

Gruppo di Lavoro
per lo Sviluppo Professionale Continuo
dei Tecnici di Laboratorio
(GLaTeLab)

Sezione Regione Lombardia



TECNICHE DI IDENTIFICAZIONE DEI MICRORGANISMI: dal fenotipo al genotipo

Milano, 10 maggio 2019

La tecnologia MALDI-TOF applicata in Batteriologia, Micologia e Micobatteriologia Clinica: modalità operative

***Anna Camaggi* TSLB**

S.C. Laboratorio di Microbiologia e Virologia

A. O. U. Maggiore della Carità - Novara

annacamaggi@libero.it

MALDI-TOF MS UTILIZZATI IN MICROBIOLOGIA CLINICA

Bruker Daltonics
Biotyper® e Biotyper® smart



BioMerieux
Vitek MS

CARATTERISTICHE:



Velocità: rapida identificazione dei microrganismi

Affidabilità: Elevata precisione nelle identificazioni

Semplicità nell'utilizzo: bassa formazione necessaria

Costi per identificazione: notevolmente inferiore ai metodi convenzionali

Aggiornamento regolare della library: consente l'identificazioni di un numero di specie di microrganismi sempre maggiore

INOLTRE:

Le library contengono un ampio range di spettri di riferimento prodotti a partire da una vasta gamma di ceppi clinici di routine.

Gli spettri di riferimento sono stati prodotti da microrganismi coltivati in differenti condizioni ambientali (temperature e tempi di incubazione, diversi terreni di coltura).

QUINDI...

Rivoluzione dei flussi di lavoro nei laboratori di microbiologia



Preparazione della lista di lavoro

The screenshot displays the MBT Compass software interface. At the top, a progress bar shows three steps: 1. Create ID run, 2. Measure run, and 3. Export run. A red circle highlights this progress bar. On the left, a red box highlights the ID number 180509-1421-IVD-00287878. A central blue box contains the text: "Target n° registered by scanning barcode". Below this is a table with columns: BTS, Position, Name, and ID. The table lists five rows, with the first row (BTS 1, Position A1, Name A1, ID BTS) having a checked checkbox. To the right of the table is an image of a hand holding a blue Petri dish. Below the table, another blue box contains the text: "Tell MBT which sample is on which spot (scan barcode of Petri dish)". To the right of this box is an image of a hand holding a red Petri dish. At the bottom right, a red box highlights the "Save Run" and "Start Acquisition" buttons.

180509-1421-IVD-00287878

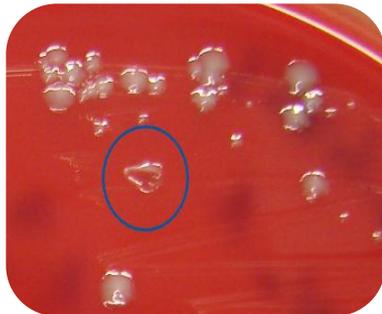
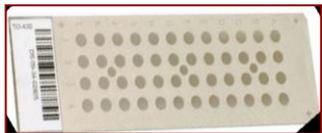
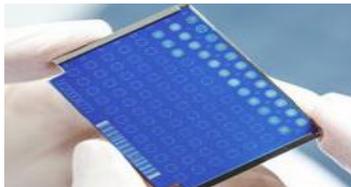
Target n° registered by scanning barcode

BTS	Position	Name	ID
1	<input checked="" type="checkbox"/> A1	A1	BTS
2	<input type="checkbox"/> A2	A2	121350
3	<input type="checkbox"/> A3	A3	354487
4	<input type="checkbox"/> A4	A4	545405
5	<input type="checkbox"/> A5	A5	514548

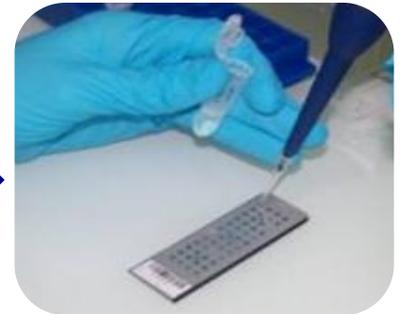
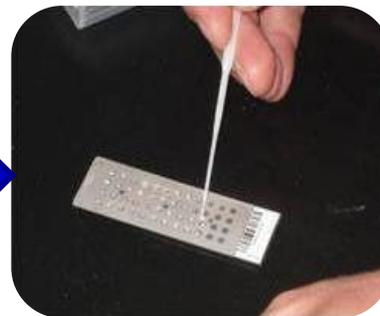
Tell MBT which sample is on which spot (scan barcode of Petri dish)

Cancel Save Run Start Acquisition

Preparazione del Target



1- Trasferire una porzione di colonia, al centro di due spot di un "target plate"



2- Coprire con 1 μL di matrice MALDI, lasciare asciugare

Matrice: HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid)

Caratteristiche della matrice

- Bassa volatilità
- Solubile in solventi comuni all'analisi
- Forte assorbimento di energia dal laser
- Facilità nel trasferimento della carica all'analita



3- Introdurre il "target plate" nello strumento

4- Analizzare



Preparazione del Target

Direct transfer (for 90-95% of microorganisms)

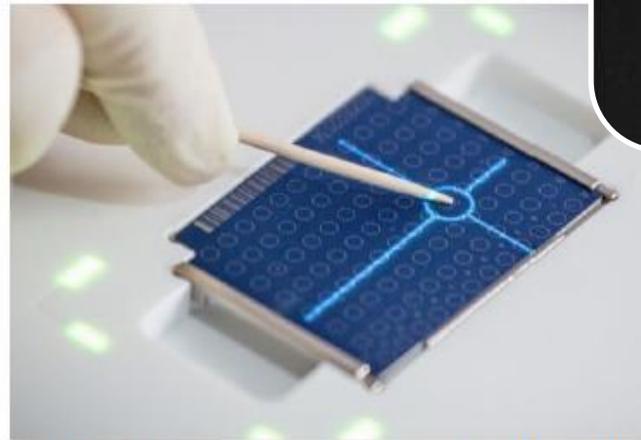
- Direct transfer of biological material on MALDI Target
- After all samples are processed, add MALDI Matrix
- Usually perfect for Gram negative and most Gram positive microorganisms

Extended direct transfer method (e.g. for yeast)

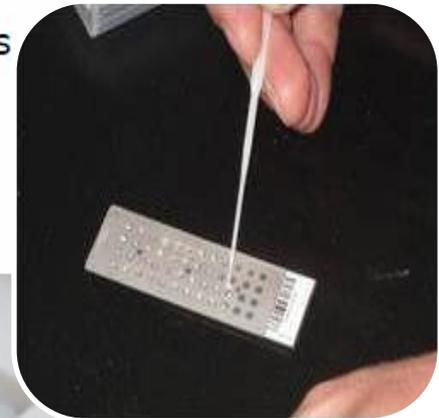
- Direct transfer of biological material on MALDI Target
- Add drop of formic acid („on target extraction“)
- Dry at room temperature
- Add matrix

Extraction procedure (rare)

- A series of steps are performed in an Eppendorf tube to extract proteins from isolated colonies



Direct transfer using a tooth pick



Preparazione del Target



Fondamentale:

- Utilizzo di una porzione di una singola colonia
- Deporre il campione in modo uniforme

Every Microorganism could be of Clinical Relevance

	Too much material	Optimal quantity	Not enough material
Smeared sample before adding CHCA			
Camera view after adding CHCA			

Every Microorganism could be of Clinical Relevance

From <https://www.hindawi.com/journals/crim/2013/610632/>

Global traveling contributes to rapid dispersal of pathogens from regions, where they are endemic to countries, where they have never been seen before. Recent developments in medical microbiology, in particular the Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) technology [1], enable fast and accurate identifications of bacteria, even of taxa, which are rarely seen or not to be identified by standard identification methods.



Marine microorganisms are uncommon etiologies of skin and skin structure infections, that is, wound infections. We report a case of severe wound infection, caused by the marine *Photobacterium damsela* (Vibrionaceae), in a 64-year-old male patient, returning from Australia. The isolate tested positive for pPHDD1, a plasmid conferring high-level virulence. Furthermore, the wound was coinfecting with *Vibrio harveyi*, a halophile bacterium, which has never been reported from human infections before. Identification was achieved by use of Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF) and confirmed by 16S rDNA sequencing.

The hemolytic bacteria were identified by use of MALDI-Biotyper MALDI-TOF instrument (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), as being *P. damsela*, while—on the next

Every Microorganism could be of Clinical Relevance

From https://www.escmid.org/research_projects/study_groups/fungal_infection/

ESCMID Fungal Infection Study Group - EFISG

News & Activities

03 February 2017

News on *Candida auris*

Candida auris is a new species of *Candida* that is currently causing outbreaks in healthcare settings worldwide. The first outbreak in Europe was described in England in 2015, but there are already cases in Spain.

C. auris is difficult to identify with classical methods and can be misidentified with different species (*Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida haemulonii*, *Candida sake*, or other species of *Candida non-albicans*), according to the identification method

used. Correct identification can be done by sequencing the ITS or D1-D2 regions or with MALDI-TOF (the species has been included in the last update of Bruker's library). → 2016



Commonly resistant to the first-line antifungal, fluconazole, and can develop resistance to other classes of antifungal agents

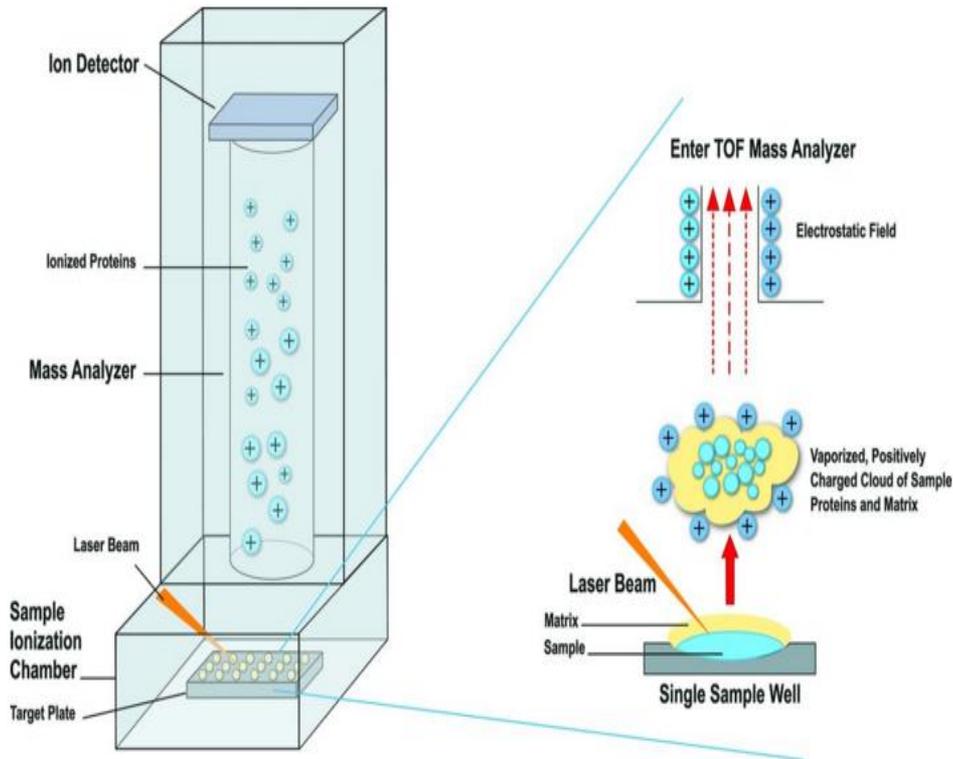
Every Microorganism could be of Clinical Relevance

Il taxi bianco stava velocemente portando a casa un Molinarid particolarmente perplesso e pensieroso: che realtà preoccupante aveva ritrovato nel suo vecchio laboratorio. Ormai i batteri non erano più gli stessi: tre anni prima aveva lasciato una flora batterica ammantata di dolce poesia, microorganismi che facevano del male solo quando non potevano proprio farne a meno, ma comunque in punta di piedi e cercando di disturbare il meno possibile, pronti ad andarsene appena la terapia antibiotica fosse stata iniziata; adesso no, adesso era tutto diverso, in soli tre anni era tutto radicalmente cambiato...stafilococchi aurei quasi tutti produttori di beta-lattamasi, stafilococchi coagulasi negativi ed enterococchi resistenti ai glicopeptidi, *Klebsiella pneumoniae* che non avevano mai fatto male a una mosca e adesso erano produttrici di carbapenemasi, metallo-beta lattamasi...*Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae* e perfino *Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro e cefalosporinasi ad alto livello, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* multiresistenti, Micobatteri MDR...ma no...ma che brutto mondo...quelli non erano più i batteri che lui aveva conosciuto e con i quali aveva convissuto con il massimo rispetto reciproco per più di quarant'anni.



MALDI-TOF MS technology

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry



MALDI-TOF mass spectrometer. The target plate is placed into the chamber of the mass

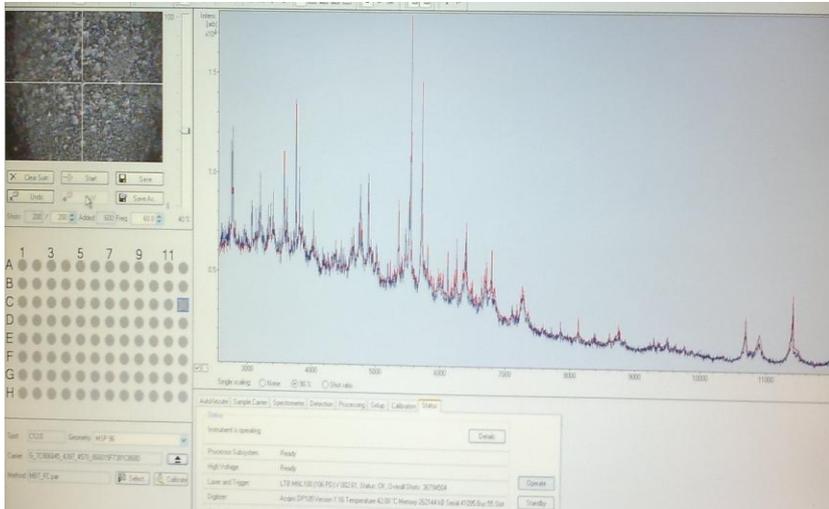
▪ gli ioni raggiungono e colpiscono una membrana “detector” rilevatore di ioni. Gli ioni impattanti su di esso vengono misurati nel loro rapporto massa/carica (m/z); I dati vengono inviati ad un software che li elabora in spettri di massa

▪ Il campione si disgrega in numerosissimi frammenti con carica unitaria positiva (cationi monovalenti). Una volta vaporizzati, i frammenti vengono accelerati da un campo elettromagnetico, migrano in senso lineare attraverso il così detto “tubo di volo”

▪ La matrice, ionizza, essendo un acido cede protoni (carica positivamente il campione) ed evapora

▪ Raggio laser pulsato colpisce la matrice co-cristallizzata con il campione, la matrice assorbe l’energia del laser (circa 300-350 nm)

MALDI-TOF MS: come lavorano



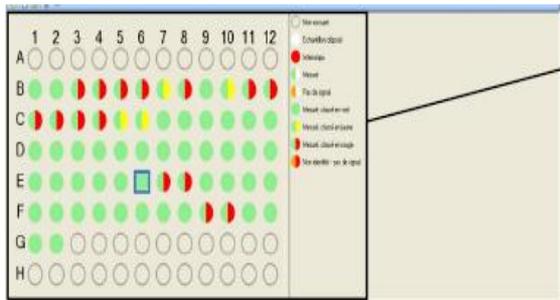
Bruker Daltonics Biotyper Microflex



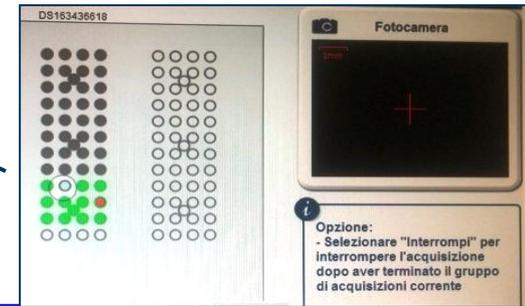
BioMerieux Vitek MS

- lo spettro risultante viene confrontato con spettri di riferimento presenti nel database interno (microorganism reference library)
- Quindi....

MALDI-TOF MS: come lavorano



Real time visualization of measurement and analysis progress



Bruker Daltonics Biotyper

Scoring interpretation

2.00-3.00 = Secure genus and species identification

1.70-1.99 = Probable genus identification

0-1.699 = Unreliable identification

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
A1 (+++)(C)	BTS	Escherichia coli	2.484
A2 (+++)(C)	BTS	Escherichia coli	2.474
A3 (++)(A)	M.avium	Mycobacterium avium	2.392
A4 (++)(A)	M.avium	Mycobacterium avium	2.332
A5 (-)(C)	14mm	no peaks found	<0

BioMérieux Vitek MS

Confidence values (%)

- Results have a strong match and are ready to report
- ▲ Results have low discrimination and require further review
- Low-quality results with no identification made

VITEK® MS Review

Operator: All Bench name: All Setup Date: All

Search Criteria: Operator: All Bench name: All Setup Date: All

Number of isolates: 49

List of results to review

Patient ID	Patient Name	Accession ID	Specimen Type	Organism Name	Confidence Value	Confidence Level	Review Status	Pending Status
1081417		142659-1	Respiratory	Staphylococcus aureus	99.9	Green	To Review	Delayed
197-50862		142681-1	Respiratory	Staphylococcus aureus	99.9	Green	To Review	Delayed
0260120		142682-1	Respiratory			Red	To Review	Delayed
0638671		142705-1	Respiratory			Orange	To Select	Delayed
0638671		142705-2	Respiratory			Red	To Review	Delayed
0638671		142707-1	Respiratory			Orange	To Select	Delayed
197-20895		142713-1	Respiratory			Red	To Review	Delayed

Il grado di corrispondenza con lo spettro tipico di ogni microrganismo presente nel database determina l'attribuzione di un cosiddetto Valore di Confidenza (Score Value) che esprime il grado di certezza con cui viene proposta l'identificazione per la specie in esame.

Lo spettrometro di massa MALDI-TOF Bruker Daltonik Biotyper



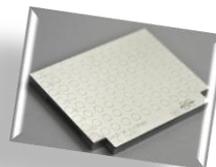
Caratteristiche dello strumento:

è uno strumento con database "aperto", pertanto è possibile inserire nuovi spettri di riferimento, garantendo così l'acquisizione di "nuove" specie e l'integrazione a quelle già presenti .

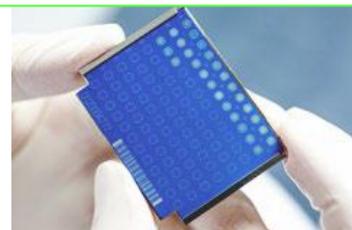
Target plate standard, metallica,
96 pozzetti (48 campioni)

Riutilizzabile dopo.....

- Accurato lavaggio con garza sotto acqua corrente
- Risciacquare con acqua ultra pura (bidistillata)
- Risciacquare con Iso-2-Propanolo (per rimuovere tutte le contaminazioni idrofiliche)
- Far asciugare



**MBT Biotarget 96 US IVD
MALDI Biotyper® target plates
CA System**



IVD	MSP	Genus	Species
Gram -	3525	258	1266
Gram +	3995	209	1411
Yeast	806	45	210
Σ	8326	512	2887

RUO	MSP	Genus	Species
Gram -	3525	258	1266
Gram +	4070	210	1450
Yeast	806	45	210
Filamentous Fungi	67	27	43
Σ	8468	540	2969

MBT Mycobacteria Library (identical content for RUO and IVD):

- 178 species (952 MSP) of 201 currently known species

MBT Filamentous Fungi Suite (# 1867813)

- Research Use Only,
- 180 species plus 10 genus level strains, in total 62 genera, 577 MSP



MALDI Biotyper - Workflow

Connectivity to an existing AST system



Kirby Bauer



Phoenix, BD



MicroScan, Siemens



Micronaut, Merlin



Vitek 2, bioMérieux

Lo spettrometro di massa MALDI-TOF BioMerieux Vitek MS

Il primo database marcato CE/IVD per
Micobatteri / *Nocardia* e Funghi filamentosi !

Posted by [Claire Barresi](#) | Feb 13, 2017 | [Solutions](#)



KB V3.2 = 1,316 species

1,095 bacteria and 221 funghi
Including *Brucella*, *Candida auris*
and *Elizabethkingia anophelis*
Più di 40000 spettri

○ Optimized Workflow & Integration w/ AST

VITEK MS RUO

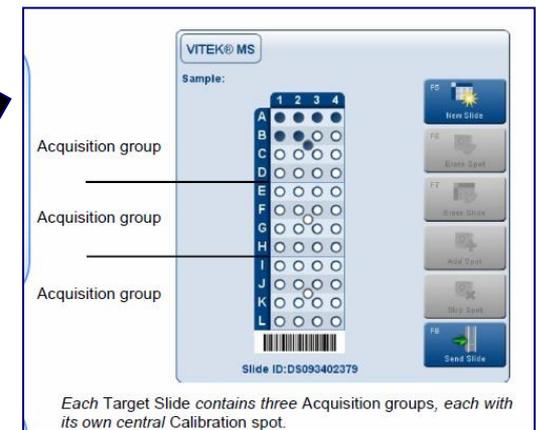
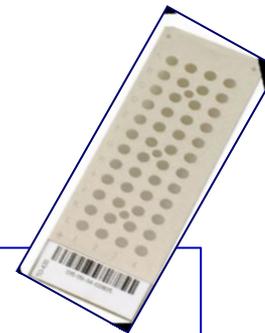
(AXIMA@SARAMIS 4.14)

- Research Use Only
- SARAMIS® database
 - 1585 taxa
 - Open
 - SuperSpectra & ReferenceSpectra
- Cluster analysis

Caratteristiche dello strumento:

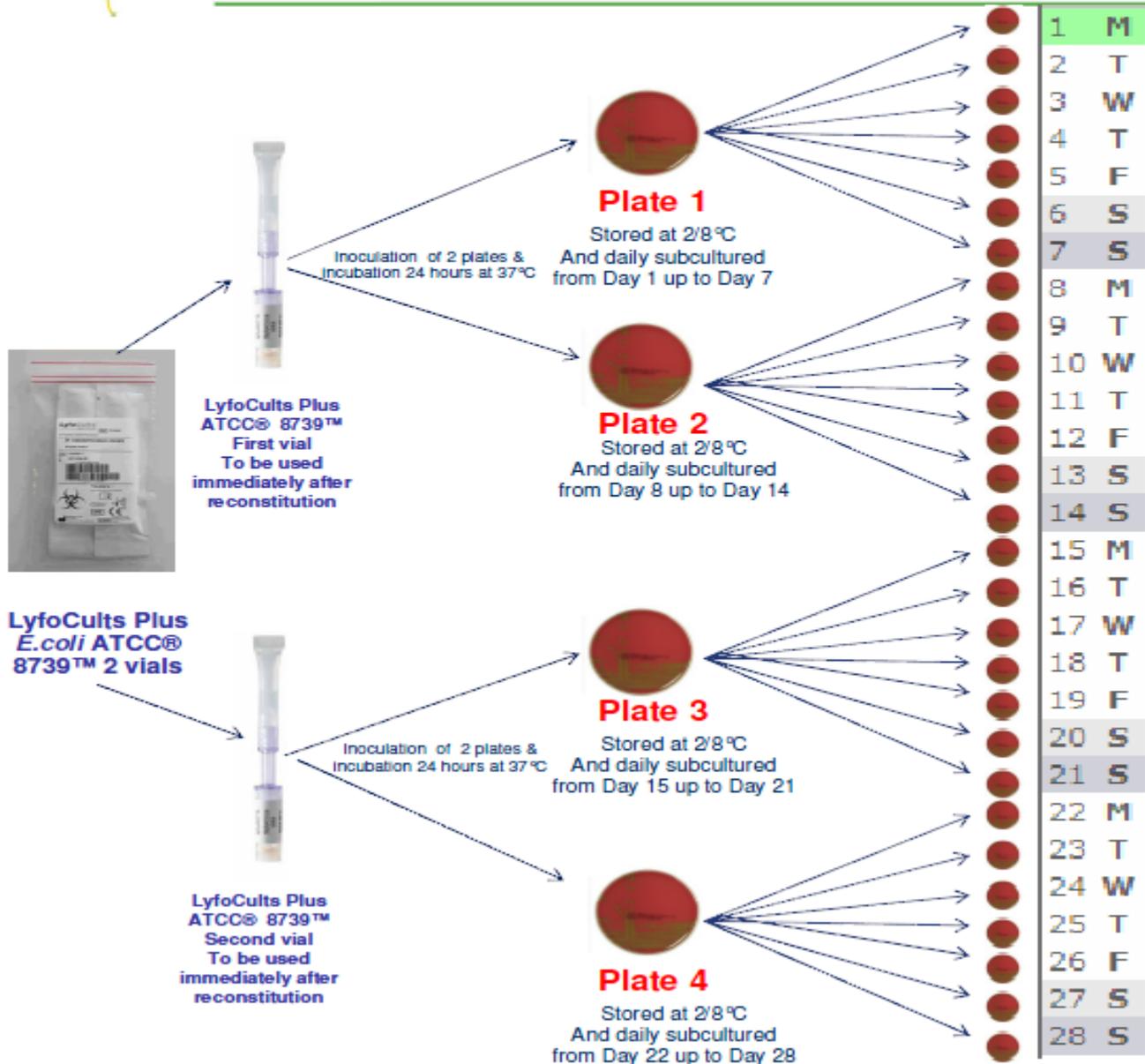
- Con lo stesso campione, con un semplice switch è possibile passare dalla versione IVD alla versione RUO
- Per ogni "Gruppo di acquisizione", prima e dopo gli spot dei campioni viene eseguita l'acquisizione dello spettro dello "spot di controllo" - E.coli (ATCC)
- Se lo spot controllo va bene, vengono acquisiti gli spot dei campioni, nel gruppo (16 spot, 8 campioni)
- Se la lettura dello "spot controllo" fallisce prima della lettura dei campioni, questa non viene effettuata e passa al gruppo successivo; se la lettura fallisce dopo la lettura dei campioni, le acquisizioni di questi non vengono inviate alla fase di "Analisi dei dati"
- Cambio sali ogni 20 giorni circa
- Calibrazione da remoto

Target plate
"usa e getta"
48 pozzetti (24 campioni)



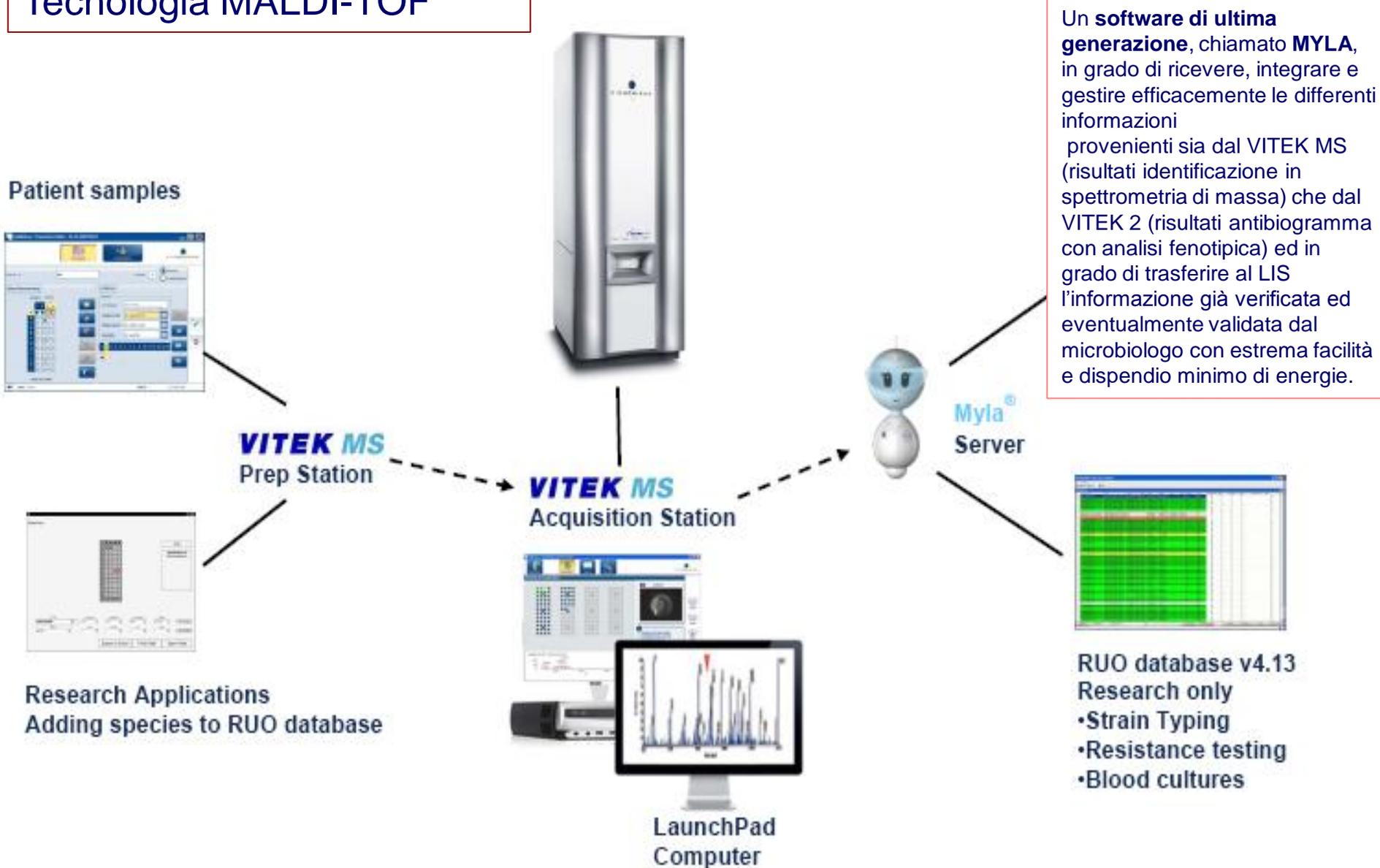


VITEK® MS: Protocol to use & store LyfoCults Plus *E.coli* ATCC® 8739™ for DAILY CALIBRATION for a MONTH



Lo spettrometro di massa
VITEK® (BIOMERIEUX)
Tecnologia MALDI-TOF

VITEK MS



Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Culture Bottles by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption–Ionization Time of Flight Mass Spectrometry Fingerprinting^{∇†}

Martin Christner,^{1*} Holger Rohde,¹ Manuel Wolters,¹ Ingo Sobottka,¹
Karl Wegscheider,² and Martin Aepfelbacher¹

*Department of Medical Microbiology, Virology and Hygiene¹ and Department of Medical Biometry and Epidemiology,²
University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistr. 52, 20246 Hamburg, Germany*

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets[∇]

Guy Prod'hom, Alain Bizzini, Christian Durussel, Jacques Bille, and Gilbert Greub*

Institute of Microbiology, University of Lausanne and University Hospital Center, Lausanne, Switzerland

Real-Time Identification of Bacteria and *Candida* Species in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry[∇]

Agnès Ferroni,^{1*} Stéphanie Suarez,¹ Jean-Luc Beretti,¹ Brunhilde Dauphin,² Emmanuelle Bille,^{1,3}
Julie Meyer,³ Marie-Elisabeth Bougnoux,^{1,3} Alexandre Alanio,¹
Patrick Berche,^{1,3} and Xavier Nassif^{1,3}

*Laboratoire de Microbiologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France¹; Andromas SAS,
156 Rue de Vaugirard, Paris, France²; and Université René Descartes Paris 5, Faculté de Médecine,
Site Necker, 156 Rue de Vaugirard, Paris, France³*

Identification of Blood Culture Isolates Directly from Positive Blood Cultures by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry and a Commercial Extraction System: Analysis of Performance, Cost, and Turnaround Time

Philippe R. S. Lagacé-Wiens,^{a,b} Heather J. Adam,^{a,b} James A. Karlowsky,^{a,b} Kimberly A. Nichol,^b Paulette F. Pang,^b Jodi Guenther,^b Amanda A. Webb,^b Crystal Miller,^b and Michelle J. Alfa^{a,b}

Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada,^a and Diagnostic Services of Manitoba, Department of Clinical Microbiology, Winnipeg, Manitoba, Canada^b

Direct MALDI-TOF Mass Spectrometry Assay of Blood Culture Broths for Rapid Identification of *Candida* Species Causing Bloodstream Infections: an Observational Study in Two Large Microbiology Laboratories

Teresa Spanu,^a Brunella Posteraro,^a Barbara Fiori,^a Tiziana D'Inzeo,^a Serena Campoli,^a Alberto Ruggieri,^a Mario Tumbarello,^b Giulia Canu,^a Enrico Maria Treccarichi,^b Gabriella Parisi,^c Mirella Tronci,^c Maurizio Sanguinetti,^a and Giovanni Fadda^a

Istituto di Microbiologia,^a Istituto di Clinica delle Malattie Infettive,^b Università Cattolica del Sacro Cuore, Rome, Italy, and Laboratorio di Microbiologia, Azienda ospedaliera San Camillo-Forlanini, Rome, Italy^c

MALDI-TOF mass spectrometry for the rapid identification of aetiological agents of sepsis

Roberto Degl'Innocenti, Tamara Brunelli, Loredana Ortega De Luna, Patrizia Miglietta, Mayra Sosa, Antonella Conti, Patrizia Casprini

Laboratorio Analisi Chimico Cliniche, Ospedale Misericordia e Dolce, ASL4, Prato

2013



STUDIO AMCLI

Obiettivo: Proporre un “Position Paper” in cui descrivere diversi protocolli di identificazione diretta dei microrganismi da emocoltura positiva mediante l’uso di flaconi Bact/Alert ed il sistema in spettrometria di massa VITEK MS

PROTOCOLLI

CS : Centrifugazione e Semina

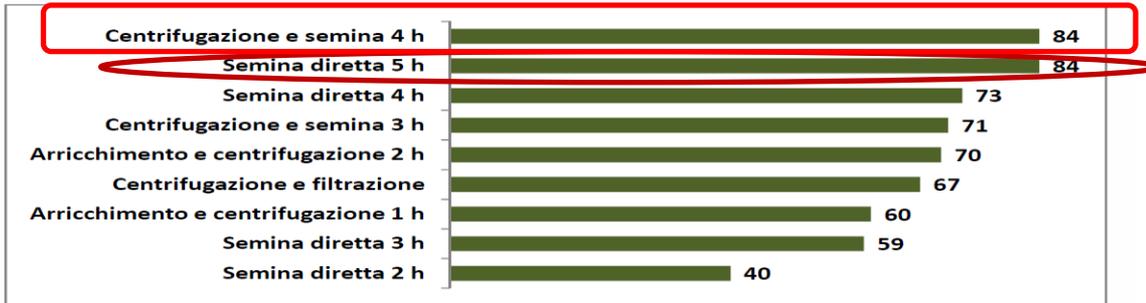
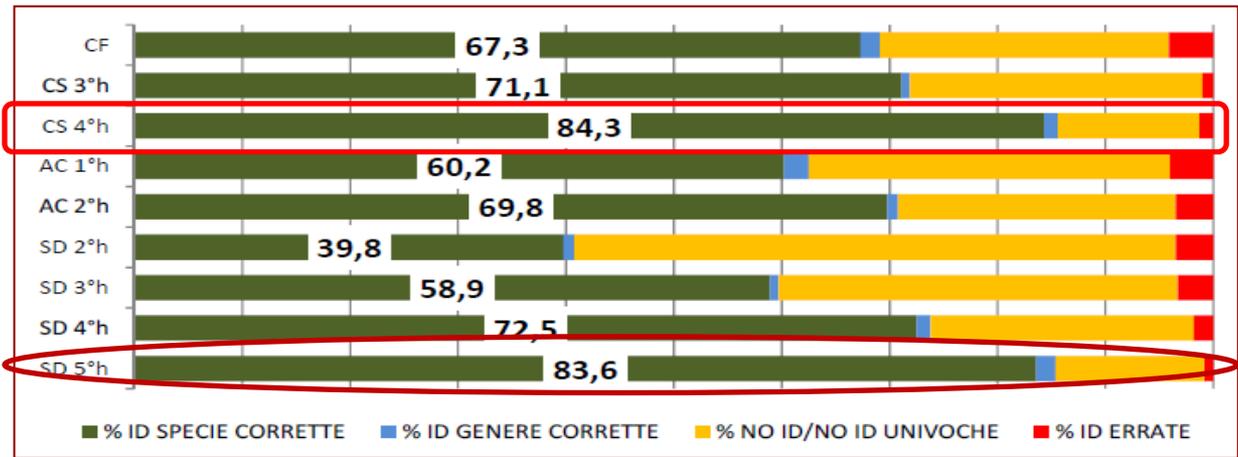
CF : Centrifugazione e Filtrazione

SD : Semina Diretta

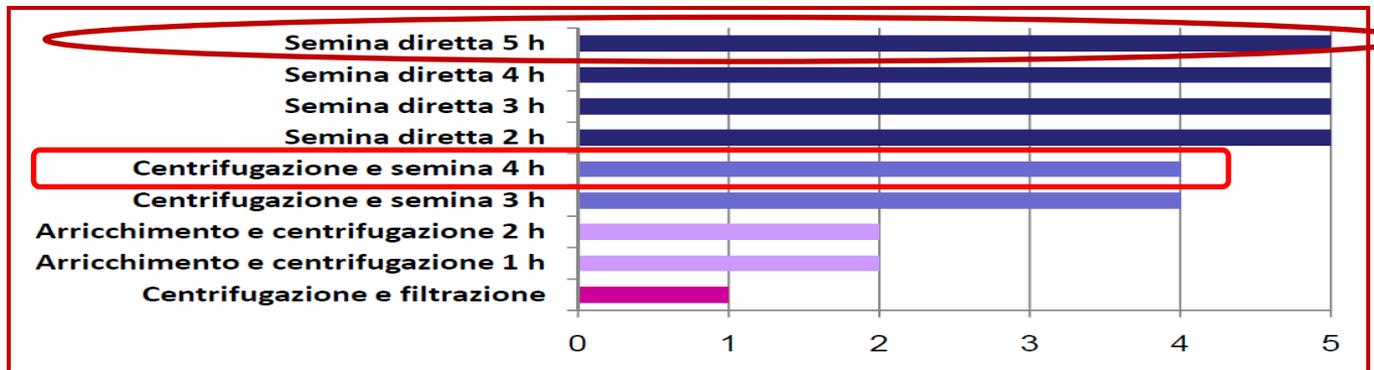
AC : Arricchimento e Centrifugazione

Raffaella Mola
Microb. Clinica NOCSAE
Baggiovara (MODENA)

VALUTAZIONI



PERFORMANCE dei diversi protocolli sperimentali (% id. concordanti a livello di specie)



Punteggi attribuiti per la FACILITA' D'USO



2014

Position paper AMCLI sulla possibilità di *Identificazione diretta dei microrganismi da emocoltura positiva con il dispositivo Vitek® MS*

M. Sarti¹, C. Farina², F. Luzzaro³, V. Sambri⁴, A. Cellini⁴, M. Cosentino², C. Mauri³, D. Nozzi¹, M.F. Pedna⁴, L. Pifferi¹ e P. Clerici⁵

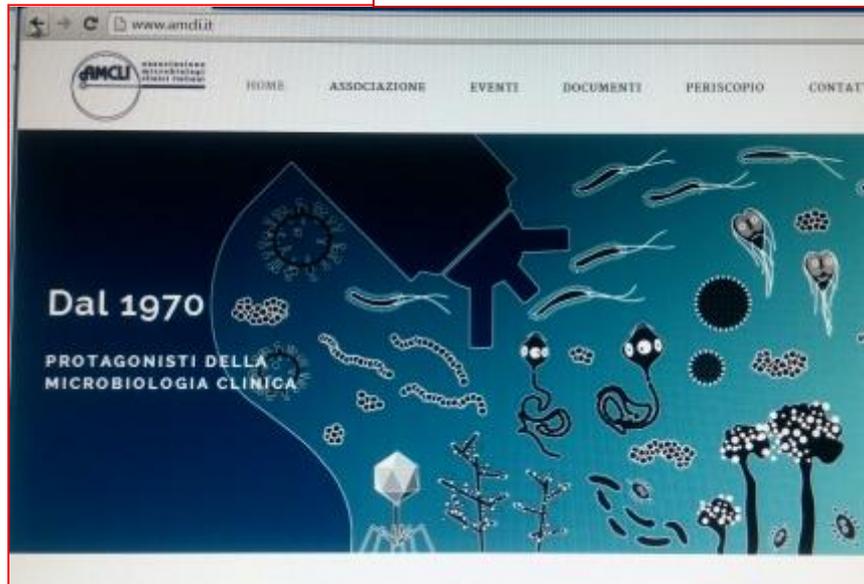
¹SSD Microbiologia Clinica Provinciale AUSL di Modena-Baggiovara (Modena)

²USC Microbiologia e Virologia AO 'Papa Giovanni XXIII' di Bergamo

³USC Microbiologia e Virologia AO della Provincia di Lecco

⁴UO di Microbiologia AUSL della Romagna - Pievesestina (Cesena)

⁵Presidente AMCLI - UO Microbiologia AO di Legnano (Milano)



Novara, oggi..... modalità operativa emocolture positive al mattino



Al mattino, semina a goccia spessa su Columbia Agar Sangue 5%



Dopo circa 5 ore, dalla crescita ottenuta, si procede all'identificazione con MALDI-TOF MS



MALDI-TOF:
rapido, accurato ed economico
per l'identificazione dei batteri

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 3463 DSM	2.194	46170
2 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 33862 THL	2.121	1280
3 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 4910 DSM	1.974	46170
4 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 20491 DSM	1.887	46170
5 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 11822 DSM	1.843	46170
6 (+)	Staphylococcus aureus ATCC 29213 THL	1.787	1280
7 (+)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 346 DSM	1.765	46170
8 (+)	Staphylococcus aureus ATCC 33591 THL	1.745	1280
9 (-)	Staphylococcus aureus ATCC 25923 THL	1.698	1280
10 (-)	Staphylococcus aureus ssp aureus DSM 20652 DSM	1.421	46170

Legend:

- 2.0-3.00 Secure genus and species identification
- 1.7-1.99 Probable genus identification
- 0.0- 1.69 Unreliable identification

Blood Culture Analysis with MBT Sepsityper IVD Kit

Blood Collection



Blood Culture System



BC Sample Preparation
MBT Sepsityper IVD Kit



Organism Identification
MALDI Biotyper



ID >2650 species of bacteria & yeast in
15-20 min after positive blood culture



Blood Culture Analysis with MBT Sepsityper IVD Kit

Workflow starting from a positive blood culture bottle



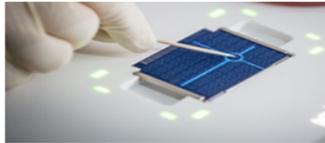
Lysis buffer



Washing buffer



Sample preparation



Harvest 1 mL blood culture liquid in an Eppendorf tube
1 min

Add **Lysis buffer** and mix
30 sec

Centrifuge (2 min, 13,000 rpm), discard supernatant
2 min

Add **Washing buffer** and mix
30 sec

Centrifuge (2 min, 13,000 rpm), discard supernatant
2 min

DT/eDT of the pellet
1 μ L matrix
1 min

MALDI Biotyper ID
„Rapid Sepsityper Workflow“

→
If no ID

Standard extraction
(EtOH, FA, ACN)
1 μ L extract
1 μ L matrix
10 min

MALDI Biotyper ID

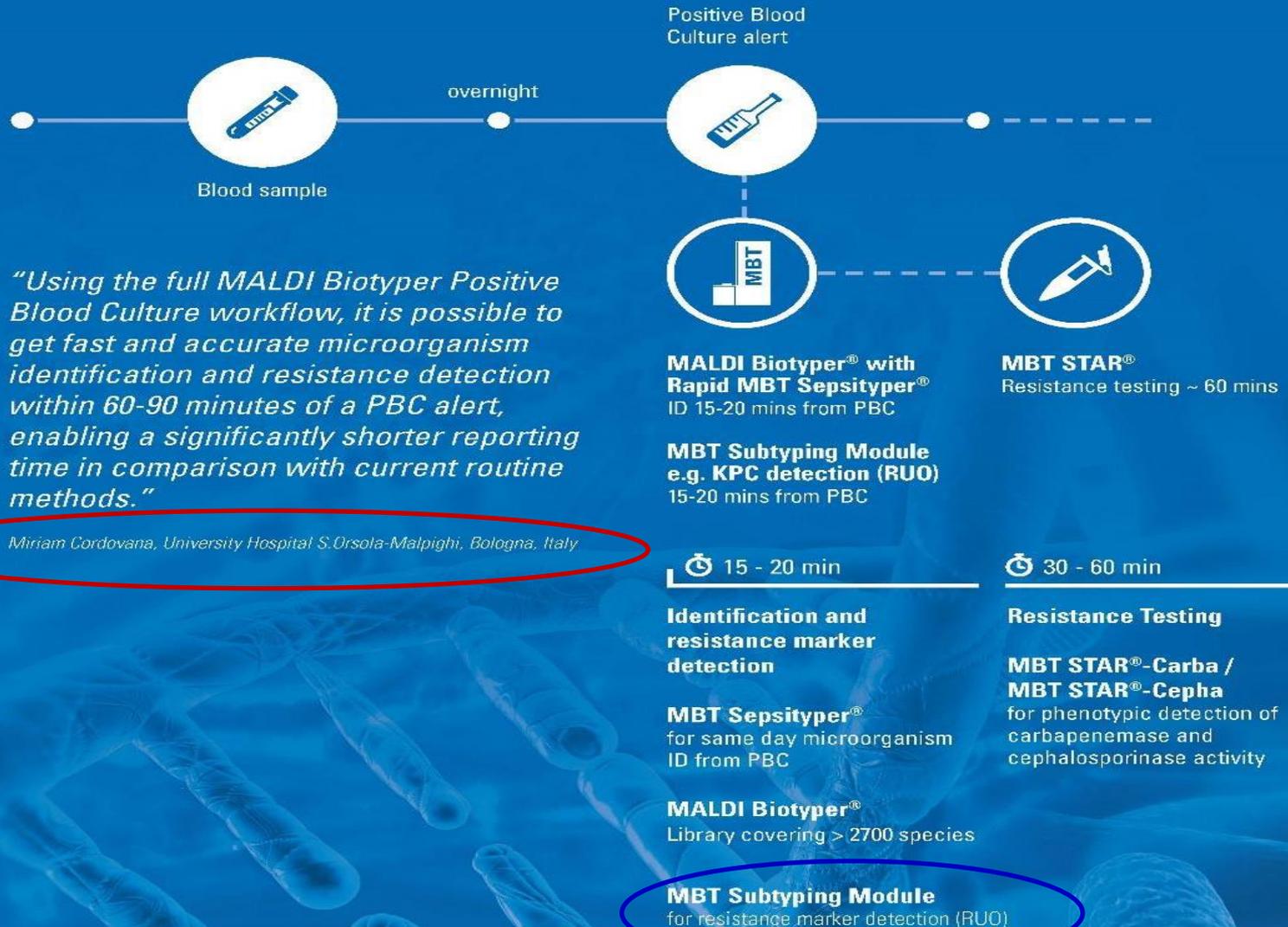
(*) Rapid Identification of Pathogens in Positive Blood Culture of Patients with Sepsis: Review and Meta-Analysis of the Performance of the Sepsityper Kit: Nils G. Morgenthaler and Markus Kostrzewa; International Journal of Microbiology Volume 2015
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4426779/>

Inoltre...

- Dedicated “**MBT Sepsityper IVD Module**” supports result management, taking into account the complexity of a sample originating from blood cells:
 - Smaller peak-picking mass range
 - Adopted log(score) thresholds

MALDI Biotyper

Rapid and Complete PBC Workflow

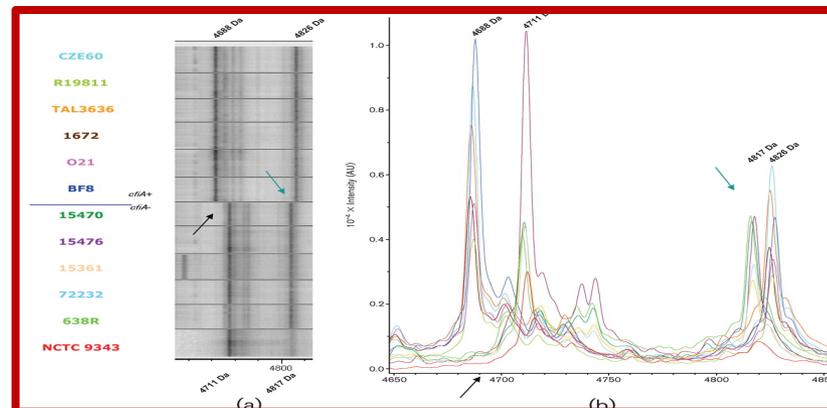


MALDI-TOF MS: subtyping

- Picchi o pattern spettrali corrispondenti a **specifici determinanti di resistenza** agli antibiotici rilevati nello spettro di massa batterico acquisito per l'identificazione di specie
 - Picco PSM e MRSA
 - *Bacteroides fragilis* e *cfiA*
 - KPC-subtyping
- La sensibilità dipende dalla prevalenza del/i clone/i che presenta il marker di resistenza tra tutti i ceppi circolanti con quella resistenza

Subtyping – *Bacteroides fragilis* (1)

- 2 gruppi di omologia del DNA (Divisione I e II)
- Divisione II → carbapenemasi cromosomica codificata dal gene *cfiA* (metallo β -lattamasi)
- Modificazioni costitutive nel pattern spettrale tra Divisione I e Divisione II → identificazione dei ceppi produttori di carbapenemasi (Nagy *et al*, 2011)



M. Cordovana

Bologna, 03.12.2018

Subtyping – *Bacteroides fragilis* (2)

- I nostri risultati

	<i>B. fragilis</i> Bologna (n=406)	<i>B. fragilis</i> Dortmund (n=4894)
<i>cfiA+</i>	41 (10.1%)	374 (7.6%)
<i>cfiA-</i>	365	4520

MUFFE



Bruker Mould Protocol

Transfer 1 ml of fungus-containing medium to a 1.5-ml Eppendorf tube

Centrifuge for 5 min, discard supernatant, wash fungal pellet twice with 1 ml distilled water

Add 300 μ l distilled water and 900 μ l ethanol, centrifuge

Dry pellet in a Concentrator Plus tube at 30°C before resuspending in 10 to 60 μ l formic acid-water (70:30 [vol/vol]) depending on the fungal mass

Incubate 10 min at room temperature, add equal volume of acetonitrile

Incubate again at room temperature for 10 min, centrifuge

Transfer 1 μ l of the supernatant to target slide, dry and overlay with 1 μ l of (HCCA) matrix solution in 50% acetonitrile-2.5% trifluoroacetic acid

bioMérieux Protocol

Collect mould material from a circle of 1 to 2 cm diameter using wet swab

Suspend in 70% ethanol, vortex, centrifuge, discard supernatant

Add 40 μ l formic acid and mix (vortex). Add 40 μ l acetonitrile and mix (vortex), centrifuge

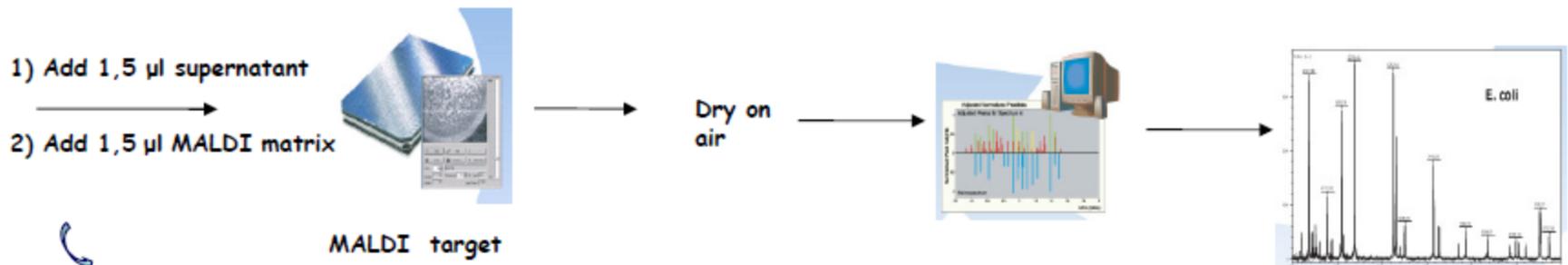
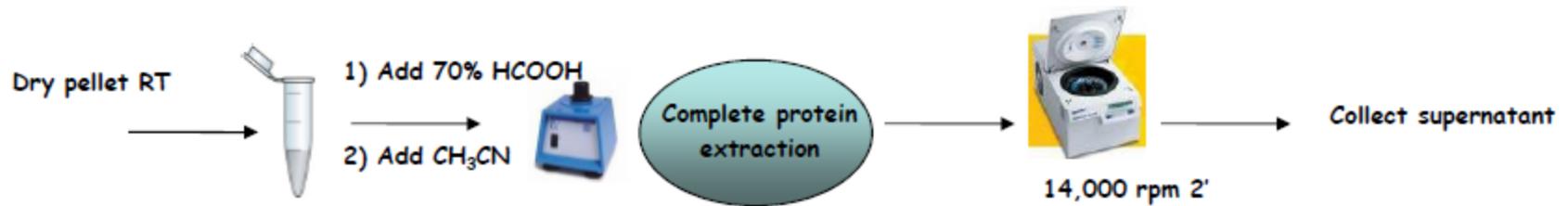
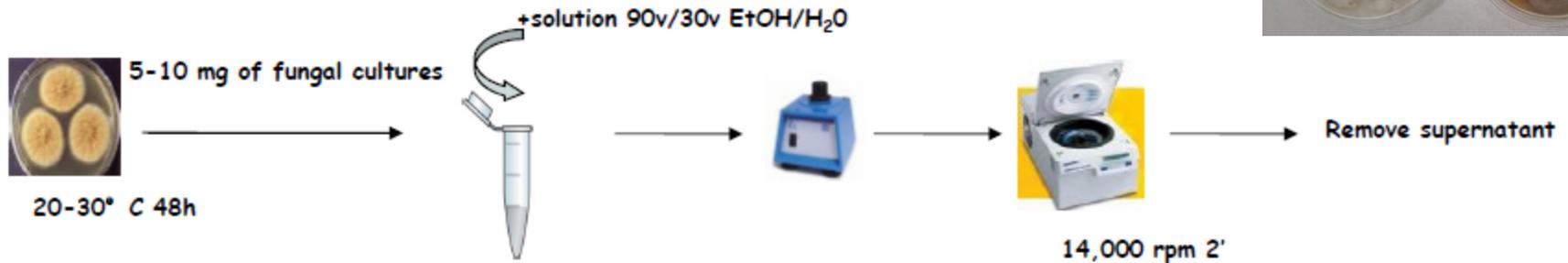
Deposit 1 μ l supernatant, dry and add 1 μ l CHCA matrix

CE

IVD

MALDI BioTyper : Standard Operation Protocols (SOP)

Organic Solvent Extraction



Matrix: saturated solution of α -cyano-4-hydroxy cinnamic acid (HCCA) in 50% acetonitrile (ACN) and 2.5% trifluoroacetic acid (TFA).

VITEK MS MOULD kit IVD – Ref. 415680

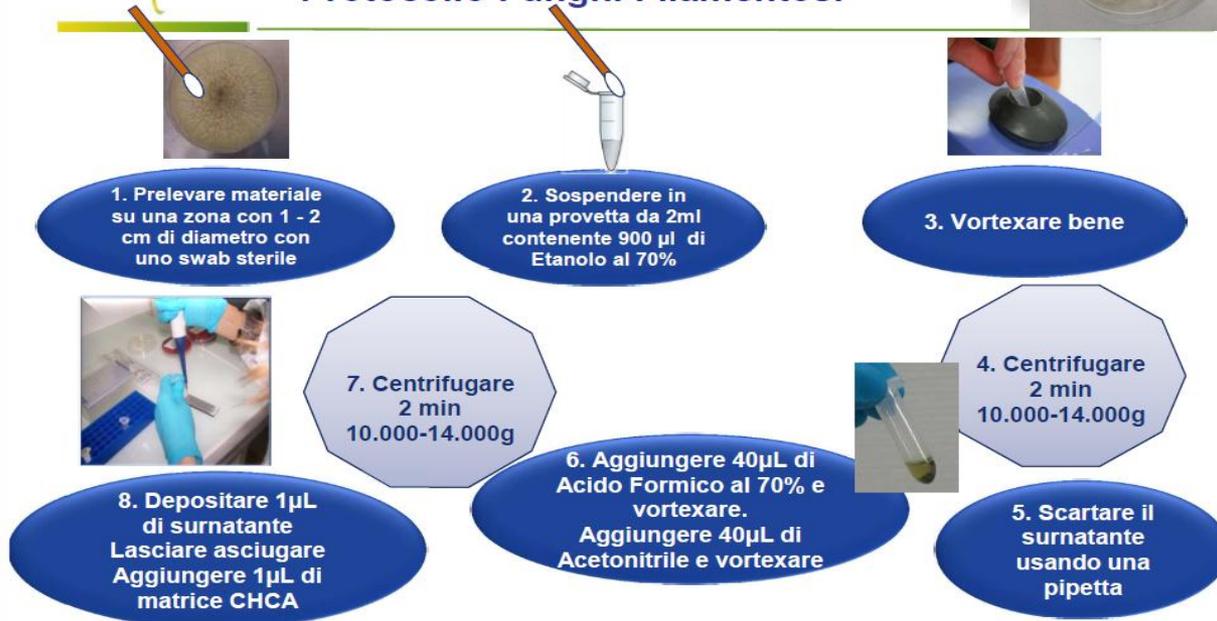
- Preparazione da terreno solido
- 100 test/kit (set da 25)
- Shelf Life: 12 Mesi, 4 settimane dopo apertura del set
- Stoccaggio: prima dell'apertura = 2-25°C – dopo apertura = 15-25°C



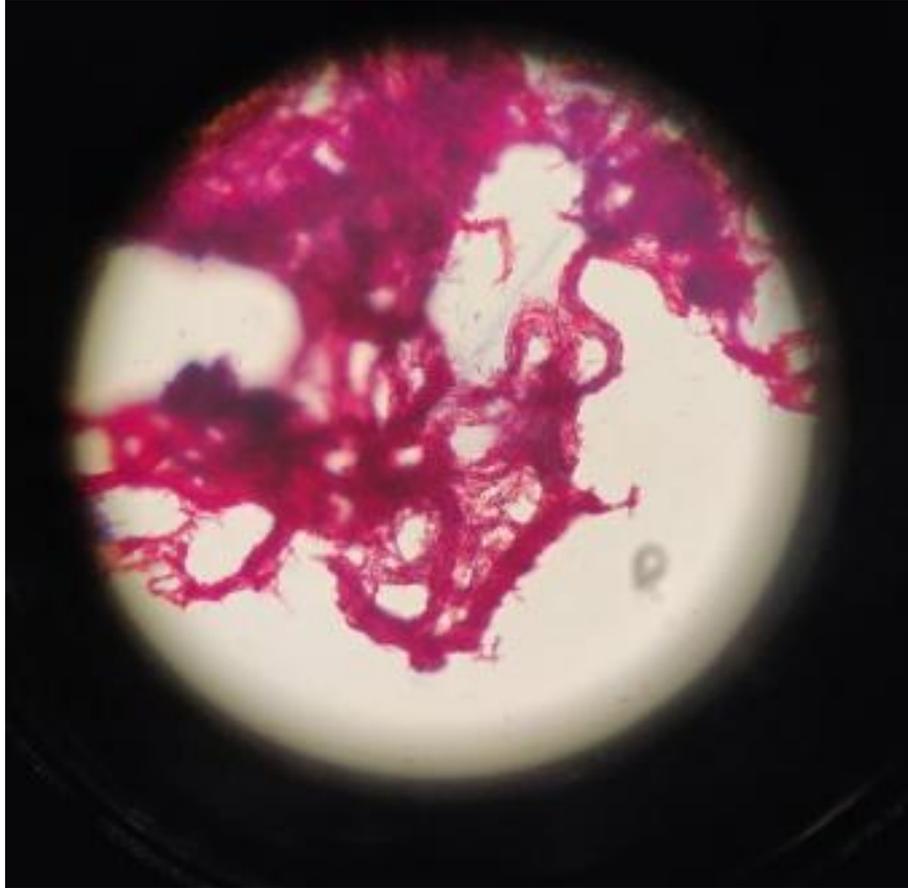
Componenti	Packaging / Quantità
Provette Eppendorf da 2ml	100
Etanolo al 70%	4 flaoncini
Acido Formico al 70%	4 flaoncini
Acetonitrile	4 flaoncini



Protocollo Funghi Filamentosi



MICOBACTERI / NOCARDIE



Protocollo micobatteri/nocardia

Bruker MycoEX

Collect bioMass from solid Medium or 1.2 ml from MGIT medium, centrifuge, discard supernatant

Suspend mycobacterial biomass in 300 μ l dH₂O

Heat inactivate using dry water bath for 30 minutes at 95C

Add 70% ethanol, centrifuge, remove supernatant

Add 50 μ l acetonitrile

Add 1x10 μ l loopful of .5mm Zirconia/Silica Beads, Vortex max for 1 minute

Add 50 μ l 70% Formic Acid, vortex for 10 seconds, centrifuge at 16160g for 2 minutes

Pipette 1 μ l of supernatant onto slide and once dry, overlay with 1ul of HCCA matrix

bioMérieux

Collect bioMass solid medium

Suspend 1 μ l loopful of growth in 500 μ l 70% EtOH

Bead beat for 5 min OR vortex for 15 minutes

Incubate for 10 min (inactivation time), vortex, transfer suspension to empty vial

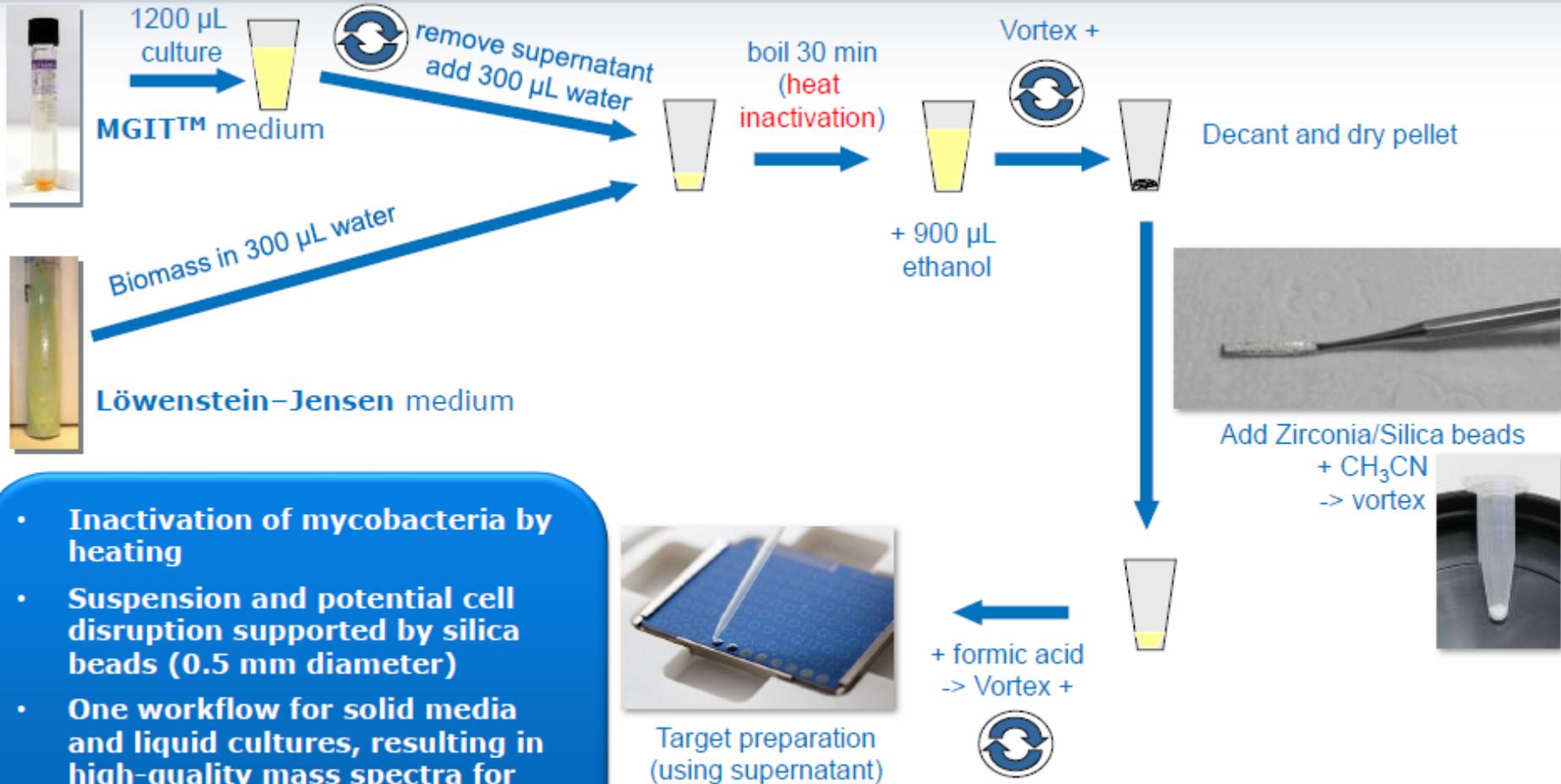
Centrifuge, remove EtOH supernatant

Add 10 μ l 70% formic acid

Add 10 μ l acetonitrile, centrifuge

Pipette 1 μ l of supernatant onto slide and once dry, overlay with 1 μ l of CHCA matrix

Protocollo micobatteri Bruker MycoEX per inattivazione/estrazione



- Inactivation of mycobacteria by heating
- Suspension and potential cell disruption supported by silica beads (0.5 mm diameter)
- One workflow for solid media and liquid cultures, resulting in high-quality mass spectra for reliable species identification

VITEK® MS MYCOBACTERIA / NOCARDIA Kit

- Preparazione da terreno solido/liquido
- 100 test/kit (set da 25)
- Data di scadenza: 12 Mesi, 4 settimane dopo apertura del set
- Stoccaggio: prima dell'apertura = 2-25°C – dopo apertura = 15-25°C

Il primo database marcato CE/IVD
per
Micobatteri / Nocardia

Componenti	Packaging / Quantità
Provette contenenti biglie in vetro	100
Provette Eppendorf da 2ml	100
Etanolo al 70%	2 flaconcini
Acido Formico al 70%	4 flaconcini
Acetonitrile	4 flaconcini



- Protocollo brevettato
- Tutto l'occorrente per l'inattivazione / estrazione da terreno solido/liquido
- **Compatibile con:**
 - BacT/ALERT® MP (BioMérieux)
 - BBL MGIT™ 960 (BD)
 - VersaTREK® Myco (Thermo Scientific)



Protocollo micobatteri VITEK® MS per inattivazione/estrazione

Inattivazione

Utilizzare una cabina di sicurezza P3

SOLIDO:

Lowenstein-Jensen, 7H10,
7H11 and Coletsos



Trasferire con ansa da 1µl, una colonia in una microprovetta da 1,5 ml contenente circa 0.5mm di biglie di vetro e 500 µl Etanolo 70%

Trasferire la sospensione in in una microprovetta da 1,5 ml contenente circa 0.5mm di biglie di vetro



LIQUIDO:

BacT/ALERT® MP, MGIT™
or VERSATREK® Myco



Vortexare la provetta per 5-10 sec. , trasferire 3 ml in una microprovetta conica da 5 ml

Centrifugare 10 min a 3000g

Eliminare il surnatante, lasciare asciugare il pellet. Risospendere il pellet con 500 µl di Etanolo 70%.

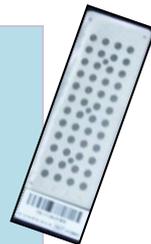
Estrazione

Risospendere il pellet con 10 µl acido formico 70%.
Vortex fino a completa omogenizzazione
Aggiungere 10µl acetonitrile
Vortex fino a completa omogenizzazione

Eliminare il surnatante

Centrifugare at 2 min*
10000 – 14000 g

Depositare 1µl supernatant su due spot(s)
Lasciare asciugare completamente.
Aggiungere 1µl matrice
Lasciare asciugare



Dopo lo step di inattivazione , la fase di estrazione può essere effettuata fuori dalla cabina di sicurezza

Centrifugare ≥2 min.
10000 – 14000 g

Vortexare e trasferire il surnatante in una microprovetta da 2ml conica
Note: non trasferire le biglie



Vortex or Bead beater
15 min 5 min

Incubare verticalmente a temperatura ambiente per 10 min
(inactivation time)

NOSTRO Protocollo micobatteri

VITEK® MS per inattivazione/estrazione

Inattivazione

Utilizzare una cabina di sicurezza P3

SOLIDO:
Lowenstein-Jensen, 7H10,
7H11 and Coletsos



Trasferire con ansa da 1µl, una colonia in una microprovetta da 1,5 ml contenente circa 0.5mm di biglie di vetro e 500 µl Etanolo 70%

Trasferire la sospensione in in una microprovetta da 1,5 ml contenente circa 0.5mm di biglie di vetro



Vortex
15 min

Incubare verticalmente a temperatura ambiente per 10 min
(inactivation time)

Eliminare il surnatante, lasciare asciugare il pellet. Risospendere il pellet con 500 µl di Etanolo 70%.

Centrifugare **20 min a 13000xg**

Vortexare la provetta per 5-10 sec. , trasferire 3 ml in una microprovetta conica da 5 ml

Dopo lo step di inattivazione , la fase di estrazione può essere effettuata fuori dalla cabina di sicurezza

Centrifugare **5 min.**
10000 – 14000 xg

Eliminare il surnatante

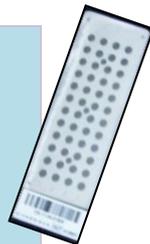
Vortexare e trasferire il surnatante in una microprovetta da 2ml conica
Note: non trasferire le biglie



Risospendere il pellet con 10 µl acido formico 70%.
Vortex fino a completa omogenizzazione
Aggiungere 10µl acetonitrile
Vortex fino a completa omogenizzazione

Centrifugare at 2 min*
10000 – 14000 xg

Depositare 1µl supernatant su due spot(s)
Lasciare asciugare completamente.
Aggiungere 1µl matrice
Lasciare asciugare



Estrazione

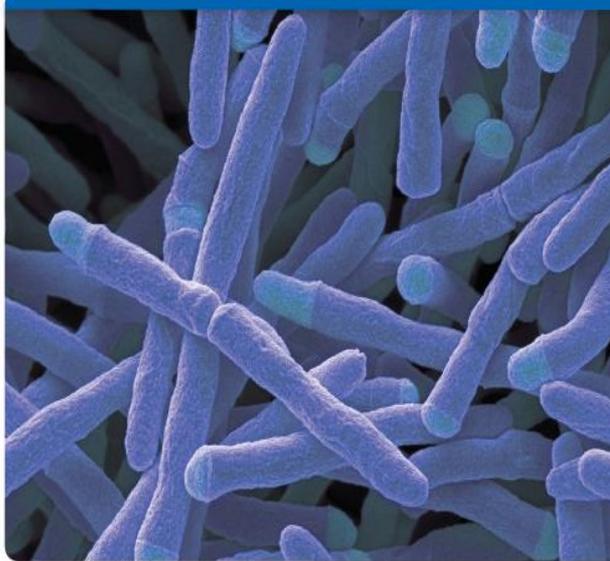
LIQUIDO:
BacT/ALERT® MP, MGIT™
or VERSATREK® Myco



Mycobacteria Library

The MALDI Biotyper Mycobacteria Suite is the comprehensive solution for laboratories in need of highly reliable and fast mycobacteria identification via MALDI-TOF mass spectrometry. The MBT Mycobacteria IVD Library 1.0 covers 164 of the currently known 180 mycobacteria species. 790 Strains - of which more than 470 are clinical isolates - cover the natural variability of *Mycobacterium* species. MBT Mycobacteria IVD SW Module with adapted data acquisition and analysis secures high sensitivity of mycobacteria identifications.

IVD Edition



Mycobacteria Identification

● MALDI Biotyper®

164 species entries

<i>M. abscessus</i> subsp. <i>abscessus</i>	<i>M. conspicuum</i>	<i>M. komossense</i>	<i>M. porcinum</i>
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	<i>M. cookii</i>	<i>M. koreense</i>	<i>M. poriferarum</i>
<i>M. abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i>	<i>M. cosmeticum</i>	<i>M. kubicae</i>	<i>M. pseudoshottsii</i>
<i>M. africanum</i>	<i>M. crocinum</i>	<i>M. kumamotoense</i>	<i>M. psychrotolerans</i>
<i>M. agri</i>	<i>M. diemhoferi</i>	<i>M. kyorinense</i>	<i>M. pulveris</i>
<i>M. aichiense</i>	<i>M. doricum</i>	<i>M. lacus</i>	<i>M. pyrenivorans</i>
<i>M. algericum</i>	<i>M. duvalii</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. rhodesiae</i>
<i>M. alvei</i>	<i>M. elephantis</i>	<i>M. litorale</i>	<i>M. riyadhense</i>
<i>M. alsense</i>	<i>M. engbaekii</i>	<i>M. llatzerense</i>	<i>M. rufum</i>
<i>M. angelicum</i>	<i>M. europaeum</i>	<i>M. longobardum</i>	<i>M. rutilum</i>
<i>M. anyangense</i>	<i>M. fallax</i>	<i>M. madagascariense</i>	<i>M. salmoniphilum</i>
<i>M. arabiense</i>	<i>M. farcinogenes</i>	<i>M. mageritense</i>	<i>M. saopaulense</i>
<i>M. aromaticivorans</i>	<i>M. flavescens</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
<i>M. arosiense</i>	<i>M. florentinum</i>	<i>M. mantanii</i>	<i>M. saskatchewanense</i>
<i>M. arupense</i>	<i>M. fluoranthivorans</i>	<i>M. marinum</i>	<i>M. sediminis</i>
<i>M. asiaticum</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>acetamidolyticum</i>	<i>M. marsillense</i>	<i>M. senegalense</i>
<i>M. aubagnense</i>	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	<i>M. microti</i>	<i>M. senuense</i>
<i>M. aurum</i>	<i>M. fragae</i>	<i>M. minnesotense</i>	<i>M. seculense</i>
<i>M. austroafricanum</i>	<i>M. franklinii</i>	<i>M. monacense</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i>	<i>M. frederiksbergense</i>	<i>M. montefiorensis</i>	<i>M. setense</i>
<i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	<i>M. gadium</i>	<i>M. moriokaense</i>	<i>M. sherrisii</i>
<i>M. avium</i> subsp. <i>silvaticum</i>	<i>M. gastris</i>	<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. shimoidei</i>
<i>M. bacteremicum</i>	<i>M. genavense</i>	<i>M. murale</i>	<i>M. shinjukuense</i>
<i>M. boenickei</i>	<i>M. gilvum</i>	<i>M. nebraskense</i>	<i>M. simiae</i>
<i>M. bohemicum</i>	<i>M. goodii</i>	<i>M. neoaurum</i>	<i>M. smegmatis</i>
<i>M. botniense</i>	<i>M. hippocampi</i>	<i>M. neworleansense</i>	<i>M. sphagni</i>
<i>M. bourgelatii</i>	<i>M. gordona</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. stomatepiae</i>
<i>M. bovis</i>	<i>M. haemophilum</i>	<i>M. noviomagensis</i>	<i>M. szulgai</i>
<i>M. branderi</i>	<i>M. hassiacum</i>	<i>M. novocastrensis</i>	<i>M. terrae</i>
<i>M. brisbanense</i>	<i>M. heckeshornense</i>	<i>M. obuense</i>	<i>M. thermoresistibile</i>
<i>M. brumae</i>	<i>M. heidelbergense</i>	<i>M. pallens</i>	<i>M. tokaiense</i>
<i>M. canariensis</i>	<i>M. heraklionense</i>	<i>M. palustre</i>	<i>M. triplex</i>
<i>M. caprae</i>	<i>M. hiberniae</i>	<i>M. paraense</i>	<i>M. triviale</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. hodleri</i>	<i>M. paraffinicum</i>	<i>M. tuberculosis</i>
<i>M. celeriflavum</i>	<i>M. holsaticum</i>	<i>M. parafortuitum</i>	<i>M. tusciae</i>
<i>M. chelonae</i>	<i>M. houstonense</i>	<i>M. paragordoniae</i>	<i>M. vaccae</i>
<i>M. chimaera</i>	<i>M. immunogenum</i>	<i>M. parakoreense</i>	<i>M. vanbaalenii</i>
<i>M. chitae</i>	<i>M. insubricum</i>	<i>M. parascrofulaceum</i>	<i>M. vulneris</i>
<i>M. chlorophenolicum</i>	<i>M. interjectum</i>	<i>M. paraseoulense</i>	<i>M. wolinskyi</i>
<i>M. chubuense</i>	<i>M. intermedium</i>	<i>M. parmense</i>	<i>M. xenopi</i>
<i>M. colombiense</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. peregrinum</i>	
<i>M. conceptionense</i>	<i>M. iranicum</i>	<i>M. phlei</i>	
<i>M. confluentis</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. phocaicum</i>	

New species

VITEK® MS

Mass Spectrometry Powered
by Microbiology



VITEK® MS inactivation and extraction reagent kits are available with the first IVD-CE marked database for mycobacteria, Nocardia and moulds.
Database now with 1046 species.

Yeasts

Moulds

Nocardia

Mycobacteria

Bacteria

Mycobacteria

<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium immunogenum</i>
<i>Mycobacterium agri</i>	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
<i>Mycobacterium arupense</i>	<i>Mycobacterium kansasii</i>
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Mycobacterium kubicae</i>
<i>Mycobacterium aurum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>
<i>Mycobacterium brisbanense</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>
<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>
<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium cosmeticum</i>	<i>Mycobacterium nebraskense</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium neoaurum</i>
<i>Mycobacterium alvei</i>	<i>Mycobacterium paraffinicum</i>
<i>Mycobacterium farcinogenes</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>
<i>Mycobacterium fortuitum ssp fortuitum</i>	<i>Mycobacterium shimoidei</i>
<i>Mycobacterium houstonense</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium porcinum</i>	<i>Mycobacterium szulgai</i>
<i>Mycobacterium senegalense</i>	<i>Mycobacterium triplex</i>
<i>Mycobacterium gastrii</i>	<i>Mycobacterium africanum</i>
<i>Mycobacterium genavense</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>Mycobacterium goodii</i>	<i>Mycobacterium canettii</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	<i>Mycobacterium vaccae</i>
	<i>Mycobacterium xenopi</i>

49 specie di micobatteri

Automazione

Non è semplificare il lavoro
ma gestione di processi complessi
integrati ad un livello superiore

Richiede
integrazione di numerose conoscenze
rapidità di decisione

Summer School TSLB
GLaTeLab
Gruppo di Lavoro per lo Sviluppo Professionale
Continuo dei Tecnici di Laboratorio
Sezione Regione Valle d'Aosta



AMCLI SUMMER SCHOOL

Corso Teorico-Pratico di Micologia Clinica per Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico



AOSTA, 18-21 SETTEMBRE 2019

18 Settembre 2019
Sala Maria della Vigliano
Piazza Dell'Opera, 1
Aosta

19-20-21 Settembre 2019
Istituzione scolastica di istruzione
tecnica "Innocent Manzotti"
Via Chambery, 105
Aosta

Per la sessione pratica del corso è prevista, in laboratorio, la presenza di strumenti automatici per la diagnostica molecolare con relativi kit di cartucce che verranno utilizzati dai discenti. Oggi vi sono molteplici strumenti per la diagnostica molecolare - microbiologica, pertanto per la presentazione di strumenti, che non saranno disponibili in laboratorio (parebbe impossibile averli tutti), verranno utilizzati video con il quale si mostrerà la corretta procedura per la preparazione dei campioni. In laboratorio vi saranno kit di alcuni di questi strumenti che i discenti utilizzeranno, dopo le dimostrazioni video. Si procederà fino alla fase che precede l'inserimento nello strumento per poi passare alla fase di lettura e valutazione del risultato.

I Responsabili Scientifici

PROGRAMMA

Mercoledì 18 settembre 2019

14:30 Saluto delle Autorità
Saluto del Presidente AMCLI
P. Clerici

La finestra Europea della Summer School
D. Marchetti

15:00 - 15:20 Introduzione
E. Magliano, P.G. Montanera

Moderatori: P. Clerici, P.G. Montanera

15:20 - 15:40 Il lavaggio delle mani: il gesto che salva la vita - E. Magliano

15:40 - 16:10 Il microbiota - M. Sanguinetti

16:10 - 16:40 in definizione

16:40 - 17:00 Novità in ambito EUCAST: area di incertezza tecnica (ATU), quale coinvolgimento per il TSLB? - N. Corbo

17:00 - 17:30 Confronto/dibattito sugli argomenti della sessione
Tutti i relatori della sessione

Giovedì 19 settembre 2019

Moderatori: E. Magliano, P.G. Montanera

08:30 - 10:30 Generalità sulle micosi - S. Andreoni

10:30 - 10:45 Pausa caffè

10:45 - 11:45 La fase preanalitica: modalità di raccolta, conservazione ed invio dei campioni biologici per gli esami micologici - A. Camaggi

11:45 - 13:00 I dermatofiti - P. Fazio

13:00 - 14:00 Pausa pranzo

14:00 - 18:00 Esercitazione pratica da parte di tutti i partecipanti
S. Andreoni, M. Conte, C. Farina, G. Lombardi, P. Fazio, C. Philippot

PROGRAMMA

Venerdì 20 settembre 2019

Moderatori: G. Flamminio, P.G. Montanera

08:30 - 09:30 Biologia dei miceti - G. Lombardi

09:30 - 10:30 Miceti non coltivabili - M. Conte

10:30 - 10:45 Pausa caffè

10:45 - 12:00 Miceti filamentosi - C. Farina

12:00 - 13:00 Tecniche diagnostiche tradizionali, test molecolari e altre attualità diagnostiche.
A. Camaggi - N. Corbo

13:00 - 14:00 Pausa pranzo

14:00 - 18:00 Esercitazione pratica da parte di tutti i partecipanti
S. Andreoni, A. Camaggi, M. Conte, N. Corbo, C. Farina, G. Lombardi, P. Fazio, C. Philippot

Sabato 21 settembre 2019

Moderatori: E. Magliano, G. Flamminio

08:30 - 10:30 I lieviti - S. Andreoni, G. Lombardi

10:30 - 10:45 Pausa caffè

10:45 - 11:45 Tecniche diagnostiche tradizionali, test molecolari e altre attualità diagnostiche
A. Camaggi - N. Corbo

11:45 - 13:00 Esercitazione pratica da parte di tutti i partecipanti
S. Andreoni, A. Camaggi, M. Conte, N. Corbo, C. Farina, G. Lombardi, P. Fazio, C. Philippot

13:00 Chiusura del Corso

DA NON PERDERE...

