) overzicht van het aantal MSP's per *Candida* species is weergegeven in Figuur 3. (Versie Bruker databank  $n= 3995$ ).

**Figuur 3: Candida species in Bruker databank (n=3995 ) sep 2011**

- [-] Saccharomycetes (0/203)
  - [-] Saccharomycetales (0/203)
    - [+] Dipodascaceae (0/21)
    - [+] Metschnikowiaceae (0/9)
    - [-] mitosporic Saccharomycetales (0/97)
      - [-] Candida (0/97)
        - ..... Candida africana (1/1)
        - ..... Candida albicans (14/14)
        - ..... Candida boidinii (5/5)
        - ..... Candida cariosilignicola (1/1)
        - ..... Candida catenulata (4/4)
        - ..... Candida cylindracea (1/1)
        - ..... Candida dubliniensis (3/3)
        - ..... Candida ernobii (1/1)
        - ..... Candida freyschussii (1/1)
        - ..... Candida friedrichii (1/1)
        - ..... Candida glabrata (7/7)
        - ..... Candida haemulonii (2/2)
        - ..... Candida inconspicua (1/1)
        - ..... Candida intermedia (1/1)
        - ..... Candida lactis-condensi (1/1)
        - ..... Candida magnoliae (2/2)
        - ..... Candida maltosa (1/1)
        - ..... Candida membranifaciens (1/1)
        - ..... Candida mesenterica (2/2)
        - ..... Candida metapsilosis (2/2)
        - ..... Candida multigemmis (1/1)
        - ..... Candida nemodendra (1/1)
        - ..... Candida nitratophila (1/1)
        - ..... Candida nivariensis (2/2)
        - ..... Candida norvegica (1/1)
        - ..... Candida orthopsilosis (3/3)
        - ..... Candida palmioleophila (1/1)
        - ..... Candida parapsilosis (11/11)
        - ..... Candida pararugosa (3/3)
        - ..... Candida peltata (1/1)
        - ..... Candida pini (1/1)
        - ..... Candida rugosa (1/1)
        - ..... Candida sake (1/1)
        - ..... Candida solani (1/1)
        - ..... Candida spandovensis (1/1)
        - ..... Candida succiphila (1/1)
        - ..... Candida thermophila (1/1)
        - ..... Candida tropicalis (9/9)
        - ..... Candida versatilis (1/1)
        - ..... Candida vini (1/1)
        - ..... Candida zeylanoides (2/2)
    - [+] Saccharomycetaceae (0/71)
    - [+] Saccharomycodaceae (0/2)
    - [+] Trichomonascaceae (0/3)

**Samengevat:**

Acceptatie vereist een log-score  $\geq 2.0$  of minimum 5 opeenvolgende hits van hetzelfde speciescomplex met minstens 1 score  $\geq 1.7$ . Het ontbreken van minimum 5 MSP's van ieder species drukt de acceptatiegraad.











## b) Acceptatiegraad

Data uit het validatiedossier dd. 31/5/2010 toonde voor de identificatie van gisten een acceptatiegraad van 62%, gebruik makend van bovenstaande criteria. Aangezien ondertussen ook updates gebeurden van de databank van de MALDI-TOF massaspectrometer, werd een nieuwe prospectieve studie opgezet om de huidige acceptatiegraad van de identificaties van gisten te bepalen (zie bijlage pag. 31).











De acceptatiegraad van identificaties van gisten bedroeg op een totaal van 396 analyses: 72%. Wanneer we rekening houden met het feit dat de gisten standaard in duplo bepaald worden en dat 1 acceptabel resultaat voldoende is, steeg de acceptatiegraad naar 82%.

De voornaamste redenen voor het niet accepteren van bepaalde identificaties is het ontbreken van voldoende stammen in de referentiedatabank. Hieronder enkele regelmatig voorkomende problemen.

- De identificatie van *C. glabrata* leidde in een aantal gevallen tot 4x een gele (score tussen 1.7 en 2.0) of rode (score < 1.7) identificatie, terwijl voor acceptatie 5 consecutieve identificaties noodzakelijk zijn. (Vb. zie onderstaande figuur)

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

- Een andere vaak voorkomende reden voor het niet accepteren van een *C. albicans* resultaat is wanneer er 10 x een *C. albicans* als identificatie uit de bus komt, maar scores zijn telkens lager dan 1.7. Bij herhaling van deze testen wordt dan vaak wel een acceptabel resultaat gegenereerd. (Vb. zie onderstaande figuur.)

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

- Bij het identificeren van gisten uit een Sabouraud buis i.p.v. een plaat is het moeilijk om een mengsel van meerdere soorten op te merken. De identificatie is in dit geval niet acceptabel en bij de 10 beste matches zijn vaak meerdere soorten terug te vinden met onderling weinig verschil in logscore. In dit geval wordt de cultuur opnieuw uitgeënt op chromagar.

- We merken ook op dat identificaties uitgevoerd op gisten in een Sabouraud buis over het algemeen minder goed zijn dan identificaties op plaat. De oorzaak ligt waarschijnlijk bij het feit dat gisten in een Sabouraud buis vaak gesuspendeerd zijn in syneresisvocht wanneer ze op het target geplaatst worden. Sabouraud buizen worden daarom best steeds verticaal bewaard.

**Samengevat:**

De acceptatiegraad bij de analyse van gisten bedraagt 72%. Wanneer de analyses in duplo gebeuren stijgt de acceptatiegraad naar 82%.

### III. Literatuuronderzoek

#### a) Overzicht

Diverse onderzoeksgroepen hebben gepubliceerd over de analyse van gisten d.m.v. MALDI-TOF MS. Een kort overzicht van de literatuur is beschikbaar in bijlage I en onderstaande tabel. De acceptatiegraad in de verschillende studies lag steeds tussen de 81% en 96%, waarbij de hoogste scores behaald werden na extractie via de conventionele methode.

Diverse studies<sup>[8][9][10]</sup> evalueerden het gebruik van een verlaagde cutoff voor de identificatie van gisten op speciesniveau, waarbij men concludeerde dat een verlaagde cutoff tot  $\geq 1.7$  of  $1.8$ , niet leidde tot verkeerde identificaties.

De belangrijkste redenen voor het niet identificeren van bepaalde gisten via MALDI-TOF MS is ofwel het ontbreken van een voldoende aantal pieken in het eiwitspectrum (extractieprobleem) of het ontbreken van voldoende referentiespectra in de databank.

**Tabel I: Literatuuroverzicht analyse van gisten met MALDI-TOF MS.**

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

#### Samengevat:

Diverse studies rapporteren over het gebruik van MALDI-TOF MS voor de identificatie van gisten. Er wordt gebruik gemaakt van zowel de conventionele als de verkorte extractieprocedure en ook de acceptatiecriteria verschillen naargelang de studie. Een verlaagde cutoff tot  $\geq 1.7$  gaf geen aanleiding tot misidentificaties. De acceptatiegraad ligt steeds tussen de 82% en 96%.

De belangrijkste reden voor het niet accepteren van resultaten is het ontbreken van adequate referentiespectra in de databank.



## b) Analyse van cryptokokken

Slechts een handvol studies<sup>[1][9][8][10]</sup> rapporteren over de analyse van cryptokokken via MALDI-TOF MS. Alhoewel de analyseprocedure identiek is aan de analyse van andere gisten zoals *Candida* species, bevat de Bruker databank weinig referentiestammen voor dit genus. (12 MSP's over 7 species waarvan 4 *C. neoformans* en 2 *C. bacillisporus* = *C. gattii*). In de studie van Pinto et al., waar gebruik gemaakt werd van de oudere Bruker databank versie 3.2.1.0 konden slechts 2/6 cryptokokken op speciesniveau worden getypeerd. Dit verklaart dan ook waarom Stevenson et al.<sup>[9]</sup> en McTaggart et al.<sup>[8]</sup> zelf een databank met referentiespectra genereerden van respectievelijk 22 en 26 getypeerde *Cryptococcus* species.

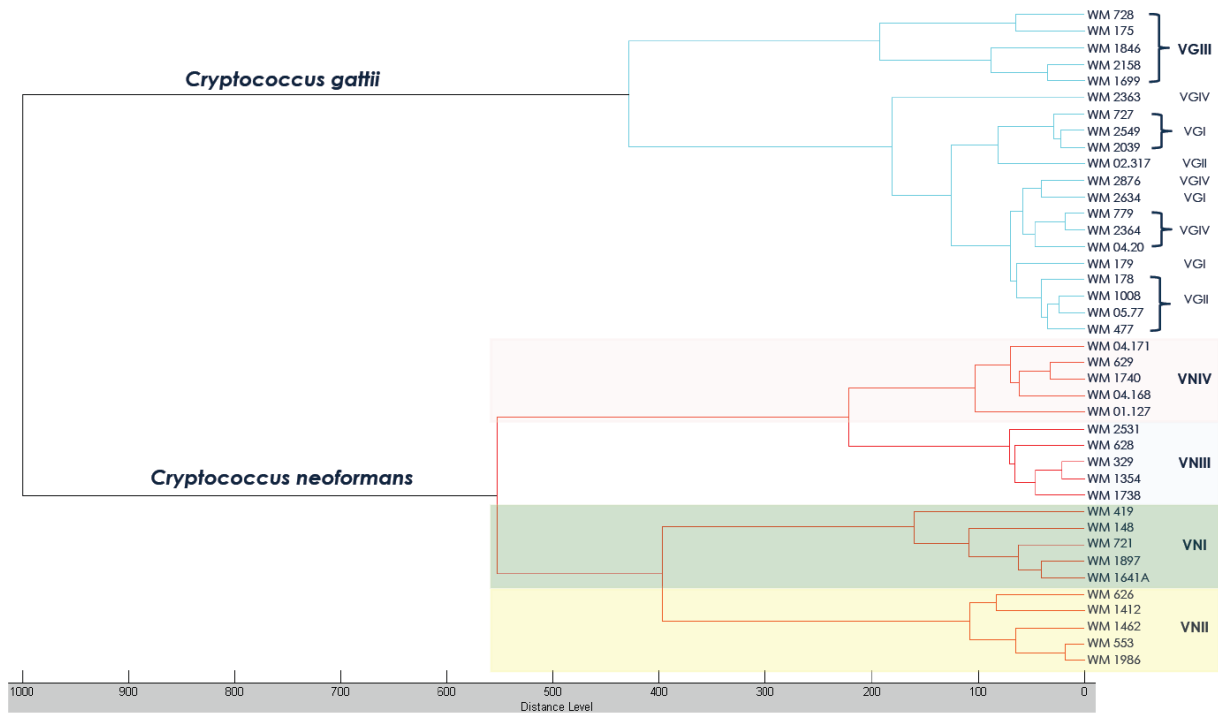
Bij herhaling van de analyse van cryptokokken voor en na de uitbreiding van de databank, steeg de acceptatiegraad bij McTaggart et al. van 58.4% tot 100%. De gemiddelde score na deze uitbreiding steeg significant van  $2.025 \pm 0.167$  tot  $2.266 \pm 0.174$ .

Ook het typeren van *Cryptococcus* isolaten op subspecies niveau via MALDI-TOF MS lijkt veelbelovend. McTaggart et al. slaagden erin 85/86 *C. neoformans* var. *grubii* en *C. neoformans* var. *neoformans* stammen van elkaar te differentiëren. 1 isolaat (var. *neoformans*) werd echter consistent verkeerd geïdentificeerd.

1 poster door Firacative et al.<sup>[12]</sup> onderzocht de mogelijkheden van MALDI-TOF MS voor de differentiatie tussen de verschillende moleculaire types/species binnen het *Cryptococcus neoformans/gattii* species complex. Men genereerde een dendrogram uitgaande MSP's van 5 isolaten van ieder moleculair type. Zoals te zien in onderstaande figuur is het duidelijk mogelijk om de species *gattii* en *neoformans* van elkaar te onderscheiden. Ook de serotypes A (var. *grubii*: VNI, VNII), D (var. *neoformans*: VNIV), AD (VNIII), B (*gattii*: VGI, VGII, VGIII, VGIV) en C (*gattii*) zijn duidelijk van elkaar te differentiëren.

Aangezien de verschillende moleculaire types van *Cryptococcus gattii* slechts van elkaar verschillen door verschillende single nucleotide polymorfismen (SNP's), is verder onderzoek vereist om op basis van MALDI-TOF MS, dit onderscheid te maken.

**Figuur 4: Firacative et al. MALDI-TOF MS spectra van de verschillende *C.neoformans/gattii* moleculaire types.**



## IV. Experimenteel onderzoek

Aangezien uit de literatuur blijkt dat het ontbreken van referentiespectra de belangrijkste reden is voor het niet accepteren van resultaten op MALDI-TOF, zullen we trachten onze resultaten te verbeteren door uitbreiding van de databank.

### a) Materialen en methoden

Ingevroren referentiestammen en met ITS2-FLP analyse getypeerde isolaten werden uitgedroogd en opnieuw in cultuur gebracht op Sabouraud agar. Na overenting werd vervolgens een conventionele extractie met ethanol en mierenzuur uitgevoerd, waarna eiwitspectra werden opgenomen. Deze spectra werden vervolgens geanalyseerd op consistentie. Na deze analyse (en het verwijderen van slechte spectra) werden referentiespectra (MSP) gegenereerd. Deze MSP's werden vergeleken met spectra reeds aanwezig in de Bruker databank. Indien geen overlapping met spectra van een ander species, werd het gegenereerde MSP opgenomen in de databank Yeast\_Extended.

De volledige procedure is in detail beschikbaar in bijlagen 2 en 4.

### b) Resultaten

#### 1) Uitbreiding databank

Initieel werden 26 gisten toegevoegd aan de databank, waarna de retrospectieve analyse van de acceptatiegraad werd uitgevoerd. In tweede instantie werd de databank nog eens met 18 verschillende stammen van cryptokokken (serotypes A, B, C en D) uitgebreid. (Zie Tabel II)

**Tabel II: Stammen toegevoegd aan databank Yeast\_Extended**

<b>Species</b>	<b>Aantal</b>
Candida albicans	1
Candida dubliniensis	1
Candida glabrata	5
Candida guilliermondii	3
Candida krusei	6
Candida parapsilosis	1
Candida tropicalis	1
Cryptococcus gattii serotype B	5
Cryptococcus gattii serotype C	3
Cryptococcus neoformans var. grubii	6
Cryptococcus neoformans var. neoformans	6
Geotrichum capitatum	2
Saccharomyces cerevisiae	4

Bij vergelijking van de nieuw gegenereerde spectra met de spectra die reeds aanwezig waren in de databank waren er geen foutieve identificaties.

## 2) Herevaluatie acceptatiegraad

Zoals reeds beschreven in punt II was de acceptatiegraad met de Bruker databank 72%. Bij analyse in duplo steeg deze naar 82%. Na uitbreiding van de databank werden de spectra (n=396) waarop deze acceptatiegraad werd berekend opnieuw geanalyseerd. De acceptatiegraad steeg in dit geval naar 88% zonder duplobepaling en 92% indien de duplo's werden meegerekend.

De acceptatiegraad werd eveneens opnieuw prospectief geëvalueerd. Dagelijks werden de resultaten van de routine analyse van gisten bijgehouden en geanalyseerd. Hierbij werden de resultaten van de retrospectieve studie bevestigd. De acceptatiegraad bedroeg in deze prospectieve evaluatie 88% als singlebepaling en 93% voor de duplobepalingen.

Het overzicht van de resultaten is beschikbaar in onderstaande Tabel III.

Opvallend was dat in 90% van de goede identificaties (330/368), een zelf toegevoegd MSP uit de Yeast-Extended databank als beste hit uit de bus kwam. Ook in de prospectieve evaluatie waren de meerderheid van de beste scores (84%) te wijten aan MSP's uit de nieuwe databank.

**Tabel III: Acceptatiegraad voor en na uitbreiding van de databank (retrospectief n=396, prospectief n=497)**

Acceptatiegraad	Enkelvoudige analyse	Duplo analyse	Yeast_Extended beste score
... vóór uitbreiding.	72%	82%	
... na uitbreiding	88%	92%	90%
prospectief	88%	93%	84%

Een verklaring voor deze resultaten werd nog niet gevonden. Mogelijk is er een selectie waarbij de MSP's uit Yeast\_Extended beter overeenkomen met de Belgische epidemiologie. Daarnaast zijn de groeiomstandigheden en voedingsbodems waarmee de MSP's werden gegenereerd dezelfde als deze waarop isolaten uit de laboratoriumroutine worden gekweekt. Nochtans hebben vroegere studies reeds aangetoond dat de invloed van groeiomstandigheden op de spectra minimaal is.

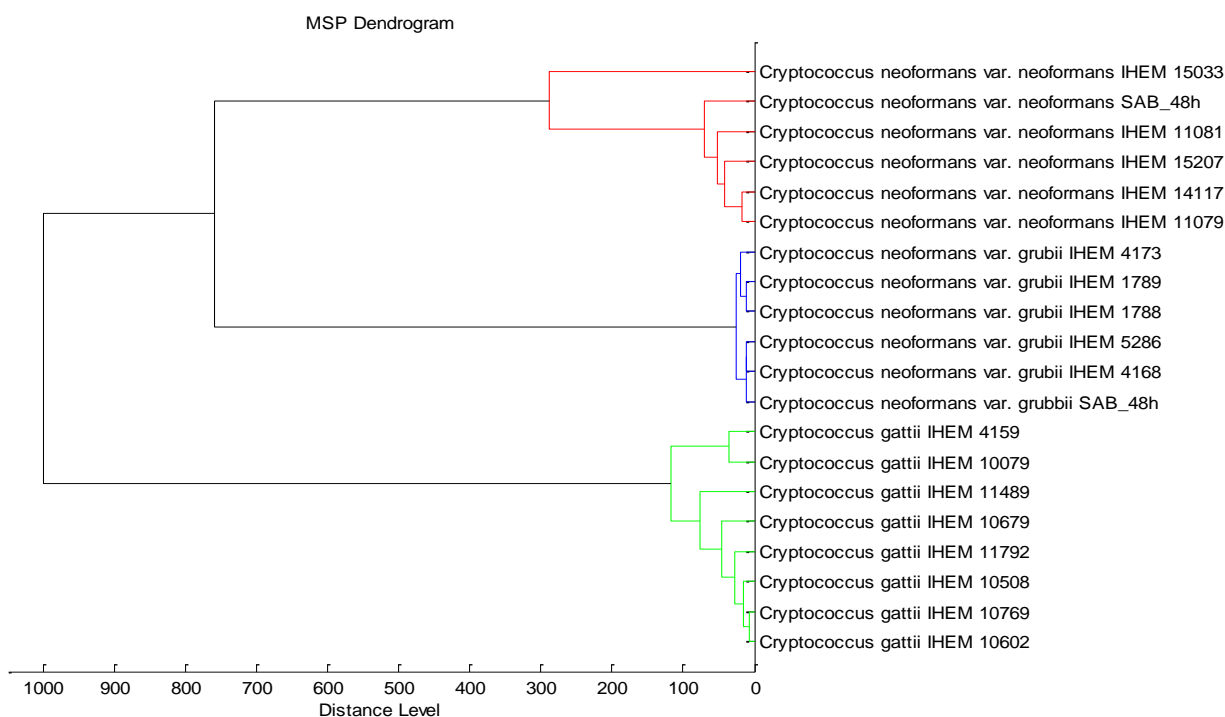
### Samengevat:

Een beperkte uitbreiding van de MALDI-TOF databank leidde tot een stijging in acceptatiegraad van 72% tot 88% (analyse in enkelvoud) of van 82% tot 93% (analyse in duplo). Opvallend is dat in 84% tot 90% van de identificaties, een zelf toegevoegd MSP als beste match wordt gevonden.

### 3) Analyse van cryptokokken

In totaal werden 20 extra referentiespectra toegevoegd aan de databank Yeast\_Extended. Zoals te zien in onderstaande Figuur 5 is er een duidelijk onderscheid tussen de spectra van *C. neoformans* en *C. gattii*. Een evaluatie van de identificatie met referentiestammen gaf geen enkele verkeerde identificatie op speciesniveau.

**Figuur 5: Dendrogram van cryptokokken MSP's in Yeast\_Extended**



Naast de differentiatie *C. neoformans* vs. *C. gattii* werd ook onderzocht of het mogelijk is om *C. neoformans* var. *grubii* en var. *neoformans* van elkaar te onderscheiden. Bij gebrek aan voldoende klinische stalen werd gebruik gemaakt van referentiestammen.

In eerste instantie werden alle referentiestammen opnieuw geanalyseerd na een verkorte extractieprocedure en met de 'routine' acceptatiecriteria. De acceptatiegraad op speciesniveau als single-bepaling bedroeg 62%, bij analyse in duplo was deze 68%. De beste hit was bij 33/34 analyses ook correct tot op subspeciesniveau. In 1 geval werd *C. neoformans* var. *neoformans* gerapporteerd in plaats van *grubii*. De score was echter 1.547 en dus niet acceptabel. Bij deze verkorte extractieprocedure was de gemiddelde score 1.860 (range: 1.545-2.071). De voornaamste reden voor de lagere acceptatiegraad ligt bij de analyse van *C. neoformans* var. *grubii*. Bij 8/10 analyses was er een ander species (*Cryptococcus gattii*, *Enterococcus faecium*, ...) op de 4<sup>e</sup> of 5<sup>e</sup> plaats van de analyseresultaten, waardoor de beste hit, alhoewel correct, niet kon aanvaard worden.

In tweede instantie werd ook een nieuwe analyse uitgevoerd van de referentiestammen na conventionele extractie. De acceptatiegraad op (sub)speciesniveau bedroeg 100%. De gemiddelde logscore was 2.593 (range: 2.10-2.744).

Deze resultaten na conventionele extractie moeten met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden omdat dit dezelfde stammen zijn waarvan ook het referentiespectrum werd opgenomen in de databank. De typering op subspeciesniveau dient nog verder geëvalueerd te worden met klinische stalen. Voorzichtigheidshalve wordt hiervoor best een conventionele extractie gebruikt, waarbij vermoedelijk ook hogere cutoff waarden voor acceptatie zullen moeten worden gehanteerd. Mogelijk biedt het gebruik van subtyping MSP's hier een voordeel.

#### **Samengevat:**

Door uitbreiding van de databank met 20 nieuwe referentiespectra van *C. gattii* en *C. neoformans* kunnen deze species via MALDI-TOF MS van elkaar onderscheiden worden.

Subtypering van *C. neoformans* in var. *grubii* en var. *neoformans* lijkt op dit moment veelbelovend, maar dient nog verder te worden geëvalueerd. Het gebruik van de conventionele extractiemethode met aangepaste (strengere) cutoff waarden lijkt hiervoor aangewezen.

#### **COMMENTS**

---

#### **TO DO/ACTIONS**

---

- Sabouraud buizen worden vanaf nu steeds rechttoep bewaard vooraleer analyse op MALDI-TOF.
- Verdere evaluatie van subtypering van cryptokokken met nieuwe klinische stalen en eventueel het gebruik van subtyping MSP's.

**Bijlage I: Literatuuroverzicht**

STUDIE	ONDERWERP, POPULATIE, CRITERIA EN RESULTATEN	CONCLUSIE
<p>Pinto et al.<sup>[11]</sup> 2011 Sydney, Australië</p>	<p>Identificatie referentiestammen (n=30): score <math>\geq</math> 2,0 (species): 67%; score <math>\geq</math> 1,7 (genus): 80%</p> <p>Identificatie klinische stalen Candida (n=148): 84% correcte identificatie met score <math>\geq</math> 2,0 en 96% met score <math>\geq</math> 1,7.</p> <p>Prospectieve studie correcte identificatie: 79% score <math>\geq</math> 2,0; 91% score <math>\geq</math> 1,9 en 94% score <math>\geq</math> 1,7. Alle testcores <math>\geq</math> 1,7 hadden correcte identificaties.</p> <p>Eiwitextractie (klassieke methode Bruker) is noodzakelijk voor identificatie.</p>	<p>Geen major errors.</p> <p>Spectra scores <math>\geq</math> 1.7 waren allen correct.</p> <p>“The ability to provide species-level identification is dependent on the number of entries per species in the manufacturer’s database, usually being higher for common isolates.”</p> <p>“MALDI-TOF MS was less reliable in distinguishing <i>C.gatti</i> from <i>C.neoformans</i> compared with biochemical methods.”</p>
<p>Van Herendael et al.<sup>[6]</sup> 2011 Antwerpen, België.</p>	<p>Evaluatie en vervolgens validatie van een verkorte extractieprocedure voor gist. Evaluatie op 54 klinische gistisolaten en validatie op 167 andere stammen.</p> <p>163/167 isolaten (97.6%) werden correct geïdentificeerd tov conventionele methoden (Chromagar, VITEK II en API 20C AUX) gebruik makend van een verlaagde cutoff (logscore) van 1,7.</p> <p>Acceptatiegraad (logscore <math>\geq</math> 1,7): 135/167 (82.8%).</p>	<p>“The identification of clinical yeast isolates with the modified protocol is a practical and accurate alternative for the laborious standard procedure, although the log-scores will be lower. If the isolate shows a log-score below 1.7, the standard extraction procedure should be used.”</p>
<p>Hendrickx et al.<sup>[13]</sup></p>	<p>163 <i>C.parapsilosis</i> stammen van BCCM/IHEM verzameling werden opnieuw geïdentificeerd met ITS sequencing en via MALDI-TOF MS. 4.3% waren <i>C.</i></p>	<p>“The reason for the more problematic identification of <i>C. metapsilosis</i> and <i>C. orthopsilosis</i> is probably that more reference profiles are available in the database, provided by the manufacturer for <i>C.</i></p>

<p>2011</p> <p>WIV, Brussel, België</p>	<p>metapsilosis en 3% <i>C. orthopsilosis</i>.</p> <p>MALDI-TOF MS via de verkorte methode (cfr. Van Herendael et al.) werd eveneens geëvalueerd voor deze identificatie.</p> <p>148/163 (90.7%) kon onmiddellijk geïdentificeerd worden met de verkorte methode. Stalen met ondetecteerbare spectra en scores <math>\leq 1.7</math> werden opnieuw geanalyseerd met de klassieke extractie. In totaal konden 16/25 geïdentificeerd worden met scores <math>\geq 1.7</math>. Totaal goede identificaties: 99.3%.</p> <p>10/12 <i>C. orthopsilosis</i>/metapsilosis stammen dienden met de klassieke extractieprocedure te worden geanalyseerd voor een goede identificatie (score <math>\geq 1.7</math>). Echter, zelfs indien identificatie een slechte of onbetrouwbare score opleverde waren de beste matches correct.</p>	<p>parapsilosis, making the change of unambiguous identification higher.”</p> <p>Totaal aantal goede identificaties met verkorte procedure: 90.7%. Bij aanvulling met klassieke extractie liep dit op tot 99.3%.</p>
<p>Dhiman et al.<sup>[14]</sup></p> <p>2011</p> <p>Rochester, Minnesota, USA</p>	<p>Vergelijking MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Microflex LT, Biotyper 2.0) met fenotypische methoden. De conventionele extractieprocedure werd gebruikt. (n=261)</p> <p>Goede identificaties met score <math>\geq 2.0</math>: 92% (enkel inclusie van species aanwezig in de databank, n=138). Verlaging van de acceptatie cutoff naar <math>\geq 1.8</math> verhoogde deze performantie naar 96.3%, zonder verkeerde identificaties. Alle analyses gebeurden in duplo.</p> <p>Berekende kost en tijd: 0.50\$ en 5.1 minuten hands-on time per isolaat.</p>	<p>Performantie score <math>\geq 2.0</math> (enkel species aanwezig in databank): 92%. Verlaging van de cutoff tot <math>\geq 1.8</math> verhoogt de performantie tot 96.3%, zonder misidentificaties.</p> <p>In een retrospectieve analyse (n=103) was de performantie respectievelijk 81.6% en 84.5%. Opnieuw werden species niet aanwezig in de databank geëxcludeerd.</p>
<p>Firacative et al.</p> <p>2011</p> <p>Sydney, Australië</p>	<p>40 cryptokokken isolaten (5 van elk van de 8 genotypes) werden geanalyseerd dmv MALDI-TOF. Referentiespectra werden opgebouwd na (conventionele) extractie.</p> <p>“The number of colonies, length of incubation of the strains and the</p>	<p>The MALDI-TOF MS method is useful for the specific differentiation of human pathogens <i>C. neoformans</i> and <i>C. gattii</i>.</p> <p>Considering that different molecular types within the <i>C. neoformans gattii</i> species complex are characterized by different SNPs, further</p>



	extraction method did not affect the obtained results.”	studies are warranted to investigate the use of MALDI-TOF for strain typing, due to the fact that the application of this technique for typing of SNPs has made important progress.
Haigh et al. <sup>[7]</sup> 2011 London, Engeland	<p>2020 isolaten uit routinewerking van het microbiologielaboratorium werden geanalyseerd via de directe analysemethode op een Bruker Microflex MS systeem. 88.3% was onmiddellijk identificeerbaar.</p> <p>De niet-geïdentificeerde isolaten werden opnieuw op het target aangebracht en bedekt met 1µL zuiver mierenzuur. Na drogen werd matrix aangebracht en gebeurde de analyse verder volgens de klassieke manier. Dit leidde tot 10,9% extra identificaties.</p>	<p>“With the addition of in situ cell lysis by formic acid, we have shown that it is possible to increase the successful identification rate to 99.2%, using a direct smear method without having to resort to the more time-consuming alcohol extraction method.”</p> <p>In our experience, yeasts and gram-positive bacilli should be processed immediately with the formic acid step, thereby reducing processing time.”</p>
McTaggart et al. <sup>[8]</sup> 2011 Ontario, Canada	<p>Analyse van 160 gisten, waarvan 137 cryptokokken.</p> <p>Gouden standaard: ITS sequencing + IGS sequencing voor onderscheid <i>Cryptococcus</i> species.</p> <p>Groei op inhibitory mold agar, waarna conventionele extractie gevolgd door analyse op een Bruker Microflex LT massaspectrometer, Flexcontrol 3.0; Biotyper 2.0.1 software en databank.</p> <p>Cutoff initieel <math>\geq 2.0</math>, echter <math>\geq 1.7</math> gaf geen foutieve resultaten.</p>	<p>“Because of the paucity of <i>Cryptococcus</i> species in the Bruker Daltonics Biotyper 2.0.1 database, we generated our own library entries consisting of type and reference strains and one clinical <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> isolate as determined by IGS analysis.</p> <p><i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i> en var. <i>neoformans</i> were distinguished at the subspecies level in 98.8% (85/86) of the cases. However, one isolate was misidentified as <i>C. neoformans</i> var. <i>grubii</i>.</p> <p>“... similar to other studies, our results show accurate species identification with spectral scores <math>\geq 1.7</math>, suggesting that a threshold of 1.7 is more appropriate for <i>Cryptococcus</i> species identification ...”</p>
Stevenson et al. <sup>[9]</sup> 2010	Zelf opgebouwde databank van gisten: 44 species in 8 genera (totaal 109 stammen). Opmerkelijk: 11 ATCC referentiestammen bleken andere species te zijn, zoals onderzocht met sequencing. Deze werden geëxcludeerd voor de opbouw van de databank.	<p>MALDI-TOF identificeerde 99.0% correct en alle scores <math>\geq 1.8</math> voorspelden de correcte species identiteit. Stammen, niet aanwezig in de databank, werden uitgesloten van analyse.</p> <p>Met 1 spot kon 89.6% geïdentificeerd worden, 2 spots lieten</p>

Bethesda, USA	<p>Analyse gebeurde in viervoud, na conventionele extractie en met als cutoff voor aanvaarding een log-score <math>\geq 1.8</math>. Er werden telkens 1000 spectra opgenomen.</p> <p>Databank validatie gebeurde met 197 klinische stalen</p>	<p>identificatie toe van 97.4% van de isolaten.</p> <p>“In the current study and earlier reports, organisms not identified by MALDI-TOF resulted from a low spectral score due to an insufficient number of peaks, or the absence of the organism from the database.”</p>
Van Veen et al. <sup>[4]</sup> 2010 Leiden, Nederland	<p>Analyseprotocol: eerst rechtstreekse analyse, indien slechte spectra werd voorbehandeling uitgevoerd cfr. Bruker. Matrix HCCA. Flexcontrol 3.0, Biotyper database 2.0. Acceptatiecriteria: genus <math>\geq 1.7</math>; species <math>\geq 2.0</math></p> <p>Totaal 61 gisten, 7 genera, 12 species.</p>	<p>Correcte speciesidentificatie: 85.2% van de gisten.</p> <p>Misidentifications were clearly associated with an absence of sufficient spectra from suitable reference strains in the MALDI-TOF MS database.</p>
Marklein et al. <sup>[10]</sup> 2009 Bonn, Duitsland.	<p>18 ATCC stammen en 267 klinische isolaten werden getest. Er werd vergeleken met conventionele fenotypische en biochemische tests zoals API ID 32C.</p> <p>Accurate speciesidentificatie voor 247/267 stammen (92.5%).</p> <p>Toestel: Bruker Microflex LT, Flexanalysis 2.0 en 1.1. Er werd gebruik gemaakt van de conventionele extractieprocedure. Acceptatiecriteria: genus logscore <math>\geq 1.7</math> ; species logscore <math>\geq 2.0</math></p>	<p>The absence of a suitable reference strain from the MALDI-TOF MS database was clearly indicated by logscore values too low for the respective clinical isolates; ie. No false-positive identifications occurred.</p> <p>After complementation of the database, all isolates were unambiguously identified.</p>
Mellmann et al. <sup>[2]</sup> 2008 Muenster, Duitsland.	<p>Men ging oa na wat de reproduceerbaarheid was van een MALDI-TOF MS analyse op 3 verschillende Bruker toestellen, 4 verschillende voedingsbodems en na verlengde groei (tot 7 dagen) op kamertemperatuur, aan de hand van verschillende stammen non-fermenters.</p>	<p>“We conclude that by using the established MALDI BioTyper database, the reproducibility is high and independent of the mass spectrometer instrument used and the conditions tested.”</p>
Valentine et al. <sup>[3]</sup> 2005	<p>4 verschillende media (Standaardmedium (B. subtilis in TSB, E. coli en Y. enterocolitica in LB), M9, TSA_BA en CAB.)</p>	<p>A significant number of ions are common to each bacterium in all 4 growth media used in this study. The presence of proteins common to all growth conditions is not unexpected as many genes are known to</p>

Washington, USA.	Cave: deze studie maakte gebruik van ferulic acid als matrix en een PerSeptive Biosystems Voyager-DE RP MALDI-TOF.	be constitutively expressed and perform housekeeping functions in the cell. Thus it is not surprising that a specific set of low-molecular-weight, constitutively expressed proteins form ions in the MALDI-MS signature, regardless of culture conditions.
------------------	--	---

## **Bijlage 2: Protocol extractieprocedure Bruker**

- Suspendeer verschillende kolonies (2-5) in 300  $\mu\text{L}$  gedistilleerd water in een Eppendorf tube.
- Voeg 900  $\mu\text{L}$  absolute ethanol toe en vortex.
- Centrifugeer 2 minuten aan 1300 rpm.
- Verwijder supernatans.
- Centrifugeer opnieuw 2 minuten aan 1300 rpm.
- Verwijder supernatans.
- Laat 3-4 minuten drogen op kamertemperatuur.
- Voeg 50 $\mu\text{L}$  mierenzuur 70% toe en vortex.
- Voeg 50  $\mu\text{L}$  absolute ethanol toe en vortex opnieuw.
- Centrifugeer 2 minuten aan 1300 rpm.
- Plaats 1  $\mu\text{L}$  op de MALDI target en laat drogen op kamertemperatuur.
- Overdek de spot met 1  $\mu\text{L}$  matrix (alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile en 2.5% trifluoroazijnzuur) en laat drogen aan de lucht.
- Analyseer.

Deze extractieprocedure duurt ongeveer een 15 à 20 minuten. De verschillende centrifugatiestappen bemoeilijken de vlotte integratie in de laboratorium workflow.

## **Bijlage 3: Protocol verkorte extractieprocedure<sup>[6][7]</sup>**

- Neem een kolonie van de voedingsbodem en breng deze op de MALDI target.
- Bedek de spot met 1  $\mu\text{L}$  mierenzuur 70% en laat drogen aan de lucht.
- Bedek met 1  $\mu\text{L}$  matrix (alfa-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/2.5% trifluoroazijnzuur) en laat drogen aan de lucht.
- Analyseer.

Deze extractieprocedure neemt ongeveer 3 minuten in beslag. De belangrijkste factor die de duurtijd bepaalt is de droogtijd van mierenzuur 70%.

## **Bijlage 4: Protocol uitbreiding MALDI-TOF MS databank**

Dit protocol beschrijft in grote lijnen de stappen die worden uitgevoerd voor het genereren van een nieuw MSP en de toevoeging van dit MSP aan de MALDI-TOF databank.

### **1. Kweek**

- Kweek stammen op Saboureaud agar gedurende 24 tot 48u.
- Stammen uit de diepvries worden nogmaals overgeënt op dezelfde bodem.

### **2. Extractie**

- Extraheer volgens de conventionele extractiemethode (Bruker, zie p. 28)

### **3. Meting**

- Spot dit extract op meerdere locaties op de maldi-target (minimum 6). Aangezien liefst ten minste 20 spectra per staal worden gebruikt voor de generatie van een MSP, dient iedere spot minstens 4x te worden gemeten. Dit kan geautomatiseerd worden in de Flexcontrol software.
- Spot eveneens een BTS standaard op de MALDI target. Kalibreer alvorens de spectra te meten.
- Ieder opgeslagen spectrum bestaat uit de som van ten minste 240 (automatische setting) of 400 (manuele setting) 'shots'.

### **4. Analyse**

- In flexanalysis worden alle opgenomen spectra voor een bepaald staal geopend.
- Hernoem de map van het geopende staal naar: xxxxxx\_original
- Flatline spectra worden verwijderd.
- Selecteer het default protocol.
- Voer 'baseline subtraction' en 'smoothing' uit.
- Overlay alle spectra en controleer bij alle grote pieken, verspreid over de massarange, of het verschil tussen piekbreedten niet hoger is dan 0.05% van het molecuulgewicht.
- Vb. bij 3000 Da mag het verschil tussen de pieken tussen de verschillende spectra niet meer zijn dan 1.5 Da, bij 5000 Da is dit 2,5 Da, en bij 8000 Da is dit 4 Da.
- Spectra die niet voldoen aan dit criterium worden verwijderd.
- Indien er na cleanup nog minimum 20 spectra overblijven, sla alles op. Indien dit niet het geval is dient de analyse vanaf de meting opnieuw te gebeuren (eventueel met manuele 'beschieting').

## 5. MSP generatie

- Open alle spectra (die net zijn opgeslagen in flexanalysis) in de Biotyper 3 software. (Let op: niet de xxxx\_original bestanden!)
- Selecteer alle gebruikte spectra van de databank en run een identificatie op deze spectra.
- Indien reeds andere stammen van dit species of genus aanwezig zijn in de databank, dient de identificatie een goede gelijkenis te tonen met de deze stammen. Zoniet, dient staalverwisseling uitgesloten te worden.
- Selecteer vervolgens alle spectra van deze stam en controleer dat als methode de standaardmethode is geselecteerd.
- Genereer de MSP. Kies een passende naam. Let erop dat genus en species met spaties gescheiden zijn van elkaar en van eventuele andere toevoegingen aan de naam. De naam die wordt gegenereerd bij de realtime classification bestaat uit de eerste 2 woorden van de MSP-naam.
- Vul bij edit details alle gekende informatie in over deze stam.

## 6. Test

Wanneer van alle geanalyseerde stammen MSP's zijn gegenereerd dienen deze vergeleken te worden met de andere stammen in de databank. Genereer hiertoe een dendrogram en ga de gelijkenis na tussen alle geanalyseerde stammen. Bij twijfel over de identiteit, verwijder het MSP uit de databank.

Als aanvullende test kunnen spectra van gisten, opgenomen in de routine, opnieuw geanalyseerd worden met de uitgebreide databank. De resultaten moeten minstens even goed zijn als zonder de uitbreiding van de databank.

## 7. Configureer

- Indien alle geproduceerde MSP's acceptabel zijn, sla deze op in een nieuwe databank. Laat vervolgens, bij toekomstige analyses, deze databank standaard mee doorzoeken. (Dit kan door in het 'real time classification' programma, de databank bij aan te vinken in het voorlaatste scherm. Deze instelling wordt vervolgens onthouden voor toekomstige analyses. Alternatief kunnen de defaultwaarden in het Windows register worden aangepast).
- Via de "taxonomy tree editor" kunnen eventueel ook de nieuwe MSP's toegevoegd worden aan de taxonomische boom van de databank.

## Bijlage 5: Protocol acceptatiegraad

Voor het bepalen van de acceptatiegraad (vóór uitbreiding van de databank) werden gedurende 2 maanden, alle analyses van gisten nagekeken op goede en slechte (= niet acceptabele) resultaten. Deze werden gelogd in Excel en vervolgens geanalyseerd.

De acceptatiegraad is het percentage accepteerbare analyses t.o.v. het totaal aantal analyses. Voor de acceptatiegraad met inbegrip van duplobepalingen worden beide resultaten als acceptabel beschouwd wanneer minstens 1 van de 2 resultaten goed is en de beste hit van het niet-acceptabel resultaat dezelfde species is als het acceptabel resultaat (maar met lagere score).

De bepaling van de acceptatiegraad na uitbreiding van de databank werd op dezelfde manier uitgevoerd, waarbij eveneens werd gelogd in welke gevallen de beste match van de goede resultaten te wijten was aan een MSP uit de uitgebreide databank.

## Bijlage 6: Overzicht van de stammen toegevoegd aan de databank Yeast\_Extended

Identificatie	Origine	Referentie
<i>Candida albicans</i>	Collectie: OS-0095	UKNEQAS 9162
<i>Candida dubliensis</i>	Collectie: OS-05-0059	UKNEQAS 8274
<i>Candida glabrata</i>	Collectie: OS-0080	UKNEQAS 8722
<i>Candida glabrata</i>	VITEK-studie: 1-1	ITS2-FLP analyse
<i>Candida glabrata</i>	VITEK-studie: 1-6	ITS2-FLP analyse
<i>Candida glabrata</i>	VITEK-studie: 1-11	ITS2-FLP analyse
<i>Candida glabrata</i>	VITEK-studie: 1-23	ITS2-FLP analyse
<i>Candida guilliermondii</i>	VITEK-studie: 1-20	ITS2-FLP analyse
<i>Candida guilliermondii</i>	VITEK-studie: 1-24	ITS2-FLP analyse
<i>Candida guilliermondii</i>	VITEK-studie: 1-38	ITS2-FLP analyse
<i>Candida krusei</i>	VITEK-studie: 1-2	ITS2-FLP analyse
<i>Candida krusei</i>	Collectie: OS-05-0004	IHEM 9560, ATCC 6258
<i>Candida krusei</i>	Collectie: OS-05-0037	IHEM 6369
<i>Candida krusei</i>	Collectie: OS-05-0038	IHEM 9560
<i>Candida krusei</i>	Collectie: OS-05-0039	IHEM 14534
<i>Candida krusei</i>	Collectie: OS-05-0066	UKNEQAS 8427
<i>Candida parapsilosis</i>	Collectie: OS-05-0003	IHEM 3270, ATCC 22019
<i>Candida tropicalis</i>	Collectie: OS-0103	UKNEQAS 9326
<i>Cryptococcus gattii</i> serotype B	BCCM collectie	IHEM 10602
<i>Cryptococcus gattii</i> serotype B	BCCM collectie	IHEM 11792
<i>Cryptococcus gattii</i> serotype B	BCCM collectie	IHEM 10508
<i>Cryptococcus gattii</i> serotype B	BCCM collectie	IHEM 10769
<i>Cryptococcus gattii</i> serotype C	BCCM collectie	IHEM 11489
<i>Cryptococcus gattii</i> serotype C	BCCM collectie	IHEM 10079

<b>Cryptococcus gattii serotype C</b>	BCCM collectie	IHEM 10679
<b>Cryptococcus gattii serotype C</b>	BCCM collectie	IHEM 4159
<b>Cryptococcus neoformans var. grubii</b>	Collectie: OS-05-0023	IHEM 1788
<b>Cryptococcus neoformans var. grubii</b>	BCCM collectie	IHEM 1788
<b>Cryptococcus neoformans var. grubii</b>	BCCM collectie	IHEM 1789
<b>Cryptococcus neoformans var. grubii</b>	BCCM collectie	IHEM 5286
<b>Cryptococcus neoformans var. grubii</b>	BCCM collectie	IHEM 4173
<b>Cryptococcus neoformans var. grubii</b>	BCCM collectie	IHEM 4168
<b>Cryptococcus neoformans var. neoformans</b>	Collectie: OS-05-0024	IHEM 18725
<b>Cryptococcus neoformans var. neoformans</b>	BCCM collectie	IHEM 11079
<b>Cryptococcus neoformans var. neoformans</b>	BCCM collectie	IHEM 11081
<b>Cryptococcus neoformans var. neoformans</b>	BCCM collectie	IHEM 15033
<b>Cryptococcus neoformans var. neoformans</b>	BCCM collectie	IHEM 15207
<b>Cryptococcus neoformans var. neoformans</b>	BCCM collectie	IHEM 14117
<b>Geotrichum capitatum</b>	VITEK-studie: 2-2	ITS2-FLP analyse
<b>Geotrichum capitatum</b>	VITEK-studie: 2-10	ITS2-FLP analyse
<b>Sacharomyces cerevisiae</b>	VITEK-studie: 1-30	ITS2-FLP analyse
<b>Sacharomyces cerevisiae</b>	VITEK-studie: 1-5	ITS2-FLP analyse
<b>Sacharomyces cerevisiae</b>	VITEK-studie: 1-9	ITS2-FLP analyse
<b>Sacharomyces cerevisiae</b>	VITEK-studie: 1-10	ITS2-FLP analyse



- [1] Saenz AJ, Petersen CE, Valentine NB, Gantt SL, Jarman KH, Kingsley MT & Wahl KL. Reproducibility of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for replicate bacterial culture analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (1999) **13**: pp. 1580-1585.
- [2] Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, Lasala P, Kostrzewa M & Harmsen D. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16s rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J. Clin. Microbiol.* (2008) **46**: pp. 1946-1954.
- [3] Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C & Wahl K. Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* (2005) **71**: pp. 58-64.
- [4] van Veen SQ, Claas ECJ & Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J. Clin. Microbiol.* (2010) **48**: pp. 900-907.
- [5] Maier T, Schwarz G & Kostrzewa M. Application note # mt-80: microorganism identification and classification based on maldi-tof ms fingerprinting with maldi biotyper. (2009).
- [6] Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I & Mertens AH. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (maldi-tof ms). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* (2011) (Epub ahead of print)
- [7] Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M & Wilks M. Improved performance of bacterium and yeast identification by a commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system in the clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* (2011) **49**: p. 3441.
- [8] McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A & Zhang SX. Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* (2011) **49**: pp. 3050-3053.
- [9] Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM & Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* (2010) **48**: pp. 3482-3486.
- [10] Marklein G, Josten M, Klanke U, Müller E, Horré R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A & Sahl H. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J. Clin. Microbiol.* (2009) **47**: pp. 2912-2917.
- [11] Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, Iredell JR, Meyer W & Chen SC. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* (2011) **6**: p. e25712.

- [12] Firacative C, Maszewska K, Castañeda E & Meyer W. Maldi-tof mass signatures for the differentiation of the major molecular types/species within the *Cryptococcus neoformans/c. gattii* species complex. <http://www.asm2011.org/posters/713.pdf>. (7/2011) Accessed on 11/1/2012.
- [13] Hendrickx M, Goffinet J, Swinne D & Detandt M. Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the bccm/ihem collection by maldi-tof ms. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* (2011) **70**: pp. 544-548.
- [14] Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP & Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J. Clin. Microbiol.* (2011) **49**: pp. 1614-1616.