

IDENTIFIKASJON AV DERMATOFYTTER MED MALDI-TOF MS

Forfattere: Ida Sletteberg (Molde)/Kjersti Wik Larssen (St. Olav)

FORSLAG TIL ANBEFALINGER (**RØD SKRIFT** = TIL DISKUSJON KONTROVERSIELLE)

ANBEFALING 1 NÅR SKAL MALDI-TOF BENYTTES TIL DERMATOFYTTIDENTIFIKASJON?

- Fenotypisk vurdering makroskopisk og mikroskopisk eller identifikasjon ved hjelp av PCR er tilstrekkelig i de fleste tilfeller. Ved utbredt og/eller uttalt dermatofytose, ved tinea capitis, ved mistenkt smitte fra dyr, ved utbrudd eller ved terapivikt, bør prøvene dyrkes, og dermatofytter identifiseres med Maldi-TOF MS supplert med fenotypiske karakteristika.

ANBEFALING 2 VALG AV MEDIE FOR IDENTIFIKASJON

- Sabouraud glukose agar med kloramfenikol og gentamicin vil i de fleste tilfeller være egnet for identifikasjon.
- **ID fungal plates har trolig en fordel hos dermatofytter, særlig dersom man benytter extended direct transfer metode og ikke full ekstraksjon.**

ANBEFALING 3 EKSTRAKSJON OG PLATE

- Følg anbefalinger fra leverandør eller anvendte database.
- Full ekstraksjon med etanoltrinn er vist å gi gode spektra på tvers av databaser, og er anbefalt ved bruk av MSI2.0, MicrobeNet eller NIH. I tillegg sikrer etanol soppdrap.
- **Extended direct transfer gir besparelse på tid og forenkler arbeid. Publiserte data på hvor godt en ekstraksjon uten etanol dreper sopp (smittefare personell + kontaminasjon i lab) er sparsom/mangelfull.**

ANBEFALING 4 DATABASER OG SUPPLERENDE UNDERSØKELSER

- MSI2-databasen er vesentlig forbedret med hensyn til sikker identifikasjon av dermatofytter, der spektra fra kolonier i ulike vekststadier, samt kolonier fra både SAB og IDFP er lagt til grunn. Per i dag er dette databasen for best mulig identifikasjon av dermatofytter til species- eller species complex-nivå.
- MSI2-databasen har problem med å skille nært relaterte arter som *T.rubrum*/*T.violaceum* og *T.soudanense*, her kan supplerende testing bidra til sikker identifikasjon.

AVGRENSNING / RELEVANTE PROBLEMSTILLINGER

Diagnostikk av dermatofytter har tidligere basert seg på dyrkning og fenotypisk identifikasjon av makro og mikroskopiske vekstkarakteristika. Urea, BCP og evt andre konvensjonelle tester kan brukes som supplement i vurderingene. Dette er omtalt i Strategirapport i mykologi fra 2013 ([Microsoft Word - Strategirapport nr 27 \(2013\) Soppinfeksjoner.docx \(fhi.no\)](#)), og beskrives ikke videre her. Konvensjonelle metoder krever tid, erfaring og kunnskap.

PCR-basert påvisning av dermatofytter er i dag utbredt, enten alene eller som et supplement til dyrkning, og bidrar med økt sensitivitet og raskere svar. Begrensninger i PCR avhengig av hvilke species som er inkludert i PCR panel, og det er manglende evne til å skille mellom species innen enkelte species complex som *T.mentagrophytes*/*T.interdigitale*. Et kommersielt kit som DermaGenius 2.0/3.0 (Pathonostics, Maastricht,

Nederland) skiller mellom ulike arter av *Tricophyton*, *Microsporum* og *Epidermophyton*, i tillegg til *Candida*. *T. indotineae* detekteres som en del av *T. mentagrophytes complex*, men differensieres ikke fra de andre artene i samme komplekset siden egen probe for *T. indotineae* ikke finnes (1). Enkelte laboratorier har tatt i bruk ITS-sekvensering, men dette er ikke aktuelt for rutinediagnostikk grunnet begrenset tilgjengelighet, kompetanse og kostnad.

Globalt foreligger en endring i dermatofyttenes epidemiologi, med økende forekomst og spredning av arter med iboende og ervervet resistens mot fortrinnsvis terbinafin, men også itraconazol, slik at korrekt artsidentifikasjon og feno- eller genotypisk resistensbestemmelse vil være av større betydning nå enn tidligere (1-6). Dermatofytt dyrkning bør benyttes som supplement til PCR i situasjoner som beskrevet i ringtestrapport 707 og summert i anbefaling 1. Maldi-TOF MS har de siste årene i økende grad blitt brukt til vellykket identifikasjon av dermatofytter fra oppvekstkultur, særlig etter forbedrede offentlige databaser. Dette tilgjengeliggjør og forenkler identifikasjon av dermatofytter for laboratorier med begrenset erfaring i soppidentifikasjon.

Valg av system

Det er to systemer for MALDI-TOF MS som benyttes i Norge: MALDI Bio-Typer (MBT; Bruker Scientific) og VITEK MS (BioMerieux). Det finnes få sammenlignende studier på deres presisjon når det kommer til identifikasjon av dermatofytter. I de studiene som er gjort, har det vært benyttet ulike dyrkningsmedier, inkubasjonstider, databaser (og versjoner), algoritmer for danning av referansespektra, sammenligninger av ekstrahert spektrum opp mot referansespektrum, ekstraksjonsmetoder og target plates (7-9).

Valg av dyrkningsmedie og inkubasjonstid

Dermatofytter dyrkes i de fleste laboratorier på Saboraud med gentamicin og chloramphenicol (SGC) agar, samt Mycobiotic agar i 2-4 uker. MALDI-TOF bør gjøres så snart man får vekst på materiale fra SGC agar, ved utilfredsstillende spekter kan det gjentas. Man avsetter vanligvis minimum 2 spotter, og det anbefales i en del studier også 4 spotter for best mulig resultat. (2, 10-12). Det er relativt nylig lansert et medium, Id Fungi Plates (IDFP; Conidia Coniphy, Quincieux, Frankrike) som tillater enklere høsting av soppkolonier. En membran på overflaten forhindrer at hyfene vokser ned i agaren, slik at man unngår å kontaminere platen med agar. Enkelte studier finner bedre prestasjon ved bruk av IDFP, særlig ved direkte overføring for Bruker Maldi Biotyper (MBT) og flere databaser som Bruker Filamentous fungi (BFF), NIH databasen og Mass Spectrometry Identification platform (MSI). (7) IDFP vil være et mer kostbart alternativ enn Saboraud, slik at det neppe vil være hensiktsmessig for de fleste laboratorier i rutinediagnostikk av dermatofytter, men kan benyttes i tilfeller der identifikasjon er utfordrende (2).

Valg av ekstraksjonsmetode og target plate

Materiale fra kolonier, herunder frontmycel, kan overføres direkte til plate med maursyre (extended direct transfer) og dekkes av matrix, eller ekstraheres først og så overføres til plate, før man dekker med matrix. I flere studier anbefales det full proteinekstraksjon som gir bedre spektra og kvalitet på identifikasjon enn direkte overføring (2, 7, 8), selv om denne metoden er mer tid- og ressurskrevende. Direct transfer er også vist å kunne gi gode spektra, spesielt på vanlige arter (13). Biomerieux anbefaler for Vitek MS en spesifikk protokoll for filamentøse sopp med proteinekstraksjon og inaktivering av konidier ved hjelp av etanol, maursyre og acetonitril. (7, 14) Anbefalingen begrunnes i bedre resultater og av hensyn til biosikkerhet. For Bruker foreligger ikke tilsvarende anbefaling, slik at det blir opp til det enkelte laboratorium å vurdere hvilken metode som skal benyttes. Anbefaling fra databasens leverandør bør følges, og der en slik anbefaling ikke foreligger, vil valg av ekstraksjonsmetode være avhengig av erfaring og kompetanse i laboratoriet for vurdering av artsidentifikasjon opp mot konvensjonelle metoder. Offentlige databaser som Mass Spectrometry Identification platform 2.0 (MSI 2.0) og MicrobeNet anbefaler full ekstraksjon.

Det anbefales å følge leverandørs anbefalinger vedrørende plate for dermatofytt-identifikasjon. Engangsplater minsker risiko for kontaminasjon, som kan være en fordel.

Valg av database

En av de største begrensningene ved Maldi-TOF MS i rutinediagnostikken er databasene tilknyttet systemene. Disse har varierende antall tilgjengelige arter samt antall spektra for hver enkelt art (7, 8, 15, 16). I tillegg er det utfordrende å skille mellom nært relaterte arter som *T. violaceum* og *T. soudanense*, samt å kunne differensiere mellom arter innenfor samme kompleks, som *T. mentagrophytes complex* (5, 8, 12, 13). Det finnes flere tilgjengelige databaser for identifikasjon av dermatofytter ved hjelp av Maldi-TOF MS, både kommersielle, brukerdefinerte og offentlig kurerte. For de to systemene som er i bruk i Norge i dag, Maldi Bio-Typer (MBT; Bruker Scientific) og VITEK MS (BioMerieux), finnes henholdsvis Bruker MBT HT Filamentous Fungi (BFF) IVD og MBT HT Filamentous Fungi Library, RUO, og VITEK MS IVD Knowledge Database (VKB) og Saramis RUO (bioMerieux) tilknyttet. Disse databasene lar seg ikke uten videre sammenligne, siden spekter i Brukers database er hentet fra vekst i flytende medier, mens det for NIH-databasen, VITEK MS IVD-databasen og MSI2.0 er høstet fra kolonier på faste medier (7, 8). I et par studier hvor man sammenligner de to tilgjengelige systemene for identifikasjon av filamentøse sopp fra vekst på faste medier, ser VITEK MS ut til å prestere bedre (7, 17). I 2017 ble MSI-databasen, som er en offentlig kurert database, lansert som en webapplikasjon fritt tilgjengelig. MSI2.0-databasen ble tilgjengelig i 2019 og oppdatert i 2022, forbedret fra MSI med mer nøyaktige algoritmer og flere tilgjengelige arter, slik at prosentandelen korrekt identifiserte arter har økt fra 63,4 til 91,7 % (12). Databasen utvikles kontinuerlig og oppdateres ihht gjeldende taksonomi (se tabell 1 i innlegg om identifikasjon av muggsopp). Det er fortsatt utfordrende å skille nært beslektede arter innenfor *T. rubrum*, *T. interdigitale*/*T. mentagrophytes*, og *T. equinum*/*T. tonsurans complex* ved hjelp av massespektrometri, slik at morfologiske trekk bør bidra til en samlet vurdering for identifikasjon (8, 12, 13). Species innenfor *T. mentagrophytes complex* har sammenfallende morfologiske trekk, men i en studie fra 2022 er MSI2.0-databasen blitt oppdatert med 142 referansespektra fra 12 stammer innenfor dette komplekset inkludert 3 *T. indotineae*-stammer. Det er høstet kolonier fra to ulike vekstmedier hver tredje dag etter oppvekst. Identifikasjonsraten for *T. indotineae* har bedret seg fra 5 % til 96 % (2, 4, 5). Denne arten har høy forekomst av terbinafinresistens, kan gi utbredte dermatofyttinfeksjoner, og er påvist i flere europeiske land inkludert Norge (1, 3, 5, 18). Per i dag gir VKB 3.2 og BFF 4.0 *T. indotineae* ut som *T. interdigitale* som *T. tonsurans* med god score, respektivt. Med MSI2.0 kan den identifiseres som *T. indotineae* med god score, fortrinnsvis etter full ekstraksjon.

Per dags dato er MSI2.0 kun kompatibel med spektra generert fra Bruker MBT-plattformen (7), men det foreligger publikasjon bruk av MSI2.0 på spekter generert fra VITEK MS (se omtale i identifikasjon av muggsopp med Maldi-TOF MS). Det ser ut til å være en klar fordel at databasene inneholder flere MSPs (mass spectral profiles) per stamme, samt flere stammer per species, i tillegg til bruk av både SAB med antibiotika og IDFP med kolonier i ulike stadier for å øke sannsynligheten for identifikasjon. (7, 12, 19) Både VKB og MSI/MSI 2.0 er bygget på flere MSPs per stamme, og kan slik sett ha en fordel. Kombinasjon av spekter generert fra Bruker-systemet opp mot MSI 2.0-databasen ser per i dag ut til å gi best mulig identifikasjon av dermatofytter ved MALDI-TOF MS (17).

Det er rapportert høye identifikasjonsrater ved benyttelse av brukerdefinerte inhouse-databaser knyttet opp mot maldi-TOF MS (12), men det krever ekspertise både innenfor sekvensering og mykologi, slik at det ikke vil være tilgjengelig i de fleste laboratorier. Det er derfor et behov for offentlig tilgjengelige, kurerte referansespektra databaser med høy kvalitet, som MSI2.0, som utvikles og oppdateres i henhold til gjeldende taksonomi betydelig raskere enn de kommersielle (se tabell 1 i innlegg om identifikasjon av muggsopp). De kommersielle databasene VKB er FDA- og IVD-godkjent, mens BFF inntil nylig kun har vært RUO. Fra 2022 er det også lansert et IVD- bibliotek for Bruker. Det anbefales at man benytter SLP for å kvalitetssikre dyrkning og identifikasjon av dermatofytter, samt gjøre seg erfaringer vedrørende databasens kvaliteter og begrensninger, her har NEQAS en EQA for mycology.

Taksonomi og besvaring

Identifikasjon av dermatofytter kan være utfordrende på bakgrunn av nomenklaturens utvikling, som gjerne går raskere enn oppdatering av de ulike databasene. For vurderinger av taksonomi og kriterier for

identifikasjon vises det til innlegg om identifikasjon av muggsopp med MALDI-TOF MS. For dermatofyttprøver bør morfologi sammenholdes med klinikk, prøvelokalitet, resultat ved massespektrometri, evt også resultat fra supplerende tester, før prøven besvares. I de tilfellene der korrekt artsidentifikasjon vurderes som klinisk relevant, enten ved alvorlige og/eller uttale infeksjoner, eller ved opplysninger om terapisivt, bør prøven videresendes referanselab for bekreftelse av ID ned til species-nivå.

PROBLEMOMRÅDER

- Det er manglende enighet internasjonalt om valg av ekstraksjonsmetode av dermatofytter.
- Databasene har ulike begrensninger i antall arter som kan detekteres, antall spektra per art, og hvordan spektra er generert, slik at presisjonen for ulike arter vil variere mellom databasene.
- Ved alvorlige og uttalte infeksjoner og opplysninger om terapisivt bør man benytte offentlig kurert database i tillegg til den tilgjengelige kommersielle, evt benytte annen supplerende diagnostikk, evt bør isolatet sendes referanselab for korrekt identifikasjon.
- Hvordan bør *Trichophyton mentagrophytes* species complex besvares, kan den besvares endelig utfra prøvelokalisasjon og/eller kliniske opplysninger?

REFERANSER

1. Astvad KMT, Hare RK, Jørgensen KM, Saunte DML, Thomsen PK, Arendrup MC. Increasing Terbinafine Resistance in Danish Trichophyton Isolates 2019–2020. *Journal of Fungi*. 2022;8(2):150.
2. Normand A-C, Moreno-Sabater A, Jabet A, Hamane S, Cremer G, Foulet F, et al. MALDI-TOF Mass Spectrometry Online Identification of Trichophyton indotineae Using the MSI-2 Application. *Journal of Fungi*. 2022;8(10):1103.
3. Uhrlaß S, Verma SB, Gräser Y, Rezaei-Matehkolaei A, Hatami M, Schaller M, et al. Trichophyton indotineae—An Emerging Pathogen Causing Recalcitrant Dermatophytoses in India and Worldwide—A Multidimensional Perspective. *Journal of Fungi*. 2022;8(7):757.
4. Tang C, Ahmed SA, Deng S, Zhang L, Zoll J, Al-Hatmi AMS, et al. Detection of emerging genotypes in Trichophyton mentagrophytes species complex: A proposal for handling biodiversity in dermatophytes. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13.
5. Jabet A, Normand AC, Brun S, Dannaoui E, Bachmeyer C, Piarroux R, et al. Trichophyton indotineae, from epidemiology to therapeutic. *J Mycol Med*. 2023;33(3):101383.
6. Chowdhary A, Singh A, Kaur A, Khurana A. The emergence and worldwide spread of the species Trichophyton indotineae causing difficult-to-treat dermatophytosis: A new challenge in the management of dermatophytosis. *PLOS Pathogens*. 2022;18(9):e1010795.
7. Lau AF. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight for Fungal Identification. *Clin Lab Med*. 2021;41(2):267-83.
8. Cassagne C, Normand A-C, L'Ollivier C, Ranque S, Piarroux R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses*. 2016;59(11):678-90.
9. Choi Y, Kim D, Choe KW, Lee H, Kim J-S, Ahn J-Y, et al. Performance Evaluation of Bruker Biotyper, ASTA MicroIDSys, and VITEK-MS and Three Extraction Methods for Filamentous Fungal Identification in Clinical Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 2022;60(11):e00812-22.
10. Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(12):1366-71.
11. L'Ollivier C, Cassagne C, Normand A-C, Bouchara J-P, Contet-Audonnet N, Hendrickx M, et al. A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory. *Medical Mycology*. 2013;51(7):713-20.

12. Jabet A, Normand A-C, Moreno-Sabater A, Guillot J, Risco-Castillo V, Brun S, et al. Investigations upon the Improvement of Dermatophyte Identification Using an Online Mass Spectrometry Application. *Journal of Fungi*. 2022;8(1):73.
13. da Cunha KC, Riat A, Normand A-C, Bosshard PP, de Almeida MTG, Piarroux R, et al. Fast identification of dermatophytes by MALDI-TOF/MS using direct transfer of fungal cells on ground steel target plates. *Mycoses*. 2018;61(9):691-7.
14. Respinis SD, Monnin V, Girard V, Welker M, Arsac M, Cellière B, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Using the Vitek MS System for Rapid and Accurate Identification of Dermatophytes on Solid Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(12):4286-92.
15. Patel R. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *Journal of Fungi*. 2019;5(1):4.
16. Wilkendorf LS, Bowles E, Buil JB, Lee HALvd, Posteraro B, Sanguinetti M, et al. Update on Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Filamentous Fungi. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(12):10.1128/jcm.01263-20.
17. Dupont D, Normand AC, Persat F, Hendrickx M, Piarroux R, Wallon M. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of moulds in the routine microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25(7):892-7.
18. Khurana A, Sardana K, Chowdhary A. Antifungal resistance in dermatophytes: Recent trends and therapeutic implications. *Fungal Genet Biol*. 2019;132:103255.
19. Normand A-C, Cassagne C, Ranque S, L'Ollivier C, Fourquet P, Roesems S, et al. Assessment of various parameters to improve MALDI-TOF MS reference spectra libraries constructed for the routine identification of filamentous fungi. *BMC Microbiology*. 2013;13(1):76.