

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie

(Prof. Dr. med. U. Groß)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Verbesserung der MALDI-TOF-
basierten Identifizierung
humanpathogener Pilze durch die
Erstellung individueller Datenbanken**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Mareike Yinka Bernhard

aus Koblenz

Göttingen 2022

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen unter der direkten Betreuung von Dr. O. Bader angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. med W. Brück
Referent/in	Prof. Dr. med U. Groß
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med S. Scheithauer
Promotor:	Prof. Dr. med R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 12.12.2023

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Verbesserung der MALDI-TOF-basierten Identifizierung humanpathogener Pilze durch die Erstellung individueller Datenbanken" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Koblenz, den 12.07.2022

.....
(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert wurden teilweise publiziert:

Bernhard M, Weig M, Zautner AE, Gross U, Bader O (2014): Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts. *J Clin Microbiol*, 4163–67

Impact Factor 2014: 3,993 (2014)

Bernhard M, Zautner AE, Steinmann J, Weig M, Groß U, Bader O (2016): Towards proteomic species barcoding of fungi – An example using *Scedosporium/Pseudallescheria* complex isolates. *Fungal Biol* 162–65

Impact factor 2,50 (2016)

Bernhard M, Worasilchai N, Kangogo M, Bii C, Trzaska WJ, Weig M, Groß U, Chindamporn A, Bader O (2021): CryptoType – Public Datasets for MALDI-TOF-MS Based Differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* Complexes. *Front Cell Infect Microbiol*, 634382

Impact factor: 4,83 (2020)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	3
1. Einleitung	5
1.1. Vom Beginn der medizinischen Mykologie bis heute.....	6
1.2. Funktion des MALDI Biotyper Systems	9
2. Material und Methoden	12
2.1. Pilzstämmen und Kulturbedingungen:	12
2.2. Probenbearbeitung und Herstellung der Spektren	13
2.3. Herstellung der MALDI Biotyper Datenbank Spektren	15
3. Ergebnisse	16
3.1. Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts.....	16
3.2. Towards proteomic species barcoding of fungi- an example using <i>Scedosporium /Pseudallescheria</i> genus isolates	21
3.3. CryptoType – datasets for MALDI-TOF based differentiation of <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> complex isolates.....	24
4. Diskussion.....	30
5. Zusammenfassung	34
6. Anhang	35
6.1. Anhang A: Importanleitung der YOTL Spektren.....	36
7. Literaturverzeichnis.....	38
8. Publikationen	44

8.1. Bernhard et al. 2014 JCM.....	45
8.1.1. Bekannte Zitierungen dieses Artikels (Stand Juni 2022):	50
8.2. Bernhard et al. 2015, bms... ..	52
8.2.1. Bekannte Zitierungen dieses Artikels, (Stand Juni 2022).....	56
8.3. Bernhard et al 2021, frontiers... ..	58
8.3.1. Bekannte Zitierungen dieses Artikels, (Stand Juni 2022).....	64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tuschepräparat eines <i>Cryptococcus</i> Isolates (CBS 10085) unter dem Lichtmikroskop	7
Abbildung 2: Germ-tube-test	7
Abbildung 3: Funktionsweise MALDI ToF MS.....	10
Abbildung 4: Unterschiede in den Massenspektren	11
Abbildung 5: Vergleich von Massenspektren hergestellt mit den drei unterschiedlichen Präparationsmethoden.....	15
Abbildung 6: Ergebnisse internen Validierung.....	19
Abbildung 7: Dendrogramm der erstellten Referenzstämme	22
Abbildung 8: Massenunterschiede innerhalb des <i>S. apiospermum</i> Komplex.....	23
Abbildung 9: Ergebnisse der Validierung der erstellten Referenzstämme.....	26
Abbildung 10: Clusteranalyse des <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i> Komplex.....	27
Abbildung 11: identische Spektren ohne und nach Entfernung der Cryptococcenkapsel.	29
Abbildung 12: Unterschiede in den Massenspektren bei verschiedenen Präparationsprotokollen	31

1. Einleitung

Infektionen durch humanpathogene Pilze stellen ein immer größer werdendes Problem in der Infektiologie dar. Die Inzidenz der invasiven Mykosen ist in den letzten Jahren steigend (McNeil et al. 2001; Yapar 2014) und liegt für die invasive Candidose in Europa zur Zeit bei etwa 8:100000 (Yapar 2014). Die ansteigenden Erkrankungsfälle lassen sich durch die Zunahme von begünstigenden Faktoren ableiten. Hierzu gehören Organ- oder Stammzelltransplantationen, sowie auch zugrundeliegende Malignome oder immunsuppressive Erkrankungen. Weitere Risikofaktoren für eine invasive Mykose sind die Einnahme von Breitbandantibiotika, Immunsuppressiva oder Chemotherapien, die gestiegene Lebenserwartung oder periphere und zentrale Zugänge (Pfaller und Diekema 2007; Yapar 2014). Bei der invasiven Candidose handelt es sich mittlerweile um die vierthäufigste nosokomiale Sepsis in den USA.

Aufgrund der Häufigkeit von Mykosen und den hohen Mortalitätsraten ist eine schnelle und genaue Erregerdiagnostik auf Spezies- oder in manchen Fällen Subspeziesebene für den Patienten überlebenswichtig.

Auch für die Epidemiologie ist die Speziesbestimmung und teils Subspeziesbestimmung wichtig, da durch Migrationsbewegungen und klimatische Veränderungen eine Verschiebung der Erregervorkommen und neue Infektionen stattfinden können. Dies kann am Beispiel des Ausbruchs von *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Kanada verdeutlicht werden. Dieser Hefepilz war bisher in tropischen und subtropischen Regionen endemisch und wurde 1999 erstmals in Vancouver Island, British Columbia, Kanada nachgewiesen. Er verursachte dort eine Epidemie mit 218 Erkrankten, die hauptsächlich unter Pneumonien litten, jedoch gab es auch Fälle von Nervensystembeteiligungen und Meningitis. 19 Patienten verstarben. Das Reservoir von *Cryptococcus gattii* sind einheimische Bäume und er wurde auf diesen, der umgebenen Luft und Erde nachgewiesen. Die Menschen infizieren sich durch das Einatmen von Hefen und Sporen. Anders als bei Infektionen durch *Cryptococcus neoformans* erkranken auch immunkompetente Personen. Während dieses Ausbruches wurden 2 verschiedene Subspezies von *Cryptococcus gattii* nachgewiesen, die im Verdacht standen unterschiedlich virulent zu sein (Galanis 2010).

Beispiele wie diese zeigen, wie wichtig eine möglichst genaue und schnelle Erregerdiagnostik ist, zum einen um erkrankte Patienten schnellstmöglich eine adäquate

Therapie zukommen zu lassen, zum anderen jedoch auch um Epidemien zu erkennen, zu bekämpfen und bestenfalls vorherzusehen: Durch die Weiterentwicklung der Untersuchungsmethoden von der Mikroskopie bis zur heutigen Massenspektrometrie wurde dies versucht zu beschleunigen und zu optimieren.

1.1. Vom Beginn der medizinischen Mykologie bis heute

Der Beginn der medizinischen Mykologie geht zurück auf das Jahr 1939. In diesem Jahr entdeckte und beschrieb Johann Lucas Schönlein, Direktor der medizinischen Klinik in Zürich, den Flavuserreger (*Trichophyton schoenleinii*), einem Dermatophyten der eine Kopfhauterkrankung verursacht. Er brachte Beobachtungen des Italieners Brassi mit seinen eigenen Beobachtungen an Patienten in Verbindung. Im gleichen Jahr identifizierte der unter anderem in Göttingen arbeitende Chirurg Bernhard Rudolf Conrad von Langenbeck eine *Candida* Spezies als Auslöser einer Infektion der Ösophagusschleimhaut (Prof. Dr. Seebacher 2021).

Diese beiden unabhängig voneinander gemachten Entdeckungen werden als die Geburtsstunde der medizinischen Mykologie bezeichnet. Der Nachweis humanpathogener Pilze erfolgte zunächst mittels Lichtmikroskopie nach Probenaufbereitung und spezieller Färbemethoden (Groß). Wichtige Färbemethoden sind zum Beispiel die Grocott-Versilberung, in der Pilze sich schwarz darstellen, die Periodic Acid-Schiff (PAS) Färbung, in der sie rot angefärbt werden (Kempf und Kempf-Hantschke-Kutzner-Burgdorf 2015) oder das India Ink Tuschepräparat, zum Kapselnachweis der Cryptococcen (Zettl 2005).

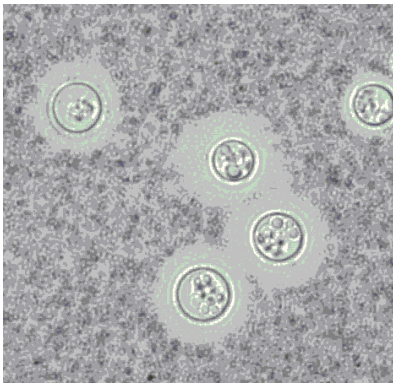


Abbildung 1: Tuschepräparat eines *Cryptococcus* Isolates (CBS 10085) unter dem Lichtmikroskop

Auch heute spielt die einfache Lichtmikroskopie, erweitert um die Fluoreszenzmikroskopie, eine wichtige Rolle in der klinischen Diagnostik, da das Verfahren einfach und schnell ist und keine Inkubation erfordert. Innerhalb einer oder weniger Stunden kann eine Aussage über das Vorhandensein humanpathogener Pilze getroffen werden. Eine genaue Bestimmung auf Spezieslevel ist jedoch nicht möglich (Willinger 2006).

Durch das wachsende Wissen über pathogene Pilze konnten spezifischere Tests entwickelt werden. Ein Beispiel dafür ist der „Germ tube test“. Dieser Test ist seit 1960 bekannt und dient zur Trennung von *C. albicans* und *C. dubliniensis* von anderen Candidaspezies. Hierbei werden die Hefen bei 37°C inkubiert und bilden filamentöse Verlängerungen ausgehend von der Hefezelle aus. Charakteristisch ist, dass diese Hyphen keine Verengung an der „Mutterzelle“ haben (Taschdjian 1960).

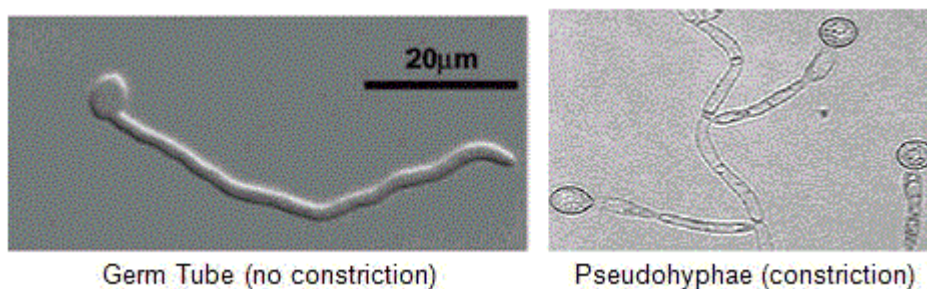


Abbildung 2: Germ-tube-test Ausbildung einer Hyphe (links) und einer Pseudohype (rechts) (Quelle: <https://microbiologyinfo.com/germ-tube-test-principle-procedure-results-interpretation-and-limitations/>)

Das zunehmende Wissen spiegelt sich in der Entwicklung neuerer Testverfahren wider, die auf speziesspezifischem Pilzwachstum basieren: Sie beruhen beispielsweise auf der Analyse von verschiedenfarbigem Wachstum, die man Spezies aufgrund von verschiedenen Fermentationen und Assimilationen zuordnen konnte, oder auf enzymatischen und immunologischen Tests mit mono- und polyklonalen Antikörpern. Diese Tests können bei Mischinfektionen direkt auf der Isolationsplatte durchgeführt werden. Somit können Ergebnisse schon nach wenigen Stunden abgelesen werden. Es können jedoch nur einzelne Spezies gezielt nachgewiesen werden und die Auswertung von Ergebnissen anhand von Farbtafeln bleibt subjektiv. Für Routinelabore sind im Alltag die diagnostische Unsicherheit, der Materialverbrauch und der hohe Arbeitsaufwand erheblich und diese Methoden damit unattraktiv (Freydiere et al. 2001).

Modernere und genauere Identifizierungsmethoden basieren heutzutage auf der Identifikation von spezifischen DNA- oder RNA-Sequenzen, die mittels PCR amplifiziert und anschließend sichtbar gemacht oder sequenziert werden. Die amplifizierten Sequenzen werden mit bestehenden Sequenzen aus Referenzdatenbanken verglichen. Auf dieser Grundlage wurden verschiedene Tests entwickelt und zum Teil zu Testkits zusammengestellt, die eine automatisierte Analyse ermöglichen. Mittels einiger dieser Methoden ist ein direkter Nachweis verschiedener Erreger möglich, sodass eine zeitaufwendige Kultivierung nicht mehr nötig ist (Schubert und Wieser 2013). Hierdurch können Ergebnisse bereits am Tag der Probenentnahme erzielt werden und der Nachweis von Erregern, die sich schlecht anzüchten lassen, ist möglich. Im Gegensatz zu den phänotypischen Methoden ist die Identifizierung von Probenmaterial mittels Gen-Sequenzierung nicht auf eine Auswahl an Spezies begrenzt, vorausgesetzt die Sequenzen lassen sich in Datenbanken finden. Jedoch ist die Probenaufarbeitung aufwendig und Labore haben einen hohen Materialbedarf mit hohen Anschaffungskosten.

Das neueste Verfahren in der mikrobiologischen Diagnostik ist die Massen-spektrometrie, bei dem speziesspezifische Massenspektren erstellt und mit einer Datenbank abgeglichen werden (siehe Abschnitt 1.2). Für die Probenaufbereitung werden dabei wenige Arbeitsschritte benötigt, der Materialverbrauch ist gering und alle Spezies, die in der Datenbank vertreten sind lassen sich identifizieren (Schubert und Wieser 2013). Hieran kann eine automatische Befundung angeschlossen werden und wie in der folgenden Arbeit gezeigt werden können die Datenbanken leicht manuell erweitert werden.

1.2. Funktion des MALDI Biotyper Systems

In den meisten Routinelaboren geschieht der Erregernachweis heutzutage mittels Massenspektroskopie, welche sich als ein schnelles und zuverlässiges Werkzeug im Bereich der klinischen Mikrobiologie etabliert hat, die Mykologie eingeschlossen (Marklein et al. 2009). Das Massenspektrometer erstellt dabei aus der Flugzeit ionisierter Moleküle ein für jede Spezies charakteristisches Massenspektrum, einem sog. molekularen Fingerabdruck.

Hierfür wird die anhand verschiedener Standardprotokolle (siehe Kapitel 1.2.2.) aufbereitete Probe auf ein Metalltarget, eine hochpolierte Platte mit definierten Probenplätzen, aufgebracht und mit einer Matrixlösung bedeckt. Die Matrixlösung schließt die Proteine in ein Kristallgitter ein. Die eingeschlossene Probe wird mit einem Laser impulsartig beschossen, wodurch u.a. auch Proteine ionisiert und explosionsartig in Gasform freigesetzt werden. Im Vakuum werden die ionisierten Proteine in einem elektromagnetischem Feld beschleunigt und ihre Flugzeit an einem Ionendetektor gemessen (Abbildung 3). Die verschiedenen Signale entstehen dabei durch die verschiedenen Flugzeiten der ionisierten Proteine, wobei kleinere Massen schneller beschleunigen als größere. Aus diesen Flugzeiten entsteht ein individuelles Spektrum aller Proteine der Probe. Die Spektren sind innerhalb einer Spezies reproduzierbar, jedoch unterschiedlich zu anderen, auch nah verwandten Spezies, (Abbildung 4).

Diese Spektren können durch automatisierte Prozesse analysiert und zum Nachweis von Erregern im klinischen Alltag verwendet werden. Dazu werden die beobachteten Massen des erstellten Spektrums mit Referenzspektren, die zu einer Datenbank zusammengefasst sind, in einem herstellerepezifischen Algorithmus abgeglichen. Es ist dabei nicht notwendig die genauen Identitäten dieser als Biomarker fungierenden Peaks zu kennen, die Massen müssen nur reproduzierbar und selbst bei sehr eng verwandten Spezies unterschiedlich genug sein, um eine zuverlässige Identifikation zu ermöglichen.

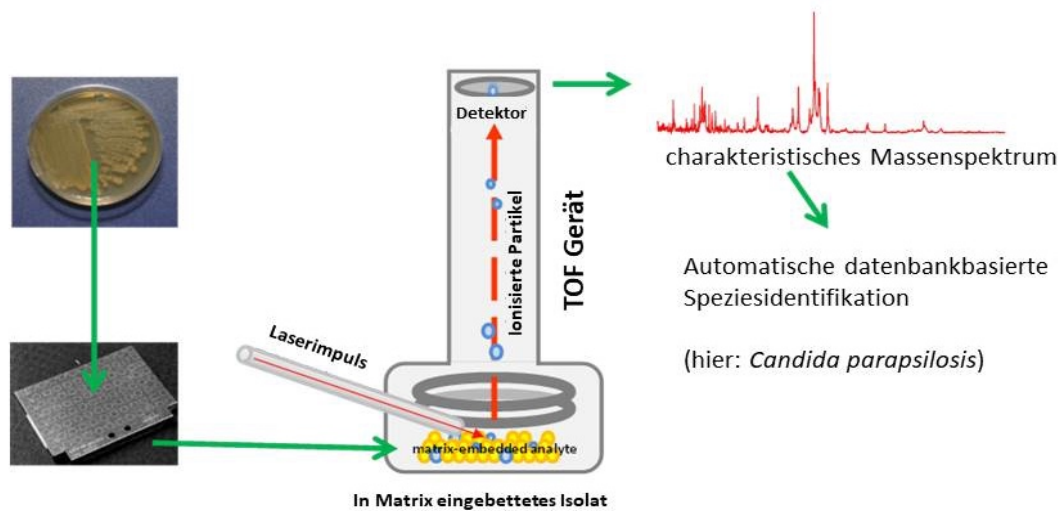


Abbildung 3: Funktionsweise MALDI ToF MS (Quelle: O. Bader)

Das Programm des jeweiligen Geräteherstellers errechnet aus dem Abgleich der Spektren aus der klinischen Probe und den Referenzspektren in der Datenbank einen Wert, der die Güte der Identifikation beschreibt (Neumeister et al. 2009). Mittlerweile gibt es eine Reihe von Firmen, welche Massenspektrometer herstellen und die dazugehörige Software anbieten. In der folgenden Arbeit wird der Biotyper der Firma Bruker verwendet, welcher in der Routinediagnostik der medizinischen Mikrobiologie der Universitätsmedizin Göttingen genutzt wird. Der MALDI Biotyper unterteilt seine Identifikationsgüte, die sogenannten „Log-Scores“, in drei verschiedene Rubriken: $\geq 2,0$ bedeutet eine Identifikation auf Speziesebene, 1,999-1,600 Identifikation auf Gattungsniveau und bei Werten $< 1,6$ ist keine sichere Identifikation möglich. In der klinischen Routine des Labors der medizinischen Mikrobiologie werden Proben, die Log-Scores ≥ 2.0 erreichen, automatisch validiert und in das Laborinformationssystem übertragen. Dieser Prozess stellt eine enorme Arbeitserleichterung gegenüber der Speziesidentifikation mittels PCR Nachweis oder biochemischen Tests dar.

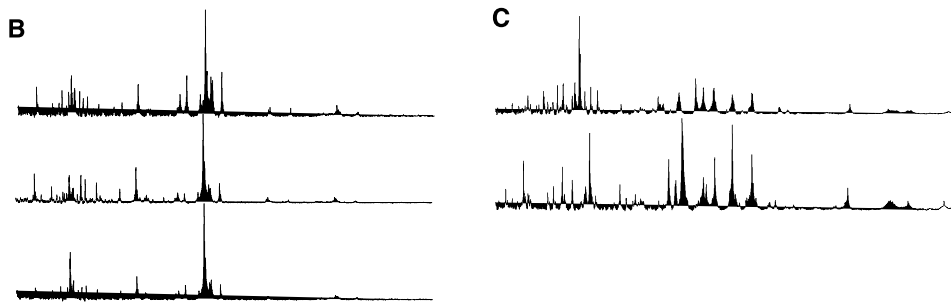


Abbildung 4: Unterschiede in den Massenspektren (B) Massenspektren dreier *Candida parapsilosis* Isolate aus der Routinediagnostik (C) Vergleich der Massenspektren eines *Candida glabrata* (oben) Isolates und eines *Candida bracarensis* Isolates (unten) aus der Routinediagnostik (Quelle: O. Bader)

Klinisch relevante bakterielle Erreger sind mittlerweile gut bis sehr gut in den kommerziell erhältlichen Systemen abgebildet. Auch Hefen sind mittels Massenspektrometrie gut differenzierbar, selbst eng miteinander verwandte Spezies können sicher auseinandergelassen werden (bspw. *Candida ortho-/meta-/parapsilosis*, oder wie in der Abbildung 4 C *Candida glabrata* und *Candida bracarensis*), was mit biochemischen Methoden nicht immer möglich ist (Bader et al. 2011). Im Bereich der filamentösen Pilze ist gegenüber den Bakterien die MALDI BioTyper Datenbank noch nicht ausreichend und bietet teilweise nicht die erforderlichen Referenzspektren um eine Subtypisierung vorzunehmen (MBT Filamentous Fungi Library). So kann die MALDI BioTyper Datenbank beispielsweise bisher nur zwischen *Cryptococcus neoformans* var *grubii*, *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* und *Cryptococcus gattii* unterscheiden (MBT Filamentous Fungi Library), nicht aber die klinisch relevanten Subspezies.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass es mit relativ geringem Aufwand möglich ist weitere Referenzspektren herzustellen und damit die Datenbank nach individuellen Bedürfnissen zu vervollständigen. Dies bezieht sich sowohl auf Präparationstechniken als auch auf die Identifikation seltener oder kryptischer Spezies. Gerade bei seltenen Pilzen kann die klinische Routinediagnostik hierdurch beschleunigt und vereinfacht werden, da aufwendige biochemische Tests vermieden werden können.

2. Material und Methoden

2.1. Pilzstämme und Kulturbedingungen:

Die in dieser Arbeit verwendeten Referenz-Pilzstämme entstammen der in einer Kryobank (Mast Diagnostica, Reinfeld, Deutschland) angelegten Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universitätsmedizin Göttingen, wo eine Langzeitlagerung bei -70° C erfolgt. Sie befinden sich bis auf die Stämme CBS 8710 (*Cryptococcus neoformans* VNI), CBS 10084 (*Cryptococcus neoformans* VNII), CBS 6289 (*Cryptococcus gattii*, VGI), CBS 10082, 10514 (*Cryptococcus deuterogattii*, VGII), CBS 10081 (*Cryptococcus bacillisporus*, VGIII) ebenfalls in der Institutssammlung „PEU“ unter den Nummern: PEU 1798 (*Candida albicans*), PEU 1726 (*Candida dubliniensis*), PEU 1797 (*Candida tropicalis*), PEU 1796 (*Candida glabrata*), PEU 1799 (*Candida parapsilosis*), PEU 1617 (*Candida krusei*), PEU 2284 (*Pseudallescheria angusta*), PEU 2285, PEU 2286 (*Scedosporium boydii*), PEU 2287 (*Pseudallescheria ellipsoidea*), PEU 2368 (*Scedosporium apiospermum*), PEU 2288, 2289, 2290, 2367 (*Scedosporium aurantiacum*), PEU 2303 (*Lomentospora prolificans*), PEU 2193 (*Cryptococcus neoformans*, VNI), PEU 2187, 2190 (*Cryptococcus deneoformans*, VNIV), PEU 2189 (*Cryptococcus gattii*, VGI), PEU 2188 (*Cryptococcus bacillisporus*, VGIII), PEU 1766 (*Cryptococcus tetragattii*, VGIV) und PEU 2468 (*Cryptococcus decagattii*, VGIV).

Für die hier beschriebene Arbeit wurden nach dem Auftauen die Pilzisolat auf Sabouraud Agar kultiviert, der im Trägergel aus 0,5% Pepton (Kasein), 0,5% Pepton (Fleisch) und 2% Glucose besteht. Für die *Candida* Isolate aus der klinischen Diagnostik der Mikrobiologie wurden zum Ausplattieren die Nährmedien Sabouraud, Columbia blood oder chocolate Agar (Produkte der Firma Oxoid, Wesl, Deutschland) verwendet.

Die Isolate, die für die Forschungsarbeit „Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts“ ausgewählten Isolate, gehören zu den Spezies *Candida albicans* (n = 122), *Candida dubliniensis* (n = 10), *Candida tropicalis* (n = 25), *Candida lusitanae* (n = 14), *Candida parapsilosis* (n = 20), *Candida metapsilosis* (n = 2), *Candida orthopsilosis* (n = 7), *Candida glabrata* (n = 27), *Candida nivariensis* (n = 1), *Candida palmioleophilia* (n = 7), *Candida guilliermondii* (n=16) und *Candida krusei* (n=14). Die *Candida* Isolate, die zur Inklusion in

die endgültige Datenbank ausgewählt wurden, wurden in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) unter folgenden Nummern hinterlegt: DSM 28718 (*Candida glabrata*), DSM 28719 (*Candida albicans*), DSM 28720 (*Candida tropicalis*), DSM 28721 (*Candida krusei*), DSM 28722 (*Candida parapsilosis*) und DSM 28623 (*Candida dubliniensis*) (Siehe Kapitel 2.A.).

Die Isolate, die für die Arbeit „Towards proteomic species barcoding of fungi- an example using *Scedosporium/Pseudallescheria* genus isolates“ ausgewählt wurden stammen aus dem der Sammlung des Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht, Niederlande (CBS) gehören zu den Spezies *Pseudallescheria angusta* (n = 1) (CBS 245.72), *Scedosporium boydii* (n = 2) (CBS 117432, CBS 120157), *Pseudallescheria ellipsoidea* (n = 1) (CBS 301.79), *Scedosporium apiospermum* (n = 1) (CBS 117410), *Scedosporium aurantiacum* (n = 4) (CBS 116910, CBS 136046, CBS 136047, CBS 136049) und *Lomentospora prolificans* (n = 1) (IMMI-1647) (Steinmann et al. 2011).

Die Isolate, die in der Arbeit „CryptoType – public datasets for MALDI-TOF-MS based differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* complexes“ wurden folgende Isolate verwendet: *Cryptococcus neoformans* (n = 96), *Cryptococcus deneoformans* (n = 6), *Cryptococcus gattii* (n = 6), *Cryptococcus bacillisporus* (n = 19), *Cryptococcus deuterogattii* (n = 20), *Cryptococcus decagattii* (n = 1) und *Cryptococcus tetragattii* (n = 5). Die Proben stammen aus einer vorrangegangenen Forschungsarbeit einer thailändischen Kollegin (Worasilchai et al. 2016) und einer kenianischen Kollegin (Kangogo et al. 2015) welche sich in der Institutssammlung befinden, sowie einigen Proben aus dem Referenzlabor Labor in Birmingham, UK (mit freundlicher Überlassung von Prof. Robin May).

Die Nomenklatur erfolgte nach Hagen et al. (Hagen et al. 2015). Für die Referenzstämme wurden folgende Stämme der CBS Datenbank (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) verwendet: *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (CBS 6900, 10079), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (CBS 8710, 10084, 10085), *Cryptococcus gattii* (CBS 6289, 6955, 10078, 10081, 10082, 10101, 10514, 16687).

2.2. Probenbearbeitung und Herstellung der Spektren

Die Proben wurden mit drei verschiedenen Methoden aufgearbeitet. Allen gemein ist eine Inkubation über Nacht auf einer Sabouraud Agarplatte oder in einem Sabouraud Flüssigmedium, zur Erzeugung ausreichender Materialmengen.

Methode 1) Die erste Methode ist eine sog. Schmier-Präparation. Dazu wird eine kleine Menge frisches Probenmaterial aus einer Kolonie mit einem Zahnstocher vorsichtig auf einen Spot eines Probenträgers gestrichen und mit 1 µl Matrixlösung (gesättigte wässrige Lösung aus α -cyano-4-Zimtsäure in 50% Acetonitril, 0,125% Trifluoressigsäure) bedeckt, und kristallisieren gelassen.

Metode 2) Für die zweite Präparation („Schmier-Lyse-Präparation“ oder „OTL-Präparation“), die OTL (On-target-lysis), wird zunächst wie bei der Schmier-Präparation Probenmaterial auf den Probenträger aufgetragen, die Probe dann zur Lyse jedoch mit 1 µl 70%er Ameisensäure bedeckt. Das Ganze wird dann nach dem Trocknen wiederum mit 1 µl Matrix bedeckt, und kristallisieren gelassen.

Methode 3) Für die dritte Präparation („Extraktionspräparation“) wird für die *Candida*- und *Cryptococccen*-Isolate das Extraktionsprotokoll der Herstellungsfirma Bruker, Deutschland verwendet. Dafür wird eine kleine Menge einer Kolonie einer frischen Probe mit 300 µl destillierten Wasser gemischt und die Zellen durch Zugabe von 900 µl absoluten Ethanol gewaschen. Die Präparation der *Scedosporien*-Isolate erfolgte ähnlich, entsprechend des empfohlenen Protokolls der "Fungi Library" des Herstellers des MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen Deutschland): Aus der Flüssigkultur wird 1 ml mit möglichst viel Mycel herausgenommen und bei maximaler Drehzahl (18xg) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit Ethanol (70%) aufgenommen.

Die weiteren Schritte sind für alle Isolate der Methode 3 identisch:

Die mit Ethanol versetzte Probe wird 2 min. bei maximaler Drehzahl (18xg) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wird einige Minuten auf Heizblöcken getrocknet und anschließend in 50 µl 70%er Ameisensäure und 50 µl Acetonitril lysiert. Die Probe wird wiederum 2 min. bei maximaler Drehzahl zentrifugiert, sodass sich erneut ein Pellet bildet. Zuletzt wird 1 µl des Überstands auf ein Stahltarget aufgetragen und nach dem Trocknen mit 1 µl Matrix bedeckt.

Jede Probe mit der OTL Präparation (2) wird dreimal aufgetragen. Die Spektren der Proben, die mit der OTL Präparation oder der Extraktion (3) hergestellt wurden, werden mit der automatischen Erfassungsfunktion der MALDI Biotyper 3.1 Software eines Autoflex III Massenspektrometer generiert (beides von Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Die Spektren der Schmierpräparation (1) wurden per Hand hergestellt, indem 600 Spektren aus Regionen der Spots aufsummiert wurden, wo wenigstens ein Minimum an Peaks vorhanden

war. Die Schmierpräparation dient einzig dazu, die qualitativen Unterschiede der drei Präparationsmethoden zu verdeutlichen (Abbildung 5).

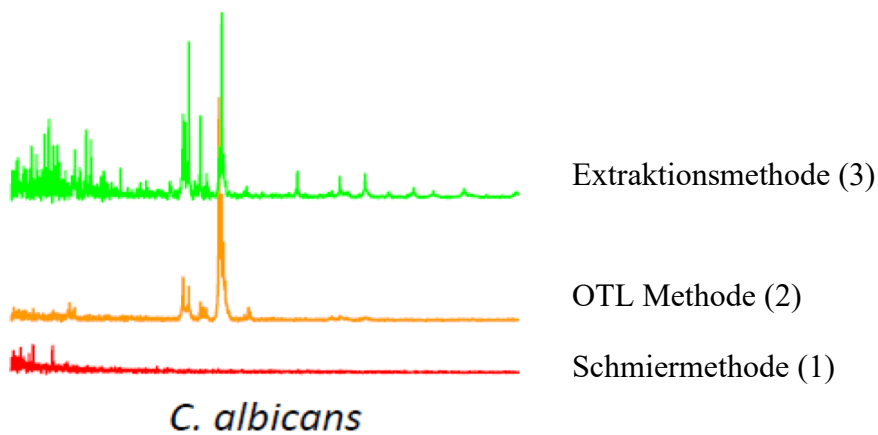


Abbildung 5: Vergleich von Massenspektren hergestellt mit den drei unterschiedlichen Präparationsmethoden. Herstellung der Schmierspektren per Hand, OTL und Extraktionspektren automatisiert mit Biotyper 3.1 Software (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) (Quelle: (Bernhard et al. 2014))

2.3. Herstellung der MALDI Biotyper Datenbank Spektren

Vor dem Erstellen der Referenzspektren wurde das genutzte Instrument jedes Mal mit dem Herstellereigenem Kalibrationsmedium Bruker Test Standard (BTS) kalibriert. Zur internen Eichung wurde der Matrix Humaninsulin zugesetzt, welches eine bekannte Masse von 5600 kDA hat. Nach der automatischen Akquirierungsmethode der Referenzspektren wurden die einzelnen Spektren nochmals mittels der bekannten Masse vom Humaninsulin geeicht. Hierzu wurde das Programm FlexAnalysis, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland benutzt. Die automatisch von Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) erstellten MSP (Main Spectrum Projektion) beinhalten nur die Massen, die in $\geq 20\%$ der zugrunde liegenden Spektren zu finden waren. Die Insulinpeaks wurden nachträglich aus der Liste der Peaks gelöscht. Für alle Arbeitsschritte am Massenspektrum wurden die Standardeinstellungen des MALDI-Biotyper verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts

In der Publikation „YOTL – a procedure for making auxiliary mass spectrum datasets for clinical routine identification of yeasts using the on-target-lysis method“ (Bernhard et al. 2014) zeigten wir, dass durch das Erstellen eigener Referenzspektren nach der „Yeast-on-target-lysis“ Methode eine gegenüber der herkömmlichen Extraktionsmethode schnellere und gleichzeitig zuverlässige Diagnostik von *Candida* Spezies in der klinischen Routine möglich ist.

In der klinischen Routinediagnostik hat sich die MALDI-TOF-MS-basierte Speziesidentifikation zu einem schnellen und zuverlässigen Werkzeug entwickelt (siehe Abschnitt 1.1.). (Marklein et al. 2009; Bader et al. 2011; Bader 2013).

Für den MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) wird bisher vom Hersteller ein aufwändiges mehrstufiges Extraktionsprotokoll (Siehe Abschnitt 1.3.2.) zur Aufarbeitung von Pilzproben empfohlen, mit dem auch die Referenzspektren in der Datenbank des Herstellers hergestellt wurden. Um dieses aufwändige Protokoll abzukürzen, wurde in der Literatur eine Vielzahl von verschiedenen Extraktionsprotokollen beschrieben. Eines davon wird als „short extraktion“ oder „formic acid overlay“ bezeichnet und bietet eine signifikante Zeitersparnis bei der Aufbereitung der Proben (Hendrickx et al. 2011; Theel et al. 2011; Goyer et al. 2012; Van Herendaël et al. 2012; Cassagne et al. 2013). Hierbei wird die auf den Träger aufgebrachte Probe mit 70% Ameisensäure bedeckt, trocknen gelassen und anschließend mit Matrix überdeckt. In unserer Arbeit sprechen wir von „On-target-lysis“ (OTL), für „Lyse auf dem Träger“. Das Problem, welches überwunden werden musste ist, dass das OTL Verfahren im Vergleich zur empfohlenen Extraktion teilweise andere Signale erzeugt und ein Signal-Rausch Verhältnis hat, welches mit der herkömmlichen Datenbank nicht immer eine eindeutige Identifikation zulässt. Die OTL-Spektren werden von der MALDI Biotyper

Software in der mittels Extraktion hergestellten Datenbank zwar erkannt, bekommen jedoch schlechtere log-scores. Das bedeutet, dass deutlich weniger Proben einen log-score von >2.000 bekommen und somit nicht der automatischen Befundung zugeführt werden können. Im Rahmen der Erstellung und Evaluation der „OTL“ – Spektren stellten wir fest, dass die höchsten log-scores erzielt werden können, wenn das Verfahren zur Probenaufarbeitung mit dem der Erstellung der Datenbank übereinstimmt. In unserer Arbeit haben wir daher ein minimales Set an mit der OTL Methode erzeugten Hefespektren in die Biotyper Datenbank eingepflegt und das Verbesserungspotential im klinischen Alltag der Diagnostik untersucht.

Die für die Forschungsarbeit ausgewählten Isolate gehören zu den Spezies *Candida albicans* (n = 122), *Candida glabrata* (n = 27), *Candida tropicalis* (n = 25), *Candida parapsilosis* (n = 20), *Candida krusei* (n = 14), *Candida dubliniensis* (n = 10), *Candida lusitaniae* (n = 14), *Candida metapsilosis* (n = 2), *Candida orthopsilosis* (n = 7), *Candida nivariensis* (n = 1), *Candida palmioleophilia* (n = 7) und *Candida guilliermondii* (n = 16). Die ersten 6 Spezies wurden in der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) hinterlegt.

Die Probenaufarbeitung erfolgte erstens nach der einfachen Schmierpräparation (1), zweitens mittels der OTL Methode (2) und drittens nach dem Extraktionsprotokoll (3) der Herstellungsfirma Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland.

Die Spektren der Proben, die mit der OTL Präparation oder der Extraktion hergestellt wurden, wurden mit der automatischen Erfassungsfunktion der MALDI Biotyper 3.1 Software eines Autoflex III Massenspektrometer generiert (beides von Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Die Spektren der Schmierpräparation wurden per Hand erfasst, und dienen hier einzig dazu die qualitativen Unterschiede der drei Präparationsmethoden zu verdeutlichen (Abbildung 5).

Die Erregerstämme zur Herstellung von Einträgen in die MALDI Bruker Datenbank Massenspektren [MSP] stammen aus den eingehenden Proben der Routinediagnostik des Instituts für Mikrobiologie Göttingen, die Isolate seltener vorkommender Stämme aus der Sammlung des nationalen Referenzzentrums für systemische Mykosen Göttingen. Die Spezies aller Isolate, die für die Herstellung der OTL- MSP ausgewählt wurden, wurden durch ITS-Sequenzierung (internal transcribed spacer) und MALDI Biotyper (zurzeit die V3

Datenbank mit 4613 Spektren) mittels Extraktionsmethode bestätigt. Für alle Arbeitsschritte am Massenspektrum wurden die Standardeinstellungen des MALDI-Biotyper verwendet.

Im Laufe eines Monats wurden alle Hefen, die in unser klinisches Diagnostiklabor kamen, gesammelt. Hieraus ergaben sich die folgenden sechs häufigsten *Candida* Spezies: *Candida albicans* (122), *Candida glabrata* (27), *Candida tropicalis* (25), *Candida parapsilosis* (20), *Candida krusei* (14) und *Candida dubliniensis* (10).

Es zeigte sich, dass die Proben, aufbereitet nach der OTL Methode, weniger Peaks hatten als die mit der Extraktionsmethode aufbereiteten Proben. Bei der Identifizierung mit der Bruker Biotyper Datenbank lagen die log-scores in der Mehrzahl der Spektren im Bereich des Genuslevel (1,999-1,6). Eine automatische Befundung auf Speziesebene war hiermit nicht möglich. Im Anschluss wurden aus den Referenzstämmen jeder Spezies eigene MSP hergestellt, aufbereitet nach der OTL Methode, und retrospektiv an allen OTL Spektren getestet. Für jede Spezies wurde das MSP ausgewählt, welches die höchste Rate an korrekten Identifikationen der jeweiligen OTL Spektren auf Spezieslevel hatte und hieraus eine eigene Datenbank bestehend aus 6 MSP erstellt; die „Yeast-On-Target-Lysis Datenbank“ (YOTL-Datenbank).

Es zeigte sich, dass insbesondere die Kombination aus YOTL und Biotyper Datenbank zu einem effizienten und korrekten Erkennen der OTL-Spektren führte. (Abbildung 6).

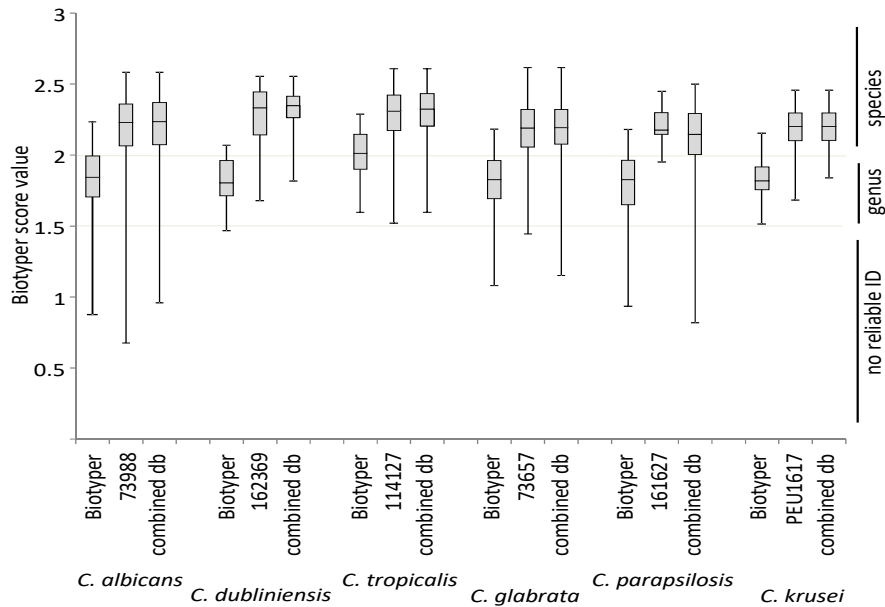


Abbildung 6: Ergebnisse internen Validierung. Jeweils die Ergebnisse der Biotyper Datenbank, der YOTL Datenbank und der Kombination der Datenbanken. (Quelle: (Bernhard et al. 2014))

Zum Ausschluss von Falsch-Zuordnungen, insbesondere vom Spektrum sehr ähnlicher Spezies und Bakterien wurde eine Kontrollgruppe bestehend aus sechs selten vorkommenden Spezies und verschiedener Bakterien erstellt und gegen die YOTL-Datenbank getestet. Hierbei gab es keine Falsch-Zuordnung auf Spezies-Level.

Zur Validierung der YOTL-Datenbank wurden über einen Zeitraum von 2 Monaten alle Hefen aus dem klinischen Routinelabor sowohl mit der OTL- als auch mit der Extraktionsmethode aufgearbeitet. 88% der Isolate konnten auf Anhieb mit der kombinierten Datenbank identifiziert werden, nach einem Wiederholen oder einer verlängerten Inkubationszeit nicht identifizierter Proben konnten 96% aller Proben auf Spezieslevel identifiziert werden. Es gab keine Falsch-Zuordnungen.

Durch das Einpflegen der YOTL-Datenbank in den klinischen Laboralltag verbessert sich der klinische Ablauf signifikant, trotz des kleinen Umfangs der Datenbank. Wir konnten zeigen, dass es ausreicht nur ein qualitativ hochwertiges MSP pro Spezies zu generieren, um in der Routinediagnostik Pilze schnell und zuverlässig auf Speziesebene zu identifizieren. Die Resultate sind in der Zuverlässigkeit gleich gut wie bei der Verwendung größerer mit

der Extraktionsmethode erstellten Datenbanken mit mehreren MSP pro Spezies (De Carolis et al. 2014).

Die Herstellung der MSP ist technisch wenig aufwendig. Sie kann von den meisten Laboren mit Erfahrung am Massenspektrometer unter Qualitätskontrollen bewerkstelligt werden. Die Datenbank ist einfach um weitere MSP erweiterbar. Das Set an YOTL-Spektren ist von uns über die Website <https://github.com/oliverbader/BioTyper-libraries> frei verfügbar gemacht worden. Eine Importanleitung befindet sich in Anhang A.

3.2. Towards proteomic species barcoding of fungi- an example using *Scedosporium /Pseudallescheria* genus isolates

In der Arbeit „Towards proteomic species barcoding of fungi- an example using *Scedosporium /Pseudallescheria* genus isolates“ (Bernhard et al. 2016) haben wir gezeigt, dass es durch das Erstellen von Referenzspektren möglich ist, Isolate aus dem *Scedosporien/Pseudallescheria* Komplex mittels Massenspektrometrie auch in der klinischen Routine zu identifizieren und prüfen beispielhaft inwieweit das Prinzip der Barcodes auf die Massenspektrometrie übertragen werden kann.

Bisher sind 6 verschiedene Spezies der Schimmelpilzgattungen des *Scedosporien/Pseudallescheria* Komplex bekannt, die potentiell humanpathogen sind: *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium dehoogii*, *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii* und *Pseudallescheria minutispora* (Zeng et al. 2007). In den letzten Jahren sind Infektionen durch diese Spezies zunehmend, da diese nicht mehr nur im Fällen von Beinahe-Ertrinken als Erreger von Aspirationspneumonien identifiziert wurden, sondern auch bei Patienten mit Mukoviszidose isoliert wurden (Sedlacek et al. 2015). Eine schnelle und genaue Erregerdiagnostik ist wichtig, da sich die verschiedenen Spezies in ihrer Sensibilität gegenüber Medikamenten unterscheiden (Alastruey-Izquierdo et al. 2010). Bereits in anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Identifikation von *Pseudallescheria/Scedosporium* auf Speziesebene mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie prinzipiell möglich ist (Coulibaly et al. 2011; Sitterlé et al. 2014). Die Identifikation von Schimmelpilzen mittels Massenspektrometrie ist jedoch zurzeit noch kein Standardverfahren, unter anderem da es keine allgemein akzeptierte Datenbank gibt.

In unserer Arbeit haben wir eine Datenbank aus sechs Referenzspektren (MSP) nach der Extraktionsmethode erstellt. Als Referenz-Isolate verwendeten wir *Pseudallescheria angusta* (CBS 245.72), *Scedosporium boydii* (CBS 117432, CBS 120157), *Pseudallescheria ellipsoidea* (CBS 301.79), *Scedosporium apiospermum* (CBS 117410), *Scedosporium aurantiacum* (CBS 116910, CBS 136046, CBS 136047, CBS 136049), and *Lomentospora prolificans* (IMMI-1647)(Steinmann et al. 2011). Die Probenvorbereitung erfolgte nach dem empfohlenen Protokoll der „Fungi Library“ des MALDI Biotypers (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Zur Herstellung der Spektren wurden die Standardeinstellungen der MALDI Biotyper-Software mit der Bruker Daltonics Autoflex III- Serie verwendet. Es

erfolgte eine interne Validierung der Referenzspektren, in dem alle Spezies korrekt auf Spezieslevel identifiziert wurden, ohne dass es zu falsch positiven Identifikationen kam.

Ein Clustering der MSP zeigt, dass sich, analog zur vorgeschlagenen neuen Nomenklatur (Lackner et al. 2014), das MSP von *Lomentospora prolificans* (Verwendung der neuen Nomenklatur) am deutlichsten von den MSP der anderen sechs *Scedosporium*/*Pseudallescheria* Erreger MSP unterscheidet (Abbildung 7)

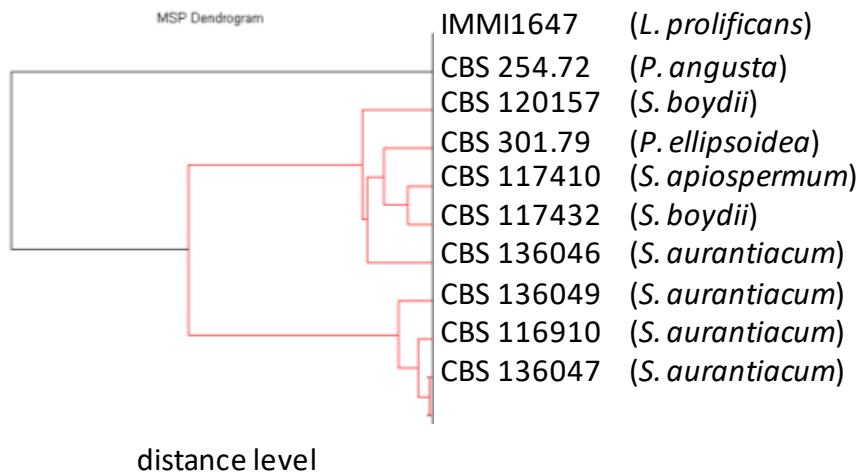


Abbildung 7: Dendrogramm der erstellten Referenzstämme

Der Datensatz der *Scedosporium* / *Pseudallescheria* Identifikation ("SPID") ist über die Website <https://github.com/oliverbader/BioTyper-libraries> frei verfügbar.

Im zweiten Teil der Arbeit untersuchten wir, inwieweit sich die Theorie der genetischen Barcodes auch auf die Massenspektrometrie anwenden lässt. Durch interne Kalibrierung lassen sich Massendifferenzen innerhalb des *Scedosporium apiospermum* Komplex und den Isolaten des *Scedosporium aurantiacum* messen (Abbildung 8). Unter der Hypothese, dass die Massengruppen hoch konservierte orthologe Proteine (Eiweiße mit gleicher Funktion, die bei den verschiedensten Arten eine gleiche Aminosäurenabfolge haben, so dass auf eine Urverwandtschaft geschlossen werden kann) in verschiedenen Isolaten widerspiegeln, können wir annehmen, dass die Gründe für die Abweichungen der Massen spezifische Aminosäureaustausche sind. Leider konnte diese Theorie wegen fehlender Genomsequenzen nicht nachvollzogen werden. Wenn in Zukunft jedoch immer mehr Referenzgenome verfügbar sein werden, sollte es möglich sein, die beobachteten Massen mit Genen in Verbindung zu bringen. Unter Umständen könnte dies sogar zu einer

Speziesidentifizierung von Isolaten mittels MALDI-TOF führen, für die keine Einträge in der Datenbank vorhanden sind, da die jeweiligen Spektren mit „Barcodes“ aus Sequenzdaten abgeglichen werden könnten.

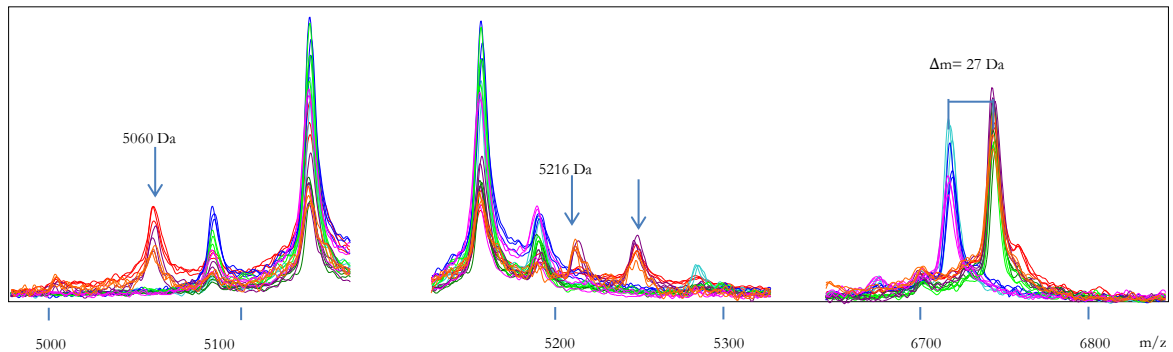


Abbildung 8: Massenunterschiede innerhalb des *Scedosporium apiospermum* Komplex (*Scedosporium apiospermum* CBS 117410, rot; *Scedosporium boydii* CBS 117432, hellblau; *Scedosporium boydii* CBS 120157, dunkelblau; *Pseudallescheria angusta* CBS 245.72, dunkelgrün; *Pseudallescheria ellipsoidea* CBS 301.79, hellgrün; IMMI-BF90, violett; IMMI-E71, rosa; IMMI-E77, orange). (Bernhard et al. 2016)

3.3. CryptoType – datasets for MALDI-TOF based differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* complex isolates

In der Arbeit „CryptoType – datasets for MALDI-TOF based differentiation of *Cryptococcus neoformans* complex isolates“ haben wir ein Datenset aus 13 Referenzspektren für den Biotyper MALDI-TOF MS erstellt, welches aus sieben anerkannten nicht-hybriden Subtypen in den *Cryptococcus neoformans/gattii*-Komplexen besteht.

Infektionen mit einem Erreger der *Cryptococcus neoformans/gattii* Gruppe betreffen hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich, immunsupprimierte Patienten und reichen von einfachen Hautinfektionen über pulmonale Infekte bis hin zu schweren Meningitiden (Kronstad et al. 2011). Das prominenteste diagnostische Merkmal ist die Kapsel der meisten *Cryptococcus* Isolate, welches mikroskopisch mittels Tuschefärbung nachgewiesen werden kann (O’Meara und Alspaugh 2012) Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass die Tuscheartikel die Kapsel nicht färben und um das *Cryptococcus* Isolat ein Halo sichtbar wird (siehe Abbildung 1). Die von der Zelle produzierten Polysaccharide können auch serologisch nachgewiesen werden, durch den Nachweis von Galactomanan. Traditionell wird die Gruppe der *Cryptococcus* Spezies in vier Serotypen A-D unterteilt, basierend auf der Antigenität der Kapsel. Diese Unterteilung führt zu drei Gruppen *Cryptococcus neoformans var. grubii* (Serotyp A), *Cryptococcus neoformans var. gattii* (Serotyp B und C) sowie *Cryptococcus neoformans var. neoformans* (Serotyp D). Die verschiedenen Gruppen sind in der Lage Hybride zwischen den Spezies zu bilden, z.B. ein Serotyp AD (Boekhout et al. 2001). Die Serotypen können mittels genetischer Methoden in sieben verschiedene molekulare Typen unterteilt werden (Meyer et al. 2003). Seit einigen Jahren wird auch diskutiert diese sieben nicht-hybriden molekularen Typen als eigene Spezies anzusehen (Hagen et al. 2015; Kwon-Chung et al. 2017). Kürzlich wurde in Umwelt und Tierproben eine weitere, achte, Spezies beschrieben, welche in dieser Arbeit jedoch noch nicht mehr berücksichtigt werden konnte (Farrer et al. 2019).

In Europa wird der Serotyp A am häufigsten nachgewiesen, hauptsächlich in immungeschwächten Patienten, z.B. HIV-Infizierte im AIDS Stadium (Kronstad et al. 2011). Die jedoch virulenteren Isolate, die auch immunkompetente Wirte infiziert stammen aus dem *Cryptococcus neoformans var. gattii*- Komplex (Serotyp B und C) (Galanis 2010).

Neben der unterschiedlichen Virulenz der Spezies werden auch Unterschiede in der Medikamentenwirksamkeit und –Empfindlichkeit innerhalb dieser Gruppe werden diskutiert (Thompson et al. 2009; Trilles et al. 2012).

Es ist deswegen nicht nur im klinischen Kontext, sondern auch für epidemiologische Studien wichtig die verschiedenen Spezies/molekularen Typen zu differenzieren. Bisher erfolgte dies mittels aufwändiger genetischer Typisierung (Tangwattanachuleeporn et al. 2013; Kangogo et al. 2015; Worasilchai et al. 2016; Fang et al. 2020; Jin et al. 2020).

Bereits in früheren Arbeiten hat sich die Identifizierung der sieben (die 2019 erstmals beschriebene Spezies ist hier ausgenommen) verschiedenen Spezies/molekularen Typen mittels MALDI-TOF als ein geeignetes Instrument erwiesen (McTaggart et al. 2011; Firacative et al. 2012; Posteraro et al. 2012; Hagen et al. 2015), jedoch fehlen in den kommerziellen Datenbanken Referenzspektren der einzelnen Spezies, bisher kann nur zwischen *Cryptococcus neoformans* var *grubii/neoformans* und var. *gattii* unterschieden werden. Dies liegt teils an falscher Speziesbezeichnung oberhalb der Signifikanzschwelle (Posteraro et al. 2012) und an der Komplexität, die durch die Hybridbildung entsteht.

In unserer Arbeit haben wir eine Datenbank aus 13 MSPs (Main Spektrum Projektion) der sieben, zur Zeit der Entstehung der Arbeit bekannten, nicht-hybriden molekularen Typen erstellt und die Güte dieser anhand klinischer Isolate geprüft. Hierbei haben wir verschiedene Vorverarbeitungsprotokolle getestet, die ein Entfernen der Kapsel beinhalteten. Aufgrund der Einfachheit halten wir uns in unserer Arbeit an die Nomenklatur nach Hagen (Hagen et al. 2015).

Zum Erstellen der Referenzstämme haben wir von 13 Isolaten der CBS Sammlung (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) anhand des Standardprotokolls (Extraktionsprotokoll der Herstellungsfirma Bruker, Deutschland) und einer internen Insulinkalibration Referenzspektren erstellt: *Cryptococcus neof.* var. *neoformans* (CBS 6900, 10079), *Cryptococcus neof.* var. *grubii* (CBS 8710, 10084, 10085), *Cryptococcus gattii* (CBS 6289, 6955, 100078, 10081, 10082, 10101, 10514, 16687). Wir haben die erstellte Datenbank an einem Testset von 153 klinischen Isolaten (*Cryptococcus neoformans* (n = 96), *Cryptococcus deneoformans* (n = 6), *Cryptococcus gattii* (n = 5), *Cryptococcus bacillisporus* (n = 18), *Cryptococcus deuterogattii* (n = 20) und *Cryptococcus tetragattii* (n = 8)) und einer Negativ-Kontrollgruppe von 86 zufällig ausgewählten Bakterienproben getestet.

Wir konnten zeigen, dass die erstellte Datenbank in der Lage ist 143 von 153 (93,4%) Isolate der Testgruppe zuverlässig auf Speziesebene mit einem log-score ≥ 2.0 zu identifizieren. Bei weiteren 8 Isolaten war der höchste Treffer zwar korrekt, jedoch mit einem log score von < 2.0 nicht mehr auf Speziesebene identifiziert. Innerhalb der Negativ-Kontrollgruppe gab es keine falsch-positiven Identifikationen bei einem cut-off log-score von > 1.3 . (Abbildung 9)

Die einzigen unstimmgigen Identifikationen gab es bei zwei *Cryptococcus tetragattii* Isolaten, welche bei mehrfacher Probenauftragung unterschiedliche Identifikationen ergaben.

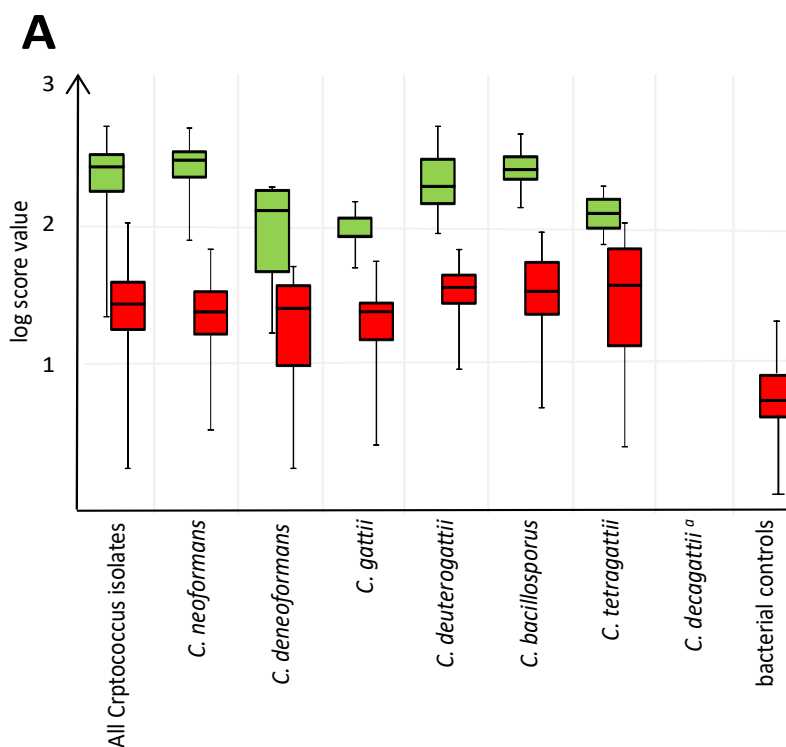


Abbildung 9: Ergebnisse der Validierung der erstellten Referenzstämme. Grün: log-scores der korrekten Identifikationen; Rot: log score der höchsten nicht korrekten Identifikationen. (Bernhard et al. 2021)

In der Clusteranalyse sieht man, dass innerhalb der *Cryptococcus neoformans*- Gruppe eine ausreichende Distanz zwischen den verschiedenen Spezies besteht, sogar unter den Subspezies VNI und II. Innerhalb der *Cryptococcus gattii*- Gruppe gibt es jedoch eine Distanznähe, die ein Auseinanderhalten der einzelnen Spezies dieser Gruppe problematisch macht (Abbildung 10).

Aus diesen Gründen haben wir uns bei der Validierung ebenfalls die jeweiligen ersten falschen Matches angesehen. Bei drei Isolaten aus dem *Cryptococcus gattii*- Komplex fanden wir einen zweiten log-score ≥ 2.0 , mit einer Differenz von 0.1-0.4 zu den richtigen, am höchsten bewerteten Treffern. Hierbei handelt es sich um Isolate der Spezies *Cryptococcus bacillisporus*, die ebenfalls mit einem log-score >2.0 als *C. decagattii* erkannt worden wären (zweites Ergebnis falsch positiv; dieses zweite Ergebnis kommt wegen der Ähnlichkeit des MSP vor).

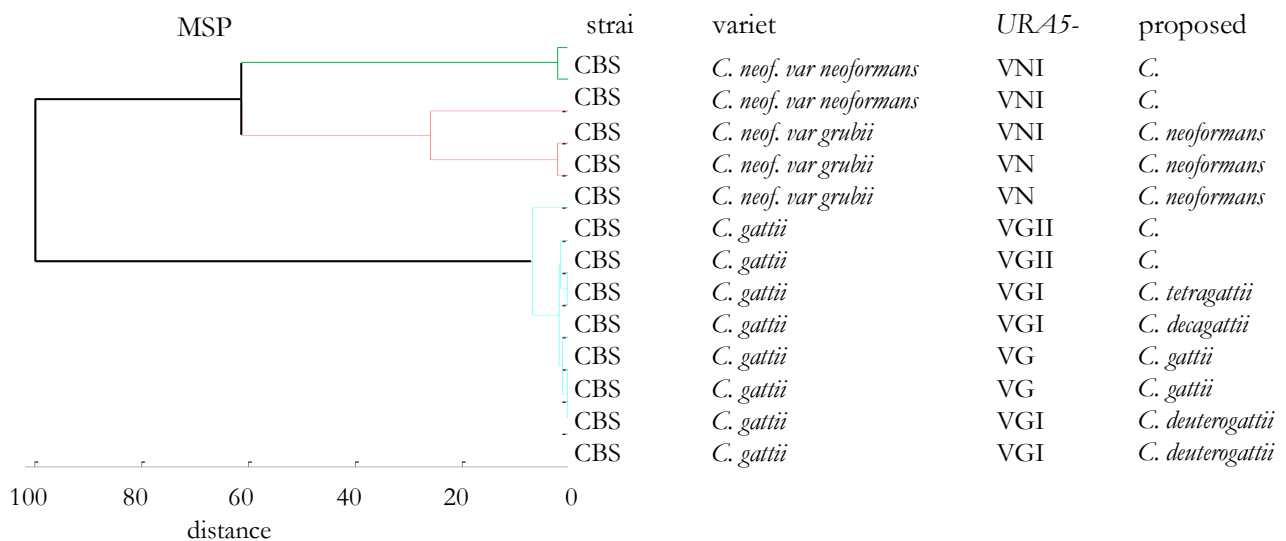


Abbildung 10: Clusteranalyse des *Cryptococcus neoformans/gattii* Komplex

Leider war es uns nicht möglich ein zweites *Cryptococcus decagattii* Isolat in unsere Studie einzubinden, weswegen wir aus diesem zwar ein Referenzspektrum erstellt haben, dieses jedoch nicht validieren konnten. Aus diesem Grund enthält die endgültige Datenbank nur sechs der sieben Spezies.

Die Literatur berichtet, dass das Entfernen der Cryptococcenkapsel die Spektrumqualität beeinflusst (Hagen et al. 2015; Thomaz et al. 2016). Da die Kapsel DMSO (Dimethylsulfoxid) löslich ist haben wir einen Waschschriff mit 5% DMSO vor- oder innerhalb des Extraktionsprotokolls implementiert. Darüber hinaus ist die Kapsel mechanisch beseitigbar. Im Falle der mechanischen Beseitigung der Kapsel hat dies einen positiven Effekt auf die Intensität der Peaks in den erstellten Spektren, es konnten jedoch keine zusätzlichen Peaks gefunden werden (Abbildung 11).

Wir konnten jedoch auch nachweisen, dass die Beseitigung der Kapsel für eine sichere Identifikation der Isolate nicht notwendig ist (Abbildung 11), sodass dies ein entbehrlicher Schritt in der Probenaufarbeitung darstellt. Dies ist insbesondere in der Routinediagnostik vorteilhaft, da es unnötige Arbeitsschritte vermeidet und die Aufarbeitung den Herstellervorgaben des Biotyper entspricht.

Wir konnten in unserer Arbeit zeigen, dass die Identifikation von Nicht-hybrid-Stämmen aus dem *Cryptococcus neoformans/gattii*-Komplex mit den herkömmlichen Methoden und der selbstgestellten Datenbank sicher möglich ist. Die einzige Schwierigkeit war hier das Auseinanderhalten von *Cryptococcus tetragattii* und *Cryptococcus decagattii*, beides seltene Spezies, für die es wenige Testisolate gibt. In der Fachliteratur ist zudem der Spezies Status von *Cryptococcus decagattii* umstritten (Hagen et al. 2017; Kwon-Chung et al. 2017). Wenn beide Spezies zu einer zusammengefasst würden, wären wir mit unserer Datenbank in der Lage, 98,5% unserer Testisolate korrekt zu identifizieren.

Die Massenspektren der Referenzstämme sind über folgende Website der Universität Göttingen frei verfügbar: <https://github.com/oliverbader/BioTyper-libraries>

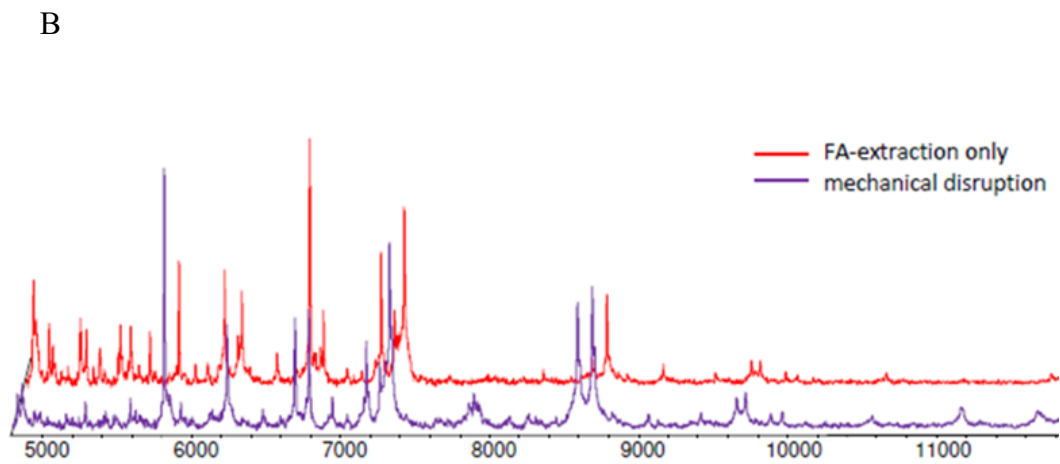
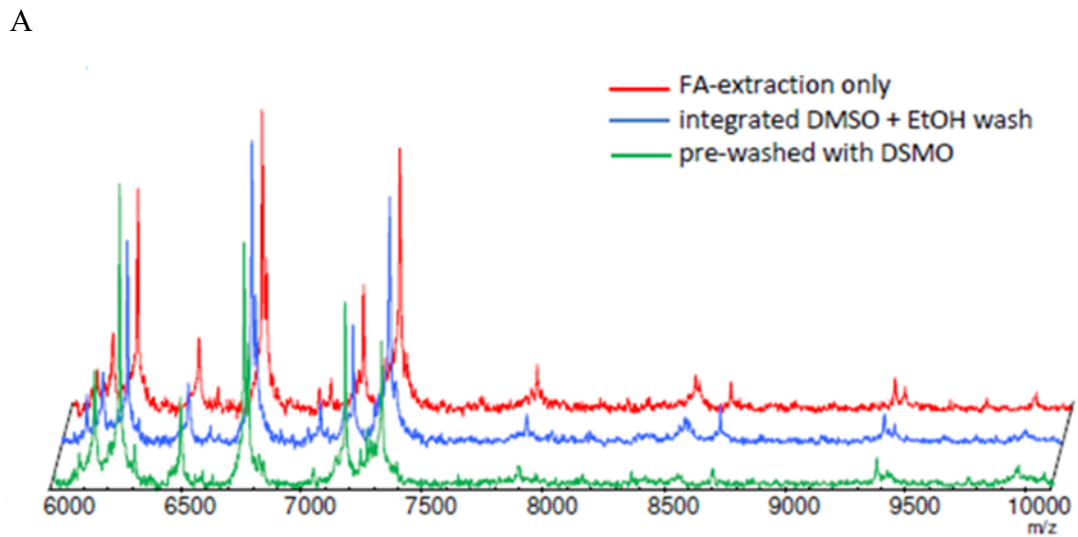


Abbildung 11: Identische Spektren vor und nach Entfernung der Cryptococcenkapsel:

A: Keine signifikanten Unterschiede zwischen Spektren mit integriertem oder vorangestellten Waschschrift und der reinen Extraktion.

B: Keine zusätzlichen Peaks, jedoch intensivere Peaks bei einer mechanischen Kapselreduktion.

4. Diskussion

Mittels der drei Publikationen (Bernhard et al. 2014; Bernhard et al. 2016; Bernhard et al. 2021) haben wir gezeigt, dass es möglich ist, eigene Referenzspektren zu erstellen und zu einer eigenen Datenbank zusammenzustellen, welche es ermöglicht selbst seltene und schwer differenzierbare Spezies zu identifizieren. Mit dieser Datenbank haben wir eine Lücke in der kommerziellen Datenbank des MALDI Biotypers, Bruker Daltonics geschlossen und konnten dank der Erweiterung der kommerziellen Datenbank um die YOTL-Referenzspektren die Arbeitslast in unserem Routinelabor der medizinischen Mikrobiologie deutlich senken.

Insbesondere die Arbeit „CryptoType – datasets for MALDI-TOF based differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* complex isolates“ macht dies deutlich. Die Cryptococcosose ist eine seltene Erkrankung in Deutschland, die meisten der weltweiten Infektionen geschehen im südlichen Afrika oder Asien und sind Co-Infektionen bei Patienten mit einer HIV Erkrankung (Park et al. 2009; Maziarz und Perfect 2016; Akhtar et al. 2020). Die Datenbank des MALDI Biotypers kann die einzelnen *Cryptococcus* Spezies nicht differenzieren, dies ist jedoch aufgrund der Seltenheit der Erkrankung in Deutschland (Richerts und Tinkelnot 2012) für die klinische Routine in Deutschland nicht relevant. In Laboren im südlichen Afrika spielt die Erkrankung jedoch vor allem bei durch HIV immunsupprimierten Patienten eine große Rolle, hier wäre eine Identifikation auf Speziesebene wünschenswert. Wir konnten in unser Arbeit zeigen, dass dies durch die von uns hergestellte Datenbank zuverlässig möglich ist.

Auch die Publikation „Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts“ zeigt die großen Möglichkeiten, die das Erstellen eigener Datenbanken hat: durch die zusätzlich eingepflegte Datenbank konnten die Arbeitsschritte in der Routinediagnostik der medizinischen Mikrobiologie Göttingen vereinfacht werden. Hierdurch fallen fehleranfällige Arbeitsschritte wie das Umetikettieren von Proben weg, die Candiadaprobe können genauso aufbereitet werden wie die Bakterienproben. Insgesamt dauert die reine Aufbereitung einer Probe nun 10-15 sec statt ca. 5 min, welche vorher mittels Extraktionsprotokoll der Herstellungsfirma Bruker, Deutschland benötigt wurden.

Wir konnten in allen drei Arbeiten zeigen, dass das Identifizieren selbst seltener und nah verwandter Spezies mittels Massenspektrometrie zuverlässig möglich ist. Wichtig bei der Nutzung der standardisiert erstellten Spektrogramme ist, sich an die Empfehlungen des Herstellers zu halten und strikt nur Ergebnisse als „richtig“ anzusehen, die auf Speziesebene ($\log\text{-Score} \geq 2.0$) identifiziert wurden.

Durch die Variation der Extraktionsprotokollen zur Beseitigung der Cryptococcenkapsel und den schlechteren Log-scores, die die OTL- aufbereiteten Proben mit der Identifikation mittels Referenzspektren aufbereitet mit der Extraktionsmethode haben wir gezeigt, dass eine Identifikation auf Speziesebene mit dem MALDI-Biotyper nur zuverlässig möglich ist, wenn die Methoden, mit denen das Referenzspektrum erstellt wurde, dieselbe ist wie die Methode, mit der die Probe aufgearbeitet wird. Dies zeigt die Sensibilität der Methodik, dass die Massenspektrometrie selbst die kleinen Veränderungen der Proteinkonzentration und Zusammensetzung erkennen kann, die durch eine Veränderung des Aufbereitungsprotokolls entstehen (siehe Abbildung 12).

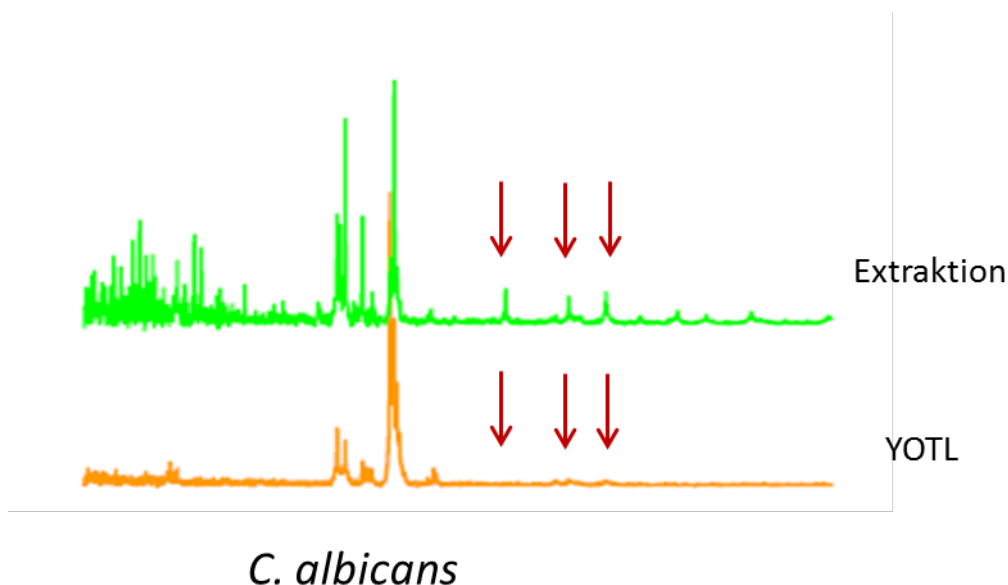


Abbildung 12: Unterschiede in den Massenspektren bei verschiedenen Präparationsprotokollen

Die insgesamt 25 Referenzspektren, welche von uns erstellt wurden, haben wir zu 3 kleinen Datenbanken der jeweiligen Spezies-Komplexe zusammengestellt und über die Plattform „github“ öffentlich zugänglich gemacht. Die Referenzspektren können über die Website <https://github.com/oliverbader/BioTyper-libraries> heruntergeladen und zu der eigenen

Datenbank hinzugefügt werden. Vor der Nutzung der neuen Referenzspektren insbesondere im Bereich der klinischen Diagnostik müssen diese eine Testphase unterlaufen. Dies beschreiben wir in unserer Arbeit „Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts“ In einer Testphase von 2 Monaten wurden alle klinischen Proben mittels der neuen „YOTL“ als auch dem Goldstandard aufgearbeitet. Nachdem sich die neue Methode in dieser Zeit als zuverlässig erwiesen hatte wurde die Routinediagnostik umgestellt (Bernhard et al. 2014)

Wir möchten mit dieser Arbeit zeigen, dass es möglich ist Datenbanken nach individuellen Bedürfnissen zu erstellen. Dies erfordert neben dem Vorhandensein eines Massenspektrometers nur die gewünschten Referenzspezies, eine Kontrollgruppe und natürlich sorgfältiges Arbeiten. In der Arbeit konnten wir zeigen, dass der eigentliche Aufwand die Referenzspekten herzustellen relativ gering ist. Hierin liegt eine große Chance, vor allem wenn die selbst erstellen „neuen“ Datenbanken öffentlich zugänglich gemacht werden können. Die Lücken, die in den kommerziellen Datenbanken bestehen (z.B. die Unterrepräsentation der filamentösen Pilze im Gegensatz zu Bakterien (MBT Filamentous Fungi Library)) können so nach individuellem Bedarf geschlossen werden. Hierdurch können zeit- und kostenintensive biochemische Tests vermieden werden.

Wichtig ist, dass die erstellten Referenzspektren sorgfältig validiert werden, insbesondere dann, wenn diese zur Identifikation von Patientenproben verwendet werden. Keinesfalls dürfen die selbsterstellten Referenzspektren zu einer Falschidentifikation führen, da Falschidentifikationen auf Speziesebene zu einer Falschbehandlung von Patienten führen könnte, was unter Umständen gravierende Folgen hätte. Da es sich bei den schlecht repräsentierten Spezies in den kommerziellen Datenbanken eher um seltene Spezies handelt ist es zum Teil schwierig die eigens erstellten Referenzspektren mit einer ausreichend großen Kontrollgruppe zu validieren. Auch in den vorliegenden Arbeiten zeigte sich teilweise dieses Problem, insbesondere in der Gruppe der *Scedosporien*- und *Cryptococcus* Spezies. Es wäre interessant die Güte der erstellten Referenzspektren anhand einer größeren Kontrollgruppe zu prüfen, die aus geographisch unterschiedlicheren Isolaten besteht. Dies gilt insbesondere für das YOTL-Datenset, da die Referenzspektren aus regionalen Isolaten, welche von Patientenproben der Universitätsmedizin Göttingen bestehen, erstellt wurden. Es wäre interessant zu prüfen, ob die Spektren der *Candida spp.*, überregional verwendbar sind, insbesondere, da sie auf Anfrage verfügbar sind. Auf diese Einschränkung der fehlenden

Validierung für überregionale Proben muss der anfragende Nutzer der Datenbank hingewiesen werden.

Im Falle einer Verwendung in einer Routinediagnostik eines Labors wäre es empfehlenswert die neuen Referenzspektren eine Testphase durchlaufen zu lassen um eine sichere Identifikation zu gewährleisten. Bei der Verwendung aller neuen Referenzspektren sollte bedacht werden, dass bei Zweifeln der Goldstandard (Extraktion) zur jeweiligen Identifikation herangezogen werden sollte.

In jedem Fall unterstreichen die drei Arbeiten das Potential der Massenspektromie in der Routinediagnostik. Durch das Erstellen von Referenzspektren nach individuellem Bedarf und dem Zusammenfügen dieser zu einer Datenbank können selbst seltene Spezies sicher und schnell erkannt werden.

5. Zusammenfassung

Der Nachweis von seltenen Pilzspezies mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie ist dadurch limitiert, dass die kommerziellen Datenbanken lückenhaft, oder die Aufbereitungsprotokolle in der Routinediagnostik aufwendig sind. Die vorliegende Dissertation, die aus drei Publikationen besteht zeigt auf, dass es möglich ist mit einfachen Mitteln eigene Datenbanken zu erstellen, die diese Lücken schließen, oder Arbeitsprozesse vereinfachen.

In der ersten Publikation „Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts“ zeigen wir, wie mittels einer minimalen Datenbank aus 6 Referenzspektren eines vereinfachten Probenaufarbeitungsprotokoll die Arbeit in der Routinediagnostik vereinfacht werden könnte.

Die zweite Publikation „Towards proteomic species barcoding of fungi - an example using *Scedosporium /Pseudallescheria* genus isolates“ beschreibt das Herstellen einer Datenbank mit Isolaten aus dem *Scedosporien/Pseudallescheria*-Komplex, die auch in der klinischen Routine anwendbar ist.

In der dritten Publikation „CryptoType – datasets for MALDI-TOF based differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* complex isolates“ haben wir ein Datenset aus 13 Referenzspektren für den Biotyper MALDI-TOF MS erstellt, welches aus den sieben anerkannten nicht-hybriden Subtypen in den *Cryptococcus neoformans / gattii*-Komplexen besteht. Diese Subtypisierung war bisher mit den kommerziellen Datenbanken nicht möglich, hier konnten wir aufzeigen, dass selbsterstellte Datenbanken Lücken der kommerziellen Datenbanken schließen können.

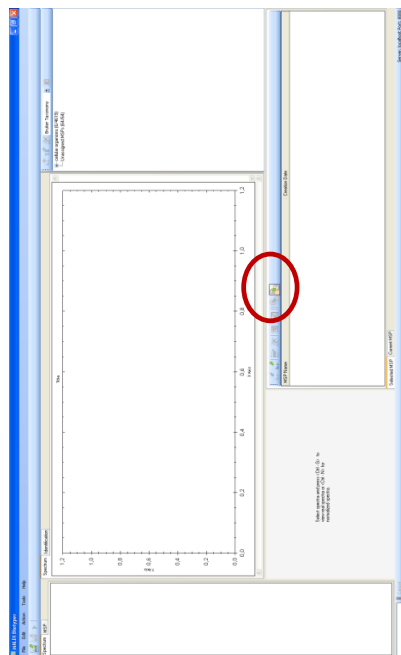
Diese drei Publikationen sollen zeigen, welches Potential zur Verbesserung der Identifikation seltener Pilzspezies die Erstellung eigener, auf die eigenen Bedürfnisse angepassten Datenbanken steckt.

6. Anhang

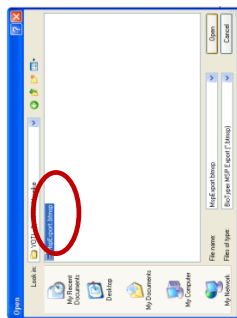
YOTL Spektren importieren

6.1. Anhang A: Importanleitung der YOTL Spektren

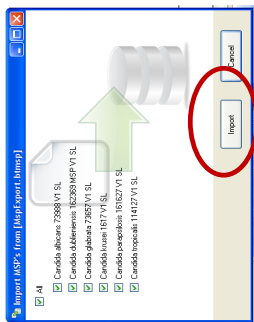
1. Im BioTyper Import-Dialog öffnen



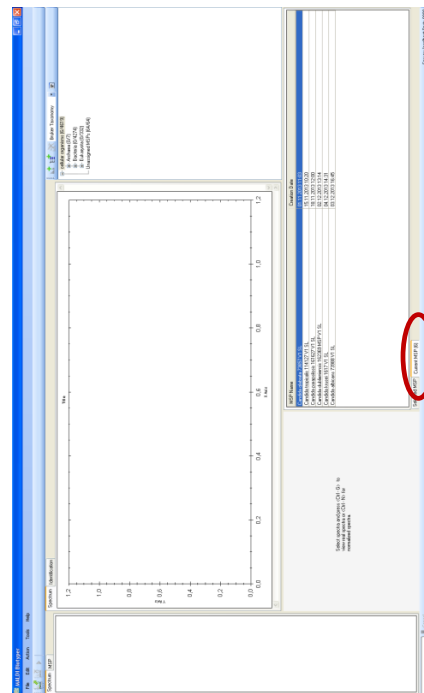
2. Zu importierende Datei auswählen



3. Alle Spektren importieren



5. Die importierten MSP findet man nun unter „current MSP“



4. warten...



7. Literaturverzeichnis

Akhtar S, Aggarwal N, Demkowicz R, Andreatos N, Gupta M (2020): *Cryptococcus* and HIV. *QJM* 113, 347–48

Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Walther G, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL (2010): Antifungal susceptibility profile of human-pathogenic species of *Lichtheimia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 3058–60

Bader O (2013): MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics*, 788–99

Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M (2011): Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*, 1359–65

Bernhard M, Weig M, Zautner AE, Gross U, Bader O (2014): Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts. *J Clin Microbiol*, 4163–67

Bernhard M, Zautner AE, Steinmann J, Weig M, Groß U, Bader O (2016): Towards proteomic species barcoding of fungi – An example using *Scedosporium/Pseudallescheria* complex isolates. *Fungal Biol* 120, 162–65

Bernhard M, Worasilchai N, Kangogo M, Bii C, Trzaska WJ, Weig M, Groß U, Chindamporn A, Bader O (2021): CryptoType – Public Datasets for MALDI-TOF-MS Based Differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* Complexes. *Front Cell Infect Microbiol*, 634382

Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WCJ, Abeln ECA, Dromer F, Meyer W (2001): Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology*, 891–07

Cassagne C, Cella AL, Suchon P, Normand AC, Ranque S, Piarroux R (2013): Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol*, 371–77

Coulibaly O, Marinach-Patrice C, Cassagne C, Piarroux R, Mazier D, Ranque S (2011): *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser

desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycol* 1–6

De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Spanu T, Fiori B, Posteraro B, Sanguinetti M (2014): Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *J Infect Dev Ctries*, 1081–88

Fang L, Zhang P, Wang J, Yang Q, Qu T (2020): Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis at an university hospital in China from 2013 to 2017. *Braz J Infect Dis*, 7–12

Farrer RA, Chang M, Davis MJ, van Dorp L, Yang DH, Shea T, Sewell TR, Meyer W, Balloux F, Edwards HM, et al. (2019): A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambezi Miombo Woodlands. *mBio*, e02306-19, /mbio/10/6/mBio.02306-19.atom

Firacative C, Trilles L, Meyer W (2012): MALDI-TOF MS Enables the Rapid Identification of the Major Molecular Types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* Species Complex. *PLoS ONE*, e37566

Freydiere AM, Guinet R, Boiron P (2001): Yeast identification in the clinical microbiology laboratory: phenotypical methods. *Med Mycol*, 9–33

Galanis E (2010): Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg Infect Dis*

Goyer M, Lucchi G, Ducoroy P, Vagner O, Bonnin A, Dalle F (2012): Optimization of the Preanalytical Steps of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification Provides a Flexible and Efficient Tool for Identification of Clinical Yeast Isolates in Medical Laboratories. *J Clin Microbiol*, 3066–68

Groß U: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 3. Auflage 2013; Thieme

Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, Falk R, Parmen S, Lumbsch HT, Boekhout T (2015): Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol*, 16–48

Hagen F, Lumbsch HT, Arsic Arsenijevic V, Badali H, Bertout S, Billmyre RB, Bragulat MR, Cabañes FJ, Carbia M, Chakrabarti A, et al. (2017): Importance of Resolving Fungal Nomenclature: the Case of Multiple Pathogenic Species in the *Cryptococcus* Genus. *mSphere* 2, mSphere. e00238-17

- Hendrickx M, Goffinet JS, Swinne D, Detandt M (2011): Screening of strains of the *Candida parapsilosis* group of the BCCM/IHEM collection by MALDI-TOF MS. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 544–48
- Jin L, Cao JR, Xue XY, Wu H, Wang LF, Guo L, Shen DX (2020): Clinical and microbiological characteristics of *Cryptococcus gattii* isolated from 7 hospitals in China. *BMC Microbiol*, 73
- Kangogo M, Bader O, Boga H, Wanyoike W, Folba C, Worasilchai N, Weig M, Groß U, Bii CC (2015): Molecular types of *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses*, 665–70
- Kempf W, Kempf Hantschke Kutzner Burgdorf: *Dermatopathologie*. 3. Aufl; Springer, Berlin 2015
- Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JMH, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, et al. (2011): Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat Rev Microbiol*, 193–03
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE, Wickes BL, Meyer W, Cuomo CA, Wollenburg KR, Bicanic TA, Castañeda E, Chang YC, Chen J, et al. (2017): The Case for Adopting the “Species Complex” Nomenclature for the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *mSphere* 2, mSphere.00357-16, e00357-16
- Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed SA, Andreas F, Kaltseis J, Nagl M, Lass-Flörl C, Risslegger B, et al. (2014): Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers*, 1–10
- Marklein G, Josten M, Klanke U, Muller E, Horre R, Maier T, Wenzel T, Kostrzewa M, Bierbaum G, Hoerauf A, Sahl HG (2009): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol*, 2912–17
- Maziarz EK, Perfect JR (2016): Cryptococcosis. *Infect Dis Clin North Am*, 179–06
- MBT Filamentous Fungi Library. 1862835_MBT_Fungi_Library_brochure_01-2019_ebook.pdf; abgerufen am 26.04.2021
- McNeil MM, Nash SL, Hajjeh RA, Phelan MA, Conn LA, Plikaytis BD, Warnock DW (2001): Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980-1997. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*, 641–47

- McTaggart LR, Lei E, Richardson SE, Hoang L, Fothergill A, Zhang SX (2011): Rapid Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*, 3050–53
- Meyer W, Castañeda A, Jackson S, Huynh M, Castañeda E, the IberoAmerican Cryptococcal Study Group (2003): Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. *Emerg Infect Dis*, 189–95
- Neumeister B, Burkhardt F, Dahouk S al (Hrsg.): *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. 2., vollständig überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York 2009
- O’Meara TR, Alspaugh JA (2012): The *Cryptococcus neoformans* Capsule: a Sword and a Shield. *Clin Microbiol Rev*, 387–08
- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM (2009): Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS*, 525–30
- Pfaller MA, Diekema DJ (2007): Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*, 133–63
- Posteraro B, Vella A, Cogliati M, De Carolis E, Florio AR, Posteraro P, Sanguinetti M, Tortorano AM (2012): Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Method for Discrimination between Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J Clin Microbiol*, 2472–76
- Prof. Dr. Seebacher C. https://dmykg.ementals.de/wp-content/uploads/2015/08/Persoenlichkeiten_Fruehzeit_dt_Mykologie5.pdf; abgerufen am 25.04.2021
- Richerts V, Tinkelnot K (2012): Epidemiologie der Kryptokokkose in Deutschland von 2004 bis 2010. *Epidemiol Bull* 29/2012, 275–78
- Schubert S, Wieser A (2013): Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. *BIOspektrum*, 743–47
- Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, Wagner S, Klotz M, Becker A, Haase G, et al. (2015): Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J Cyst Fibros*, 237–41

- Sitterlé E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, Dauphin B, Angebault C, Quesne G, Beretti JL, et al. (2014): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/ Scedosporium* species. *Clin Microbiol Infect*, 929–35
- Steinmann J, Schmidt D, Buer J, Rath PM (2011): Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semiautomated repetitive sequence-based PCR. *Med Mycol*, 475–83
- Tangwattanachuleeporn M, Somporn P, Poolpol K, Gross U, Weig M, Bader O (2013): Prevalence and Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Pigeon Excreta in Chon Buri Province, Eastern Thailand. *Med Mycol J*, 303–07
- Taschdjian CL (1960): Rapid Identification of *Candida Albicans* by Filamentation on Serum and Serum Substitutes. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 212
- Theel ES, Hall L, Mandrekar J, Wengenack NL (2011): Dermatophyte Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*, 4067–71
- Thomaz DY, Grenfell RC, Vidal MS, Giudice MC, Del Negro GM, Juliano L, Benard G, de Almeida Junior JN (2016): Does the Capsule Interfere with Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*? *J Clin Microbiol*, 474–77
- Thompson GR, Wiederhold NP, Fothergill AW, Vallor AC, Wickes BL, Patterson TF (2009): Antifungal Susceptibilities among Different Serotypes of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 309–11
- Trilles L, Meyer W, Wanke B, Guarro J, Lazéra M (2012): Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med Mycol*, 328–32
- Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaid M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I, Mertens AH (2012): 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*, 841–48
- Willinger B (2006): Laboratory Diagnosis and Therapy of Invasive Fungal Infections. *Curr Drug Targets*, 513–22

Worasilchai N, Tangwattanachuleeporn M, Meesilpavikkai K, Folba C, Kangogo M, Groß U, Weig M, Bader O, Chindamporn A (2016): Diversity and Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Isolates in Thailand: Table 1. Med Mycol myw130

Yapar N (2014): Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. Ther Clin Risk Manag, 95–05

Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, Zheng YC, Nishimura K, Gräser Y, De Hoog GS, Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, et al. (2007): Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Med Mycol, 547–58

Zetl UK (Hrsg.): Klinische Liquordiagnostik. 2. Aufl; de Gruyter, Berlin 2005

8. Publikationen

8.1. Bernhard et al. 2014 JCM.....



Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts

Mareike Bernhard,^a Michael Weig,^a Andreas E. Zautner,^{a,b} Uwe Groß,^a Oliver Bader^a

Institute for Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany^a; UMG-Laboratory, Institute for Clinical Chemistry, University Medical Center, Göttingen, Germany^b

Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based species identification has become a reliable and fast tool for use in clinical diagnostics, including in mycology. To identify yeasts in the MALDI Biotyper system, a multistep extraction protocol, which is also used to generate the reference spectra, is recommended. Sample preparation by on-target lysis (OTL) requires significantly less hands-on time and is therefore highly desirable, but it results in too-low MALDI Biotyper log score values to allow automated species identification. To overcome this problem, we developed a procedure for generating and validating an OTL spectrum data set for the most relevant and frequently occurring yeast species in clinical specimens. The performance was evaluated against a set of OTL spectra derived during clinical routine procedures and from a set of closely related yeasts. In the diagnostic setting, the OTL procedure significantly decreased the workload but allowed species identification with high specificity and sensitivity. False identifications were not observed. The use of in-house-generated OTL reference spectra can highly accelerate MALDI-TOF MS-based yeast species identification using the MALDI Biotyper.

For species identification from culture material, matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is a reliable and fast tool for use in clinical diagnostics, including in mycology (1, 2). To prepare bacterial samples for species identification, it is generally sufficient to transfer a small amount of intact cells from the agar plate onto the MALDI target plate and overlay the cells with a small amount of matrix solution. This smear preparation protocol is appropriate for most bacterial species, but due to their stronger cell walls, fungal cells do not necessarily lyse to the same extent and may not sufficiently release their intracellular contents under these conditions, resulting in an insufficient number of peaks above background level.

To identify yeast species in the MALDI Biotyper system, the manufacturer recommends the use of an extraction protocol, which also has been used to generate the reference spectrum database. Briefly, cells are harvested and washed in 70% ethanol, dried, and then lysed in 70% formic acid, followed by the addition of acetonitrile. The debris is removed by centrifugation and the extract spotted onto a steel target. This method generally leads to an increased number of distinct peaks, which are sufficient for species identification. However, this multistep procedure delays the workflow during routine diagnostic procedures.

Between the simple smear preparation protocol and the full extraction, several variants of the extraction steps have been described in the literature. In the simplest version, the smear is overlaid with 70% formic acid and left to dry before overlaying with the matrix. Here, this is referred to as on-target lysis (OTL); in the literature, it is also called short extraction or formic acid overlay (3–7). Since this particular sample preparation method is significantly faster and requires less hands-on time than extraction, several studies have evaluated its usefulness in routine diagnostic procedures with the MALDI Biotyper (3, 4, 6–11). The technical problem to be overcome here is that compared to full extraction, this method generates (i) partially different and (ii) fewer peaks with a signal-to-noise ratio above the specified threshold ratio. As outlined above, the MALDI Biotyper reference spectra have been

generated using the full extraction protocol and, therefore, the OTL spectra are matched only at decreased log scores (2). A log score is the measure of quality of the database hit, where log scores of ≥ 2.000 are classified as species-level identifications, and log scores between 1.700 and 1.999 are classified as genus-level identifications only. Nevertheless, it has been found that lower log scores starting from 1.800 (10, 11), 1.700 (3, 4, 7, 9), or even 1.500 (6, 12) can be accepted as species specific for yeasts if certain criteria are met (4, 8, 12).

To achieve an automated species-level identification in the current V3 MALDI Biotyper client series, all spectrum scores of ≥ 2.000 must be of the same species and all spectrum scores of ≥ 1.700 of the same genus. In the absence of automated implementation of the modified algorithms, laborious manual inspection of the hit lists for each sample and a manual adjustment of the identification level to the species level must be performed if the criteria are met.

Obviously, the best preparation method to use for the system at hand is the same method with which the spectra for the database have been generated, since this will lead to the highest concordance. To streamline the diagnostic procedures for the identification of yeast species with the MALDI Biotyper, it was recently shown that reference spectra added to the database from yeast strains prepared with the quick OTL method can lead to significant score values (13).

To overcome the need to generate and curate large amounts of OTL reference spectra into the MALDI Biotyper database, we have

Received 28 July 2014 Returned for modification 27 August 2014

Accepted 8 September 2014

Published ahead of print 17 September 2014

Editor: D. W. Warnock

Address correspondence to Oliver Bader, obader@gwdg.de.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.02128-14

Bernhard et al.

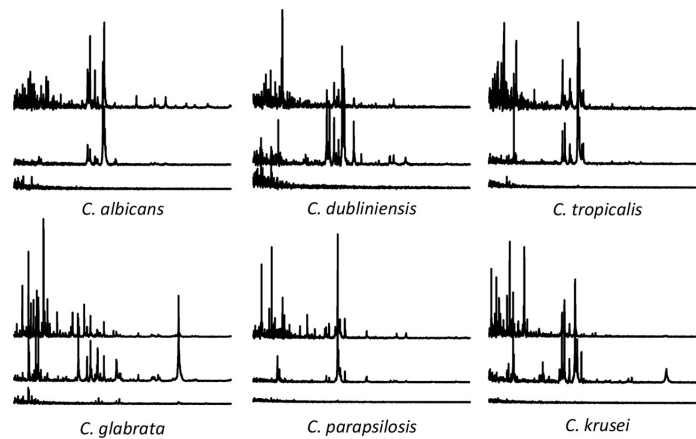


FIG 1 Comparison of example mass spectra obtained by the different preparation methods. Top spectra, full extraction; middle spectra, OTL method; bottom spectra, smear preparation. The mass range of each spectrum is 2 to 14 kDa (x axis), and the peak intensities (y axis) are set to 15,000 arbitrary units. The acquisition of smear spectra was performed manually, whereas that of OTL and extraction spectra was by automatic mode.

tested what can be achieved with a minimal set of spectra for the clinically most frequently occurring species only.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains and culture. For long-term storage, yeasts were kept as Cryobank stocks (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germany) at -70°C . Once thawed, the strains were kept on Sabouraud agar slants supplemented with 0.5% peptone (casein), 0.5% peptone (meat), and 2% glucose. The isolates from diagnostic procedures were grown on either Columbia blood, chocolate, or Sabouraud agar (all from Oxoid, Wesel, Germany). The isolates selected for this study were from *Candida albicans* ($n = 122$), *Candida dubliniensis* ($n = 10$), *Candida tropicalis* ($n = 25$), *Candida lusitanae* ($n = 14$), *Candida parapsilosis* ($n = 20$), *Candida metapsilosis* ($n = 2$), *Candida orthopsilosis* ($n = 7$), *Candida glabrata* ($n = 27$), *Candida nivariensis* ($n = 1$), *Candida palmiophila* ($n = 7$), *Candida guilliermondii* ($n = 16$), and *Candida krusei* ($n = 14$).

The isolates eventually chosen for making the six final reference entries (see below) were deposited at the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) under DSM 28718 (*C. glabrata*), DSM 28719 (*C. albicans*), DSM 28720 (*C. tropicalis*), DSM 28721 (*C. krusei*), DSM 28722 (*C. parapsilosis*), and DSM 28723 (*C. dubliniensis*).

Sample preparation and spectrum acquisition. The samples were prepared by three different methods. First, smear preparation was done by careful streaking of a small amount of cells obtained from a fresh colony onto the steel target plate and overlaying it with matrix solution (saturated aqueous solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile, 0.125% trifluoroacetic acid). Second, OTL was performed similarly to smear preparation, except that the cells were lysed by adding 1 μl of 70% formic acid and left to dry prior to adding matrix solution (2, 14). Third, full extraction was performed according to the protocol provided by the manufacturer, extracting proteins from ethanolized cells by sequential treatment with 70% formic acid and acetonitrile.

All OTL sample preparations were done in triplicate. The spectra from the samples prepared with either full extraction or OTL were recorded using the automated acquisition mode of the MALDI Biotyper 3.1 software on an Autoflex III mass spectrometer (both from Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The spectra from the smear preparations were acquired by manually adding 600 spectra from spot regions where at least a minimal set of distinct peaks was recordable. The smear preparation spectra served only in a qualitative demonstration of the differences by the three methods (Fig. 1).

Generation of MALDI Biotyper database spectra. For the generation of MALDI Biotyper database entries (mass spectra [MSP]), strains were selected from those occurring during routine diagnostics. For less frequently occurring species, such as *C. dubliniensis*, *C. orthopsilosis*, *C. metapsilosis*, *C. nivariensis*, and *C. palmiophila*, isolates were additionally taken from the 2001–2013 collection of the German National Reference Center for Systemic Mycoses Göttingen. The species of all isolates selected for MSP generation were confirmed by internal transcribed spacer (ITS) sequencing (15) and the MALDI Biotyper (current V3 database with 4,613 spectra) using the full extraction method. Prior to the preparation of samples, strains were cultivated overnight on Sabouraud agar at 35°C .

Before spectrum acquisition for the generation of MSP, the instrument was calibrated with Bruker Test Standard (BTS). For each isolate, 30 individual spots were prepared using the OTL method. The spectra were acquired using the automated acquisition mode and an MSP generated to include masses occurring in $\geq 20\%$ of the spectrum set. For all procedures, the standard settings as implemented in the MALDI Biotyper were used.

RESULTS

Over a period of 1 month, we collected all yeasts differentiated in our clinical diagnostic laboratory. This amounted to 122 *C. albicans*, 25 *C. tropicalis*, 20 *C. parapsilosis*, 27 *C. glabrata*, 10 *C. dubliniensis*, and 14 *C. krusei* isolates, as well as several single isolates from rare species. These six species also represented the most frequently occurring yeasts in our clinical specimen over longer periods of time. The mass spectra of samples prepared with the extraction method were visually different from those prepared with the OTL method (Fig. 1). The OTL spectra generally contained fewer (~ 70 to 90) but more intense mass signals above the signal-to-noise ratio than those of the extraction spectra, for which we regularly obtained >150 mass signals (data not shown). These OTL spectra resulted in log scores in the genus-level range of 1.800 to 1.999, as previously reported by others (10, 11). Only for *C. tropicalis*, $\sim 50\%$ of the scores were >2.000 (Fig. 2A, Biotyper column for *C. tropicalis*). The best-effort mass spectra obtained manually from the samples prepared by smear preparation gave no useful mass signals and were insufficient for either genus or species identification (Fig. 1).

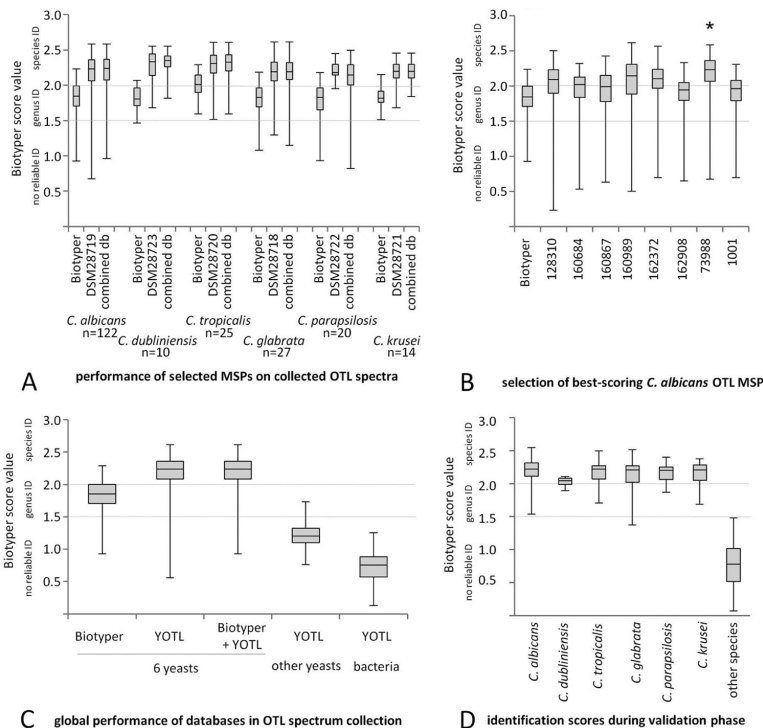


FIG 2 Performance of the YOTL database. Quantile plots of MALDI Biotyper score values depicting database performances. (A) MALDI Biotyper database versus final selected best-performing MSP of the six most frequent yeast species. The use of YOTL or the combined YOTL and MALDI Biotyper database results in higher log scores from samples with OTL preparation. (B) Selection process for OTL mass spectra, using *C. albicans* as an example. *, Best-scoring MSP (minimum >75% species identifications in retrospective OTL spectrum collection). (C) Different spectrum set-MSP database combinations. Columns 1 to 3, log score values from samples prepared by OTL are much lower if the MALDI Biotyper database is used compared to YOTL or the combined database. Column 4, yeast species not present in the YOTL database give no reliable identification in YOTL. Column 5, bacterial smear spectra do not give rise to false hits in the YOTL database. (D) In-house validation. Quantile plots of log score values obtained during the validation phase, stratified per species represented in YOTL. ID, identification; db, database.

Generation of MSP entries for epidemiologically frequent yeasts. Different isolates of *C. albicans* ($n = 8$), *C. tropicalis* ($n = 3$), *C. parapsilosis* ($n = 4$), *C. glabrata* ($n = 2$), *C. krusei* ($n = 2$), and *C. dubliniensis* ($n = 2$) were selected from among our routine isolates and reference MSP generated from samples prepared by OTL (see below). The identification levels obtained by these novel MSP were calculated retrospectively on all OTL spectra derived from routine diagnostics during the initial study period (acquired with the automated “smart” mode). The MSP of one species showed different matching levels to the respective set of routine OTL spectra, as outlined, for example, for *C. albicans* (Fig. 2B). For each species, we selected the one MSP that resulted in the highest rates of correct OTL spectrum identifications ($\geq 75\%$ of scores at the species level) and entered them into a novel database, the Yeast On-Target Lysis (YOTL) database. The YOTL database, as well as the combination of YOTL with the MALDI Biotyper database, allowed efficient and correct matching of the OTL spectra. When the log score values initially remained < 2.000 , this was generally amended by repeating the preparation or by preparing the sample in duplicate (data not shown).

Quality control. Although the MSP generated were efficiently able to match OTL spectra correctly, it was a major concern that due to the reduced peak numbers, their discriminatory power might be reduced and consequently also their ability to discriminate correctly between closely related species. We therefore introduced a control group consisting of several fungal species that were closely related to the species in the YOTL database. For *C. albicans*, this was *C. dubliniensis* (already included in the database); for *C. glabrata*, this was *C. nivariensis*; and for *C. parapsilosis*, we included *C. orthopsilosis* and *C. metapsilosis*. Also, *C. lusitanae*, *C. guilliermondii*, and *C. palmiophila* were included, as these species are notoriously difficult to tell apart, and only MALDI-TOF has recently facilitated easy differentiation between them (16, 17).

While the *C. dubliniensis* MSP efficiently matched all respective isolates (Fig. 2A), there was no cross-matching with the *C. albicans* MSP or those of any other species (data not shown). The OTL spectra of all other species were summarized into a single spectrum group and evaluated against the set of six MSP. There were no matches to YOTL with scores of > 1.800 (Fig. 2C).

Bernhard et al.

TABLE 1 Overall performance of different databases alone and in combination

ID level ^a	1st attempt with single database				Combined databases			
	Biotyper		YOTL		1st attempt		2nd attempt ^b	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Species	124	39	266	84	278	88	302	96
Genus	150	48	46	15	35	11	13	4
None	41	13	3	1	2	1	0	0

^aID, identification.^bEstimated cumulative positive rate calculated from a test set of 25 isolates.

Only the spectrum of *C. nivariensis* matched with the *C. glabrata* MSP, with a score of 1.732 (at the genus level). Similarly, the testing of a set of 300 consecutive routine bacterial smear spectra did not result in any matches within the YOTL database above the genus-level significance threshold of 1.500 (Fig. 2C).

In-house validation. For validation of the YOTL database, all yeasts occurring in our routine diagnostics over the following 2 months were prepared by both OTL and extraction, side-by-side and in duplicate. Excluding isolates processed during an initial familiarization phase of 1 week, during which technicians were trained in the OTL protocol, this amounted to 208 *C. albicans*, 22 *C. tropicalis*, 15 *C. parapsilosis*, 54 *C. glabrata*, 7 *C. dubliniensis*, and 9 *C. krusei* isolates, as well as 41 isolates of species not included in YOTL, as determined by the MALDI Biotyper extraction method as the gold standard.

Using the recommended cutoff at a log score value of 2.000, there were no false species identifications using YOTL only or the combined YOTL and MALDI Biotyper databases. The yeast isolates whose species were represented in YOTL scored mostly >2.000 (Fig. 2D). The isolates of those species not represented in YOTL did not produce log score values of >1.5 and thus were not within the relevant range (Fig. 2D). Of the isolates whose species were contained in YOTL, 84% and 88% were correctly identified on the first attempt at the species level using YOTL only or the combined YOTL and MALDI Biotyper databases, respectively (Table 1). In 25 cases, we analyzed whether repeating the analysis after replating or extending the incubation time for plates with small colonies had been successful. Indeed, this was the case in 23 of 25 (92%) cases, achieving an estimated overall level of 96% correct species identifications (Table 1).

DISCUSSION

Mass spectra generated from yeasts prepared with the OTL method generally give rise to classifications with score values of <2.000 using the regular MALDI Biotyper database. The addition of our yeast OTL spectra (YOTL) to the regular MALDI Biotyper database significantly improved the recognition of such samples and circumvented the need for specific algorithms to classify low-scoring matches (2). Using the combined YOTL and MALDI Biotyper databases, we achieved 88% correct identifications for the six species on the first attempt and up to 96% (cumulative) when we repeated the analysis after replating the isolates or extending the growth time. Incidentally, on the first attempt, several correct matches were observed at the genus level that were incorrect at the species level. This indicates that once YOTL spectra are incorpo-

rated, any other algorithms accepting genus-level identifications as species specific (3, 4, 6–11) must not be used.

In contrast to others (13), our auxiliary YOTL database contained only a single OTL MSP for each of the six most frequently occurring yeasts in clinical specimens. The YOTL database significantly improved the diagnostic workflow of MALDI-TOF MS-based yeast species identifications in our routine laboratory, as shown by our in-house validation. Our procedure of making such OTL reference spectra is technically simple and can be accomplished by most laboratories that are generally familiar with the technology. In the absence of manufacturer-provided OTL spectra, such in-house-generated spectra can be integrated into the database, as long as proper quality control measures are met. Due to the absence of cross-matching at the species level with other closely related yeast species, it can be assumed that such databases can easily be enlarged to encompass other species, if needed. The YOTL spectrum set is freely available upon request.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Agnieszka Goretzki and Iris Iben for ITS sequencing, Madlen Targatz, Jana Lamoumi, Doreen Meinhard, Dunja Koch, and Uta Vasiljevic for conducting the routine MALDI identification process, and Katrin Gunka for critically reading the manuscript.

M.B. did the experiments, M.B., M.W., and O.B. wrote the manuscript, A.E.Z. helped to evaluate results, and U.G., M.W., and O.B. conceived the study.

O.B. has received speaker's fees and travel reimbursements from Bruker Daltonics. The other authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. 2011. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1359–1365. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03398.x>
- Bader O. 2013. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 13:788–799. <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.201200468>
- Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaïd M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I, Mertens AH. 2012. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:841–848. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1383-y>
- Goyer M, Lucchi G, Ducoroy P, Vagner O, Bonnin A, Dalle F. 2012. Optimization of the pre-analytical steps of matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry identification provides a flexible and efficient tool for identification of clinical yeast isolates in medical laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 50:3066–3068. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06381-11>
- Goffinet J, Hendrickx M, Gras J, Mullier F, Boreas A, Delmee M, Rodriguez-Villalobos H. 2010. Treatment method for yeast identification with MALDI-TOF MS; presentation M-407/429. 50th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. (ICAAC), 12 to 15 September 2010, Boston, MA.
- Theel ES, Schmitt BH, Hall I, Cunningham SA, Walchak RC, Patel R, Wengenack NL. 2012. Formic acid-based direct, on-plate testing of yeast and *Corynebacterium* species by Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 50:3093–3095. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01045-12>
- Cassagne C, Cella AL, Suchon P, Normand AC, Ranque S, Piarroux R. 2013. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDI-TOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med. Mycol.* 51:371–377. <http://dx.doi.org/10.3109/13693786.2012.720720>
- Steenels D, Verhaegen J, Lagrou K. 2011. 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.* 66:267–273.

9. Pinto A, Halliday C, Zahra M, van Hal S, Olma T, Maszewska K, Iredell JR, Meyer W, Chen SC. 2011. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 6:e25712. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025712>.
10. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. 2010. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J. Clin. Microbiol.* 48:3482–3486. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00687-09>.
11. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SI, Buckwalter SP, Wengenack NL. 2011. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J. Clin. Microbiol.* 49:1614–1616. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02381-10>.
12. Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, Kostrzewa M. 2011. Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J. Mol. Diagn.* 13:701–706. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.07.004>.
13. De Carolis E, Vella A, Vaccaro L, Torelli R, Posteraro P, Ricciardi W, Sanguinetti M, Posteraro B. 2014. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *J. Clin. Microbiol.* 52:1453–1458. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03355-13>.
14. Posteraro B, De Carolis E, Vella A, Sanguinetti M. 2013. MALDI-TOF mass spectrometry in the clinical mycology laboratory: identification of fungi and beyond. *Expert Rev. Proteomics* 10:151–164. <http://dx.doi.org/10.1586/epr.13.8>.
15. Chen YC, Eisner JD, Kattar MM, Rassoulian-Barrett SL, LaFe K, Yarfitz SL, Limaye AP, Cookson BT. 2000. Identification of medically important yeasts using PCR-based detection of DNA sequence polymorphisms in the internal transcribed spacer 2 region of the rRNA genes. *J. Clin. Microbiol.* 38:2302–2310.
16. Jensen RH, Arendrup MC. 2011. *Candida palmioleophila*: characterization of a previously overlooked pathogen and its unique susceptibility profile in comparison with five related species. *J. Clin. Microbiol.* 49:549–556. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02071-10>.
17. Desnos-Ollivier M, Ragon M, Robert V, Raoux D, Gantier JC, Dromer F. 2008. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a rare human fungal pathogen often misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *J. Clin. Microbiol.* 46:3237–3242. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01451-08>.

Bekannte Zitierungen dieses Artikels (Stand Juni 2022):

- Fraser, M., Brown, Z., Houldsworth, M., Borman, A.M. and Johnson, E.M., 2016. Rapid identification of 6328 isolates of pathogenic yeasts using MALDI-ToF MS and a simplified, rapid extraction procedure that is compatible with the Bruker Biotyper platform and database. *Medical mycology*, 54(1), pp.80-88.
- van Belkum, A., Chatellier, S., Girard, V., Pincus, D., Deol, P. and Dunne Jr, W.M., 2015. Progress in proteomics for clinical microbiology: MALDI-TOF MS for microbial species identification and more. *Expert review of proteomics*, 12(6), pp.595-605.
- Bader, O., 2017. Fungal species identification by MALDI-ToF mass spectrometry. In *Human Fungal Pathogen Identification*(pp. 323-337). Humana Press, New York, NY.
- Normand, A.C., Gabriel, F., Riat, A., Cassagne, C., Bourgeois, N., Huguenin, A., Chauvin, P., De Geyter, D., Bexkens, M., Rubio, E. and Hendrickx, M., 2020. Optimization of MALDI-ToF mass spectrometry for yeast identification: a multicenter study. *Medical mycology*, 58(5), pp.639-649.
- Mushi, M.F., Bader, O., Bii, C., Groß, U. and Mshana, S.E., 2019. Virulence and susceptibility patterns of clinical *Candida* spp. isolates from a tertiary hospital, Tanzania. *Medical mycology*, 57(5), pp.566-572.
- Santos, C.R., Francisco, E., Mazza, M., Padovan, A.C.B., Colombo, A. and Lima, N., 2017. Impact of MALDI-TOF MS in Clinical Mycology; Progress and Barriers in Diagnostics. *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*, pp.211-230.
- Riat, A., Rentenaar, R.J., Van Drongelen, A.M., Barras, V., Bertens, L.C., Vlek, A.L., Doppenberg, E., Weersink, A.J., Reinders, E., Vlaminckx, B.J. and Overbeeke, N., 2015. Ground Steel Target Plates in Combination with Direct Transfer of Clinical *Candida* Isolates Improves Frequencies of Species-Level Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Comparison with Polished Steel Target Plates. *Journal of clinical microbiology*, 53(6), pp.1993-1995.
- Zautner, A.E., Lugert, R., Masanta, W.O., Weig, M., Groß, U. and Bader, O., 2016. Subtyping of *Campylobacter jejuni* ssp. *doylei* isolates using Mass Spectrometry-based PhyloProteomics (MSPP). *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (116), p.e54165.
- Andersen, K.M., Kristoffersen, A.K., Ingebretsen, A., Vikholt, K.J., Örtengren, U.T., Olsen,

- I., Enersen, M. and Gaustad, P., 2016. Diversity and antifungal susceptibility of Norwegian *Candida glabrata* clinical isolates. *Journal of oral microbiology*, 8(1), p.29849.
- Gómez-Molero, E., Willis, J.R., Dudakova, A., Carreté, L., Weig, M., Groß, U., Gácsér, A., Gabaldón, T. and Bader, O., 2020. Phenotypic variability in a coinfection with three independent *Candida parapsilosis* lineages. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Gómez-Molero, E., De-la-Pinta, I., Fernández-Pereira, J., Groß, U., Weig, M., Quindós, G., de Groot, P.W. and Bader, O., 2021. *Candida parapsilosis* Colony Morphotype Forecasts Biofilm Formation of Clinical Isolates. *Journal of Fungi*, 7(1), p.33.
- Maenchantrath, C., Nutalai, D., Samosornsuk, W. and Sakoonwatanyoo, P., 2020. Identification of yeasts from clinical samples using MALDI-TOF MS. *Vajira Medical Journal: Journal of Urban Medicine*, 64(4), pp.297-310.
- Molero, E.G., 2019. Variability of biofilm formation in *Candida glabrata* and *Candida parapsilosis* and its consequences on the infection process (Doctoral dissertation, Georg-August-Universität Göttingen).
- Kusters, J., & Bertens, L. (2015). Groundsteel target plates in combination with direct transfer of clinical yeast isolates improves frequencies of...
- Gómez-Molero, E., De-la-Pinta, I., Fernández-Pereira, J., Groß, U., Weig, M., Quindós, G., de Groot, P.W.J. and Bader, O., 2021. *Candida parapsilosis* Colony Morphotype Forecasts Biofilm Formation of Clinical Isolates. *J. Fungi* 2021, 7, 33.
- Riat, A., Bertens, L.C.M., Boekhout, T., van Wet, K.N.A. and Kusters, J., 2015. Ground Steel Target Plates in Combination with Direct Transfer of Clinical *Candida* Isolates Improves Frequencies of Species-Level Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry in Comparison with Polished Steel Target Plates *Journal of clinical microbiology* 2015

8.2. Bernhard et al. 2015, bms...

FUNGAL BIOLOGY 120 (2016) 162–165



British Mycological
Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio



Towards proteomic species barcoding of fungi – An example using *Scedosporium/Pseudallescheria* complex isolates



Mareike BERNHARD^a, Andreas Erich ZAUTNER^a, Joerg STEINMANN^b,
Michael WEIG^a, Uwe GROß^a, Oliver BADER^{a,*}

^aInstitute for Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen, Kreuzberggring 57, D-37075 Göttingen, Germany

^bInstitute of Medical Microbiology, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, D-45122 Essen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 December 2014

Received in revised form

29 June 2015

Accepted 6 July 2015

Available online 17 July 2015

Corresponding Editor:

Sybren De Hoog

Keywords:

Lomentospora prolificans

MALDI BioTyper

Scedosporium apiospermum complex

Scedosporium boydii

ABSTRACT

MALDI-ToF mass spectrometry offers fast and reliable species identification for bacteria and yeasts under clinical routine conditions. Here, we produced mass spectra for identification of clinically important species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex using the recently suggested new nomenclature and use this example to discuss to what extent the principle of DNA barcoding might be transferred to mass spectrometry.

© 2015 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

To date, six different potentially human pathogenic mould species have been recognized within the *Pseudallescheria/Scedosporium* genus, namely *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium dehoogii*, *Lomentospora prolificans*, *Scedosporium boydii*, and *Pseudallescheria minutispora* (Zeng et al. 2007).

Infections due to moulds of this genus have been increasingly reported over the past decades. Originally observed in cases of near-drowning, these fungi are now also known to be common colonizers of lungs of cystic fibrosis patients.

The six species significantly differ in their susceptibility patterns towards commonly used clinical drugs (Alastruey-Izquierdo et al. 2007; Lackner et al. 2012a). Fast and accurate species identification of these pathogens is therefore a clinical diagnostic necessity.

Although tests are available to amplify and differentiate DNA directly from clinical specimen [e.g. (Babady et al. 2011; Harun et al. 2011; Buelow et al. 2012; Lackner et al. 2012b)], culture is still necessary to obtain isolates for susceptibility testing procedures. With an isolate at hands, also microscopy or less cumbersome mass spectrometric species identification is possible. Indeed, MALDI-ToF mass spectrometry has

* Corresponding author. Tel.: +49 551 39 22346; fax: +49 551 39 5861.

E-mail address: obader@gwdg.de (O. Bader).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.07.001>

1878-6146/© 2015 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

previously been shown to be able to identify most of these organisms to the species level using both the MALDI BioTyper (Coulibaly et al. 2011) and the Andromas (Sitterle et al. 2014) systems.

Here, we contribute publicly available reference mass spectra for identification of clinically relevant *Scedosporium/Pseudallescheria* complex isolates using the liquid culture procedure according to the MALDI BioTyper Fungi library and use this example to discuss to what extent the principle of barcoding can be transferred to mass spectrometry.

Materials and methods

Strain set

As reference isolates we used *Pseudallescheria angusta* (CBS 245.72), *Scedosporium boydii* (CBS 117432, CBS 120157), *Pseudallescheria ellipsoidea* (CBS 301.79), *Scedosporium apiospermum* (CBS 117410), *Scedosporium aurantiacum* (CBS 116910, CBS 136046, CBS 136047, CBS 136049), and *Lomentospora prolificans* (IMMI-1647) (Steinmann et al. 2011). Strains were supplied as living cultures, and subsequently propagated on Sabouraud's agar at 25 °C. For local long-term storage the strains were placed at -80 °C in cryobank tubes (Mast Diagnostica, Reinhold, Germany). Additionally we used a set of clinical testing isolates of *S. boydii* (IMMI-B-F90), *S. apiospermum* (IMMI-E-71 and IMMI-E-77), and *L. prolificans* (IMMI-1644, red; IMMI-1645, IMMI-1646, IMMI E78, and IMMI E79) (Steinmann et al. 2011).

Sample preparation and spectrum acquisition

Sample preparation followed the 'Fungi library' sample preparation protocol recommended by the manufacturer of the MALDI BioTyper (Bruker Daltonics, Bremen Germany). Briefly, a 5 ml liquid Sabouraud's medium culture (Oxoid, Wesel, Germany) was inoculated with a large amount of culture material scraped from an agar plate and grown on a turning wheel at 25 °C for 24 h yielding a high quantity of small mycelial balls. Mycelium from 1 ml was harvested by centrifugation at maximum speed in a conventional table top centrifuge, supernatant aspirated and the pellet washed with 70 % ethanol. After thorough drying, mycelium was suspended in 100 µl 70 % aqueous formic acid and incubated at room temperature for 30 min in a tube shaker at maximum shaking (180 rpm). To the lysate, 100 µl acetonitrile was added, the sample mixed thoroughly by vortexing and the debris removed by centrifugation. 1 µl of the supernatant was placed on a polished steel target (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), air dried and overlaid with 1 µl of saturated HCCA matrix solution (Bruker Daltonics) spiked with recombinant human insulin (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany) for internal calibration. Twelve mass spectra (technical replicates) of three biological replicates each were acquired using standard settings implemented in the MALDI BioTyper software on a Bruker Daltonics Autoflex III series instrument.

Generation of MALDI BioTyper database reference spectra

Low-quality mass spectra were eliminated manually and the remaining internally calibrated to the insulin mass peak (m/

z = 5806 Da). MSPs were generated using the standard settings implemented in the BioTyper software (tophat baseline correction, 80 % peak presence required for MSP inclusion). The insulin mass signal was manually removed from the MSPs.

Results and discussion

MALDI-ToF mass spectrometry of whole cell lysates, also called 'intact cell mass spectrometry (ICMS)', has found its way into clinical routine species identification over the past decade, replacing biochemical methods to a very large degree. This method relies on the generation of species-specific fingerprints that can be looked up in a custom-made database. Easy sample preparation, high-speed lasers and modern computers have advanced this to be the most effective method currently available. Initially mainly developed on human pathogenic bacteria, identification of commonly occurring yeasts [reviewed in (Bader 2013)] is routinely possible. In contrast, the identification of moulds is not yet a standard procedure. In part this is due to the fact, that the understanding of mould phylogeny is a highly fluctuating field and there is no generally accepted database. Therefore, MALDI-ToF-based mould species identification currently resides in the hands of experts for the particular fungal genus, leading to a diverse set of custom databases [e.g. (Erhard et al. 2008; Cassagne et al. 2011; Alshawa et al. 2012; De Carolis et al. 2012; Schrodler et al. 2012)].

MALDI-ToF mass spectrometry has recently also been shown to be able to recognize and discriminate the most important species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex using both the MALDI BioTyper (Coulibaly et al. 2011) or the Andromas (Sitterle et al. 2014) systems. Here, we have generated ten database references ('MSPs') for the species in the complex for use with the MALDI BioTyper adhering to the suggested novel nomenclature (Lackner et al. 2014). The references were internally validated using a jack-knife test and all correctly produced nearly 100 % score values >2.000 within their own species (*Lomentospora prolificans*, *Scedosporium aurantiacum*) and importantly no top-ranking false hits with the other respective four. In accordance with the proposed novel nomenclature, a clear distinction of isolates within the *S. apiospermum* complex (*S. apiospermum*, *S. boydii*, and potentially *Pseudallescheria ellipsoidea*, and *Pseudallescheria angusta*) was not possible using the MALDI BioTyper. Similarly, clustering of MSPs showed that *L. prolificans* was most distinct, while the MSPs of the other five species were more similar. This larger cluster could be further divided into two sub-clusters containing *Scedosporium boydii* and *P. ellipsoidea*, *Scedosporium apiospermum*, and *P. angusta* in one, *S. aurantiacum* in the other (Fig 1). The *Scedosporium/Pseudallescheria* identification ('SPID') mass spectrum dataset (distinguishing *L. prolificans*, *S. aurantiacum*, and the *S. apiospermum* complex) is available upon request for local integration into the MALDI BioTyper.

In analogy to DNA barcoding approaches where usually a divergent region of an rRNA gene is used for discrimination (e.g. the internal transcribed spacers separating the three different rRNAs), in bacteria the masses of highest intensity observed tend to correspond to ribosomal proteins as those are

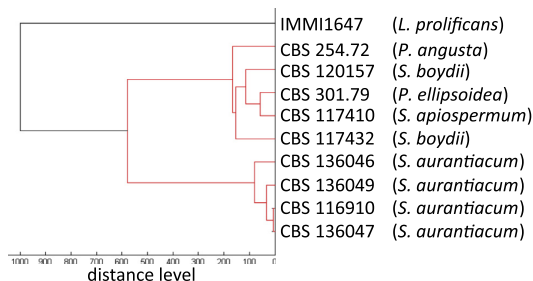


Fig 1 – Dendrogram showing distance levels of MSPs generated.

most abundant [e.g. (Teramoto et al. 2007; Suarez et al. 2013; Zautner et al. 2013)]. Ribosomal proteins are highly conserved throughout evolution, but still sufficiently divergent to allow differentiation of species.

In addition to the variation necessary to give rise to the clustering pattern, we also observed several clusters of highly abundant variable masses not only within the potentially divergent *S. apiospermum* complex (Fig 2C), but also among *S. aurantiacum* (Fig 2D) isolates, indicating a certain degree of

variability within both groups. Major masses within the *L. prolificans* isolates used here were generally invariant (Fig 2B). Mass differences can be measured after internal calibration (Fig 2A). Under the hypothesis that the different masses of a group represented highly conserved orthologous proteins in different isolates, we can assume that the variations in mass are due to specific amino acid exchanges. From these mass differences amino acid exchanges can be postulated, namely S↔N or T↔K for 27 Da, A↔T, G↔S, or R↔W for 30 Da, G↔E for 72 Da, M↔R for 25 Da, or I/L↔M for 18 Da. Unfortunately, the only available *Scedosporium* complex genome sequence [draft of *S. apiospermum* (Vandeputte et al. 2014)] did not contain any masses which corresponded to the measured masses in this study (data not shown). In the absence of well annotated genome sequences it is difficult to identify the underlying genes from their measured mass only, currently preventing experimental verification of the substitutions. Nevertheless, as more genomes are becoming available at increasing pace, and it should be possible to connect observed masses with encoding genes in the future. Groups of such masses with known identity could be used as 'proteomic barcodes', directly connecting mass spectra to available sequence data including environmental metagenomes. Eventually this might even lead to species identification of isolates by MALDI-ToF for which no reference entry in the database is present, by correlating the respective

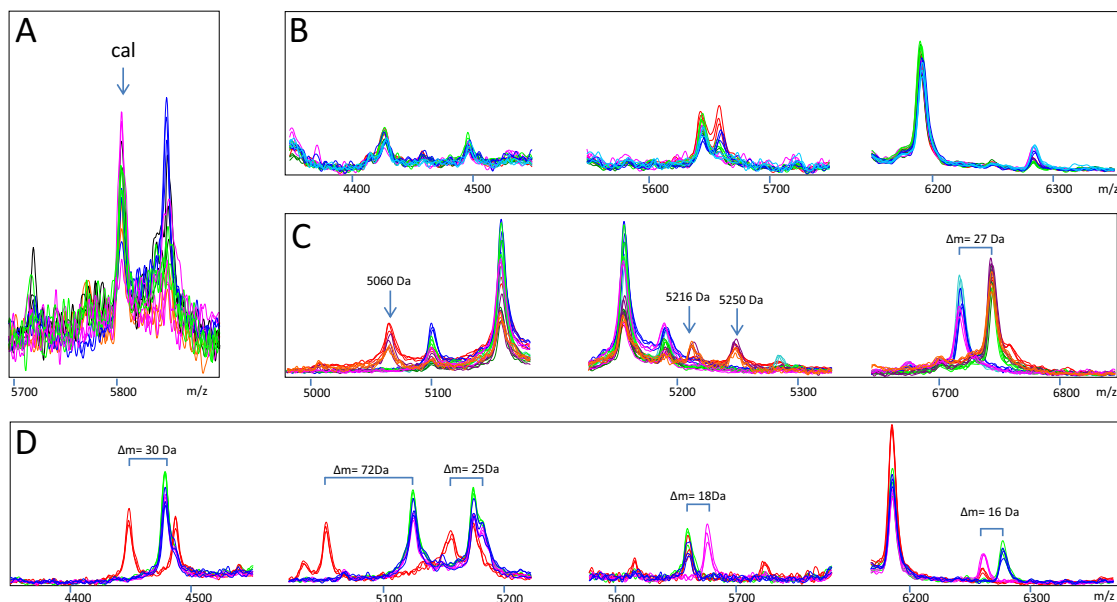


Fig 2 – Major 'barcoding' mass peaks. (A) Insulin calibration peak showing alignment of mass spectra after internal calibration. Overlaid subsections of three technical replicated mass spectra each: (B) *S. aurantiacum* (CBS 116910, light green; CBS 136046, red; CBS 136047, pink; CBS 136049, blue), (C) *S. apiospermum* complex (*S. apiospermum* CBS 117410, red; *S. boydii* CBS 117432, light blue; *S. boydii* CBS 120157, dark blue; *P. angusta* CBS 245.72, dark green; *P. ellipsoidea* CBS 301.79, light blue; IMMI-BF90, purple; IMMI-E71, pink; IMMI-E77, orange), and (D) *L. prolificans* (IMMI-1644, red; IMMI-1645, dark green; IMMI-1646, pink; IMMI-1647, light green; IMMI-1648, dark blue; IMMI-1649, light blue).

experimental barcode to in silico barcodes calculated from genome sequence data.

Authors contributions

Conceived the study: OB. Performed experiments and evaluated the data: MB, AEZ, OB. Contributed strains: JS. Wrote the manuscript: MW, UG, OB.

Conflict of interest

None declared.

Acknowledgements

We would like to acknowledge expert technical assistance from Agnieszka Goretzki and Irmina Szymczak.

REFERENCES

- Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL, 2007. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 748–751.
- Alshawa K, Beretti JL, Lacroix C, Feuilhade M, Dauphin B, Quesne G, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME, 2012. Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 2277–2281.
- Babady NE, Miranda E, Gilhuley KA, 2011. Evaluation of Luminex xTAG fungal analyte-specific reagents for rapid identification of clinically relevant fungi. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 3777–3782.
- Bader O, 2013. MALDI-TOF-MS-based species identification and typing approaches in medical mycology. *Proteomics* 13: 788–799.
- Buelow DR, Gu Z, Walsh TJ, Hayden RT, 2012. Evaluation of multiplexed PCR and liquid-phase array for identification of respiratory fungal pathogens. *Medical Mycology* 50: 775–780.
- Cassagne C, Ranque S, Normand AC, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, Hendrickx M, Piarroux R, 2011. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 6: e28425.
- Coulibaly O, Marinach-Patrice C, Cassagne C, Piarroux R, Mazier D, Ranque S, 2011. *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Medical Mycology* 49: 621–626.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G, 2012. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Microbiology and Infection* 18: 475–484.
- Erhard M, Hipler UC, Burmester A, Brakhage AA, Wostemeyer J, 2008. Identification of dermatophyte species causing onychomycosis and tinea pedis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Experimental Dermatology* 17: 356–361.
- Harun A, Blyth CC, Gilgado F, Middleton P, Chen SC, Meyer W, 2011. Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 1508–1512.
- Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF, 2012a. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 2635–2642.
- Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed S, Andreas F, Kaltseis J, Nagl M, Lass-Flörl C, Risslegger B, Rambach G, Speth C, Robert V, Buzina W, Chen S, Bouchara J-P, Cano-Lira J, Guarro J, Gené J, Fernández Silva F, Haido R, Haase G, Havlicek V, Garcia-Hermoso D, Meis J, Hagen F, Kirchmair M, Rainer J, Schwabenbauer K, Zoderer M, Meyer W, Gilgado F, Schwabenbauer K, Vicente V, Piecková E, Regenermel M, Rath P-M, Steinmann J, de Alencar X, Symoens F, Tintelnot K, Ulfig K, Velegriki A, Tortorano A, Giraud S, Mina S, Rigler-Hohenwarter K, Hernando F, Ramirez-Garcia A, Pellon A, Kaur J, Bergter E, de Meirelles J, da Silva I, Delhaes L, Alastruey-Izquierdo A, Li R-y, Lu Q, Moussa T, Almaghrabi O, Al-Zahrani H, Okada G, Deng S, Liao W, Zeng J, Issakainen J, Liporagi Lopes L, 2014. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity* 67: 1–10.
- Lackner M, Klaassen CH, Meis JF, van den Ende AH, de Hoog GS, 2012b. Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. *Medical Mycology* 50: 497–508.
- Schrodl W, Heydel T, Schwartz VU, Hoffmann K, Grosse-Herrenthey A, Walther G, Alastruey-Izquierdo A, Rodriguez-Tudela JL, Olias P, Jacobsen ID, de Hoog GS, Voigt K, 2012. Direct analysis and identification of pathogenic *Lichtheimia* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight analyzer-mediated mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 419–427.
- Sitterle E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, Dauphin B, Angebault C, Quesne G, Beretti JL, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME, 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clinical Microbiology and Infection* 20: 929–935.
- Steinmann J, Schmidt D, Buer J, Rath PM, 2011. Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semiautomated repetitive sequence-based PCR. *Medical Mycology* 49: 475–483.
- Suarez S, Ferroni A, Lotz A, Jolley KA, Guerin P, Leto J, Dauphin B, Jamet A, Maiden MC, Nassif X, Armengaud J, 2013. Ribosomal proteins as biomarkers for bacterial identification by mass spectrometry in the clinical microbiology laboratory. *Journal of Microbiological Methods* 94: 390–396.
- Teramoto K, Sato H, Sun L, Torimura M, Tao H, Yoshikawa H, Hotta Y, Hosoda A, Tamura H, 2007. Phylogenetic classification of *Pseudomonas putida* strains by MALDI-MS using ribosomal subunit proteins as biomarkers. *Analytical Chemistry* 79: 8712–8719.
- Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, Thornton C, Delhaes L, Meyer W, Papon N, Bouchara JP, 2014. Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announcements* 2.
- Zautner AE, Masanta WO, Tareen AM, Weig M, Lugert R, Gross U, Bader O, 2013. Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC Microbiology* 13: 247.
- Zeng JS, Fukushima K, Takizawa K, Zheng YC, Nishimura K, Graser Y, De Hoog GS, 2007. Intraspecific diversity of species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Medical Mycology* 45: 547–558.

8.2.1. Bekannte Zitierungen dieses Artikels, (Stand Juni 2022)

- Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Rementeria, A., Buldain, I., Barreto-Bergter, E., Rollin-Pinheiro, R., De Meirelles, J.V., Xisto, M.I.D., Ranque, S., Havlicek, V. and Vandeputte, P., 2018. *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Medical mycology*, 56(suppl_1), pp.S102-S125.
- Zvezdanova, M.E., Escribano, P., Ruiz, A., Martínez-Jiménez, M.C., Peláez, T., Collazos, A., Guinea, J., Bouza, E. and Rodríguez-Sánchez, B., 2019. Increased species-assignment of filamentous fungi using MALDI-TOF MS coupled with a simplified sample processing and an in-house library. *Medical mycology*, 57(1), pp.63-70.
- Mello, T.P., Bittencourt, V.C.B., Liporagi-Lopes, L.C., Aor, A.C., Branquinha, M.H. and Santos, A.L., 2019. Insights into the social life and obscure side of *Scedosporium/Lomentospora* species: ubiquitous, emerging and multidrug-resistant opportunistic pathogens. *Fungal Biology Reviews*, 33(1), pp.16-46.
- Hahn, A., Podbielski, A., Meyer, T., Zautner, A.E., Loderstädt, U., Schwarz, N.G., Krüger, A., Cadar, D. and Frickmann, H., 2020. On detection thresholds—a review on diagnostic approaches in the infectious disease laboratory and the interpretation of their results. *Acta tropica*, 205, p.105377.
- Ulrich, S., Biermaier, B., Bader, O., Wolf, G., Straubinger, R.K., Didier, A., Sperner, B., Schwaiger, K., Gareis, M. and Gottschalk, C., 2016. Identification of *Stachybotrys* spp. by MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(27), pp.7565-7581.
- Chen, S.C.A., Halliday, C.L., Hoenigl, M., Cornely, O.A. and Meyer, W., 2021. *Scedosporium* and *Lomentospora* Infections: Contemporary Microbiological Tools for the Diagnosis of Invasive Disease. *Journal of Fungi*, 7(1), p.23.
- Luna-Rodríguez, C.E., Treviño-Rangel, R.D.J., Montoya, A.M., Becerril-García, M.A., Andrade, Á. and González, G.M., 2019. *Scedosporium* spp.: Chronicle of an emerging pathogen. *Medicina Universitaria*, 21(1), pp.4-13.
- Costa, S.F. and Alexander, B.D., 2017. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of *Scedosporium* and *Lomentospora* infections. *UpToDate*. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com> (Accessed on August 11, 2018.).

Bronnimann, D., Dromer, F., Garcia-Hermoso, D. and Lanternier, F., 2018, June. "SOS": the Nationwide French Scedosporiosis Observational Study (2005-2017). MEDICAL MYCOLOGY, Vol. 56, 73

8.3. Bernhard et al 2021, frontiers...



OPEN ACCESS

Edited by:

Di Xiao,
National Institute for Communicable
Disease Control and Prevention
(China CDC), China

Reviewed by:

Bryan Schmitt,
Indiana University Bloomington,
United States
Volker Rickerts,
Robert Koch Institute (RKI), Germany

*Correspondence:

Oliver Bader
oliver.bader@med.uni-goettingen.de

[†]Present address:

Navaporn Worasilchai,
Department of Transfusion Medicine
and Clinical Microbiology, Faculty of
Allied Health Sciences, Chulalongkorn
University, Bangkok, Thailand

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 27 November 2020

Accepted: 30 March 2021

Published: 19 April 2021

Citation:

Bernhard M, Worasilchai N,
Kangogo M, Bii C, Trzaska WJ,
Weig M, Groß U, Chindamporn A and
Bader O (2021) CryptoType – Public
Datasets for MALDI-TOF-MS Based
Differentiation of *Cryptococcus*
neoformans/gattii Complexes.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:634382.
doi: 10.3389/fcimb.2021.634382

CryptoType – Public Datasets for MALDI-TOF-MS Based Differentiation of *Cryptococcus* *neoformans/gattii* Complexes

Mareike Bernhard¹, Navaporn Worasilchai^{2†}, Mourine Kangogo³, Christine Bii⁴,
Wioleta J. Trzaska⁵, Michael Weig¹, Uwe Groß¹, Ariya Chindamporn² and Oliver Bader^{1*}

¹ Institute for Medical Microbiology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany, ² Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand, ³ Department of Medical Microbiology, Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, Nairobi, Kenya, ⁴ Center for Microbiology Research, Mycology Laboratory, Kenya Medical Research Institute, Nairobi, Kenya, ⁵ School of Biosciences, Institute of Microbiology and Infection, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

Yeasts of the *Cryptococcus neoformans/gattii* species complexes are human pathogens mostly in immune compromised individuals, and can cause infections from dermal lesions to fungal meningitis. Differences in virulence and antifungal drug susceptibility of species in these complexes indicate the value of full differentiation to species level in diagnostic procedures. MALDI-TOF MS has been reported to sufficiently discriminate these species. Here, we sought to re-evaluate sample pre-processing procedures and create a set of publicly available references for use with the MALDI Biotyper system. Peak content using four different pre-processing protocols was assessed, and database entries for 13 reference strains created. These were evaluated against a collection of 153 clinical isolates, typed by conventional means. The use of decapsulating protocols or mechanical disruption did not sufficiently increase the information content to justify the extra hands-on-time. Using the set of 13 reference entries created with the standard formic acid extraction, we were able to correctly classify 143/153 (93.5%) of our test isolates. The majority of the remaining ten isolates still gave correct top matches; only two isolates did not give reproducible identifications. This indicates that the log score cut-off can be lowered also in this context. Ease to identify cryptococcal isolates to the species level is improved by the workflow evaluated here. The database references are freely available from <https://github.com/oliverbader/BioTyper-libraries> for incorporation into local diagnostic systems.

Keywords: MALDI-TOF MS, identification, capsule, *Cryptococcus neoformans* complex, *Cryptococcus gattii* complex

INTRODUCTION

The group of basidiomycetous yeast of the *Cryptococcus neoformans/gattii* complexes hosts a variety of human pathogenic species, causing infections from skin lesions to fatal meningitis [reviewed in (Kronstad et al., 2011)]. This mainly contributes to morbidity and mortality in patients with underlying immune deficiencies (e.g. HIV), but can also affect immunocompetent hosts. Species of the *C. neoformans/gattii* complexes are readily found in the environment, living, for example, on eucalyptus tree bark, and bird droppings.

The most prominent diagnostic feature of these species are the large capsules of most isolates [reviewed in (O'Meara and Alspaugh, 2012)], which can easily be visualized by, e.g., displacement of India ink stain. India ink does not penetrate the capsule and thus creates a halo around the cells visible in microscopy. The polysaccharides shed from the cell also give rise to efficient and specific serologic tests of cryptococcal infections through serum detection of galactomannan.

Species in this complex have traditionally been divided into four serotypes based on antigenicity of the capsule, forming three varieties: *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), var. *gattii* (serotypes B and C), and var. *neoformans* (serotype D). They are also able to form inter-species hybrids leading to, e.g., an AD serotype (Boekhout et al., 2001). Several genetic methods are available to stratify the different serotypes into further molecular types (Meyer et al., 2003) and characterize hybrid strains. Recently, it has been proposed to formally raise the non-hybrid molecular types to species level (Kwon-Chung et al., 2002; Hagen et al., 2015) and a fifth *C. gattii* lineage has recently been described (Farrer et al., 2019) from environmental and animal specimen.

In clinical samples from Europe most frequently serotype A is found, mainly from immunocompromised patients, e.g. those suffering from AIDS (Kronstad et al., 2011). Highly virulent isolates usually stem from the *C. gattii* complex, which also readily infect immuno-competent hosts. Differences in mean antifungal susceptibility between closely related molecular types have been reported (Trilles et al., 2012; Cogliati et al., 2018; Lee et al., 2019) and *in vitro* differences in cytokine responses (Herkert et al., 2018). Some molecular types, mainly VGII and VGIII, are more prone to be involved in outbreak scenarios (Kidd et al., 2004; Carriconde et al., 2011; Springer et al., 2014). A major difference between *C. neoformans* and *C. gattii* groups is the lack of growth inside macrophages among *C. gattii* isolates, with the notable exception of such outbreak lineages (Voelz et al., 2014).

Together this underlines the benefit of methods easily discriminating between the major molecular types, not only in clinical contexts, but also for epidemiological studies which so far rely on laborious genetic typing [e.g. our own work (Tangwattanachuleeporn et al., 2013; Kangogo et al., 2015; Worasilchai et al., 2017) or others (Fang et al., 2020; Jin et al., 2020)]. MALDI-TOF MS has been established over the past years as a widely used clinical species identification tool and has been shown to be able to discriminate between the seven known molecular types within the *C. neoformans/gattii* complexes (McTaggart et al., 2011; Firacative et al., 2012; Posteraro et al., 2012; Hagen et al., 2015). For

C. gatti and *C. deuterogattii* differential mass peaks have been described (Jin et al., 2020).

However, this has not been implemented in diagnostic systems, which remain at the point where only *C. neoformans* var. *neoformans/grubii* vs. *C. gattii* complexes can be identified. In part, this may be due to the observation that false species designations above the significance threshold can be observed (Posteraro et al., 2012), and reflect the complexity introduced by hybrid formation between the different lineages.

In this study, we created a publicly available MALDI Biotyper database reference ("main spectrum projections", MSPs) set from 13 type strains of seven recognized non-hybrid subtypes in the *Cryptococcus neoformans/gattii* complexes. Their performance using different preprocessing protocols is evaluated on a set of characterized isolates.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Strains and Culture Conditions, Chemicals

For long-term storage, *Cryptococcus* isolates were kept at -70°C in cryobank stocks (Mast Diagnostica, Reinfeld, Germany). After thawing, strains were propagated on Sabouraud's (SAB) agar slants supplemented with 0.5% peptone (casein), 0.5% peptone (meat), and 2% glucose. Before sample preparation, strains were cultivated on SAB agar overnight at 30°C.

For the purpose of text clarity, only the species nomenclature according to Hagen et al. (Hagen et al., 2015) is adopted from here. As references, thirteen strains of the CBS collection (Westerdijk Fungal Biodiversity Institute) were used: three *C. neoformans* (CBS 8710 (molecular type VNI), CBS 10084 (VNII), CBS 10085 (VNI)), two *C. deneoformans* (CBS 6900 and CBS 10079 (VNIV)), two *C. gattii* (CBS 6289, and CBS 10078, VGI), two *C. deuterogattii* (CBS 10082, and CBS 10514, VGII) two *C. bacillisporus* (CBS 6955 and CBS 10081, VGIII), one *C. tetragattii* (CBS 10101, VGIV), and *C. decagattii* (CBS 11687, VGIV).

A test set of 153 isolates was assembled from previously characterized collections. This included all Thai strains from Worasilchai et al. (2017), augmented with rare species isolates from Kenya (Kangogo et al., 2015) and the Birmingham laboratory collection, which include strain from various studies [e.g. (Voelz et al., 2014)]. All isolates were typed either previously (Kangogo et al., 2015; Worasilchai et al., 2017) or specifically for the purpose of this study using the *URA5*-RFLP method. The final set contained n=96 *C. neoformans*, n=6 *C. deneoformans*, n=5 *C. gattii*, n=18 *C. bacillisporus*, n=20 *C. deuterogattii*, and n=8 *C. tetragattii* isolates. A negative control group was assembled from mass spectra randomly chosen from those obtained during bacterial (n=86) of fungal (n=403) routine diagnostics.

URA5-RFLP

Restriction fragment length polymorphisms were performed as described previously (Kangogo et al., 2015; Worasilchai et al., 2017). Briefly, genomic DNA was extracted from cells using phenol/chloroform and the *URA5* gene was amplified using

URA5 forward (5-ATGTCCTCCCAAGCCCTCGACTCCG-3) and SJ01 reverse (5-TTAAGACCTCTGAACACCGTACTC-3) primers (Meyer et al., 2003). The amplicons obtained were either simultaneously digested with HhaI (20 U/ μ l) and Sau96I (10 U/ μ l) or StuI (10 U/ μ l) alone for 8 hours (all from New England Biolabs). The digestion products were purified using a PCR clean-up kit (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Düren, Germany) and visualized on a 3% agarose gel.

MALDI-TOF MS Preprocessing Protocols

For regular harvest and formic acid-extraction [preprocessing protocol (A) (Bader, 2017)], cells were taken from agar plates by scraping approximately a 1 μ l loop full of cells and re-suspending them in 300 μ l water. 700 μ l absolute ethanol was added to a final concentration of 70% (v/v) and vortexed. Cells were spun down at 8500xg for 5 min, the supernatant completely discarded and the cells lysed first with 50 μ l 70% (v/v) formic acid, and 50 μ l pure acetonitrile. Modifications to this protocol tested were for preprocessing protocol (B) that cells were collected in 300 μ l 5% (v/v) DMSO_{ad}; for preprocessing protocol (C) that DMSO was included in the 70% ethanol washing step to a final volume of 5% (v/v), and for preprocessing protocol (D) that cells were collected in 300 μ l water already including an equivalent of ~100 μ l glass beads (0.5 mm diameter, Roth, Karlsruhe, Germany). Here, cells were mechanically disrupted in a FP120 fast prep machine (Bio101, Thermo Savant) at setting 4, for 30 sec during the formic acid step.

Generation of MALDI Biotyper Database References

MSP references for the MALDI Biotyper were generated according to the manufacturer's guidelines (Kostrzewa and Maier, 2017), using preprocessing protocol A. Spectra from 24 individual spots were gathered on a freshly calibrated (BTS reference standard) Autoflex III system (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) using the automated acquisition mode of the Biotyper 3.1. Spectra were processed using the inbuilt MSP generation method, using the standard parameters.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Optimization

The literature reports that both, removal of cryptococcal capsule can (Thomaz et al., 2016) or does not (Hagen et al., 2015) positively influence spectrum quality. Since the capsule material is soluble in DMSO, we devised pre-processing protocols that would deplete the capsule prior to the regular formic acid/ acetonitrile extraction protocol. Both pre-processing protocols, B (Figures 1A, B) and C (not shown), efficiently removed capsules in all strains. However, subsequent measurement of mass spectra did not reveal any additional mass signals, or major differences in spectrum quality (Figure 1C).

Next, we tested if mechanical disruption of the cells yielded more informative spectra using mechanical disruption (preprocessing protocol D). Indeed, mass spectra recorded from mechanically disrupted cells resulted in more evenly distributed peak intensities

across the major mass signals. However, no additional mass signals of high intensity were found (Figure 1D).

In our hands removal of the capsule did not result in spectra with higher information content, at any time. Mechanical disruption did reveal some additional masses, but in favor of the lower hands-on-time the original pre-processing protocol A was subsequently used for MSP creation and testing.

Creation of Single Species MSPs

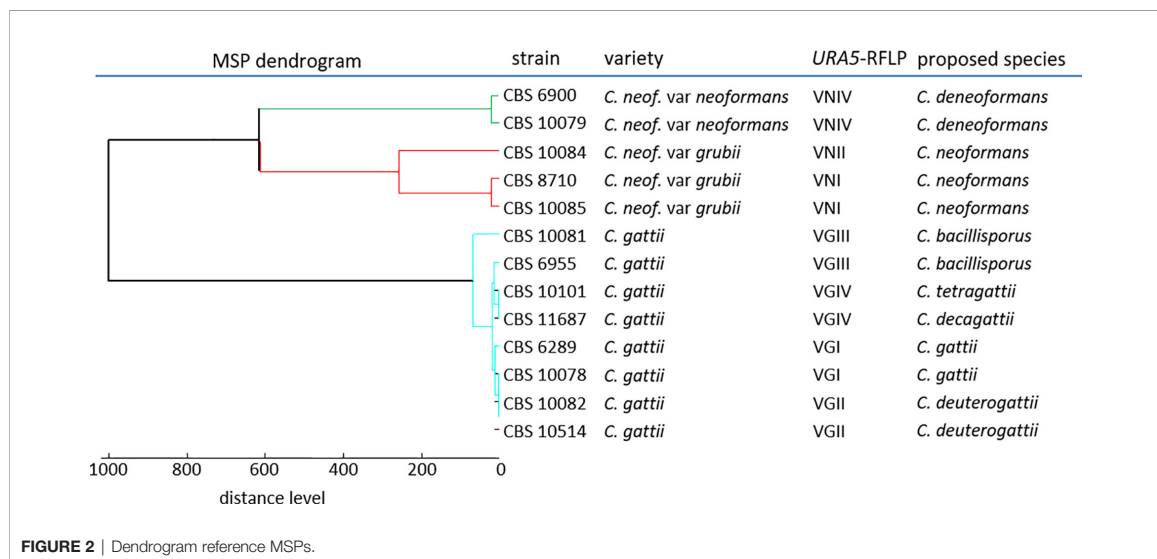
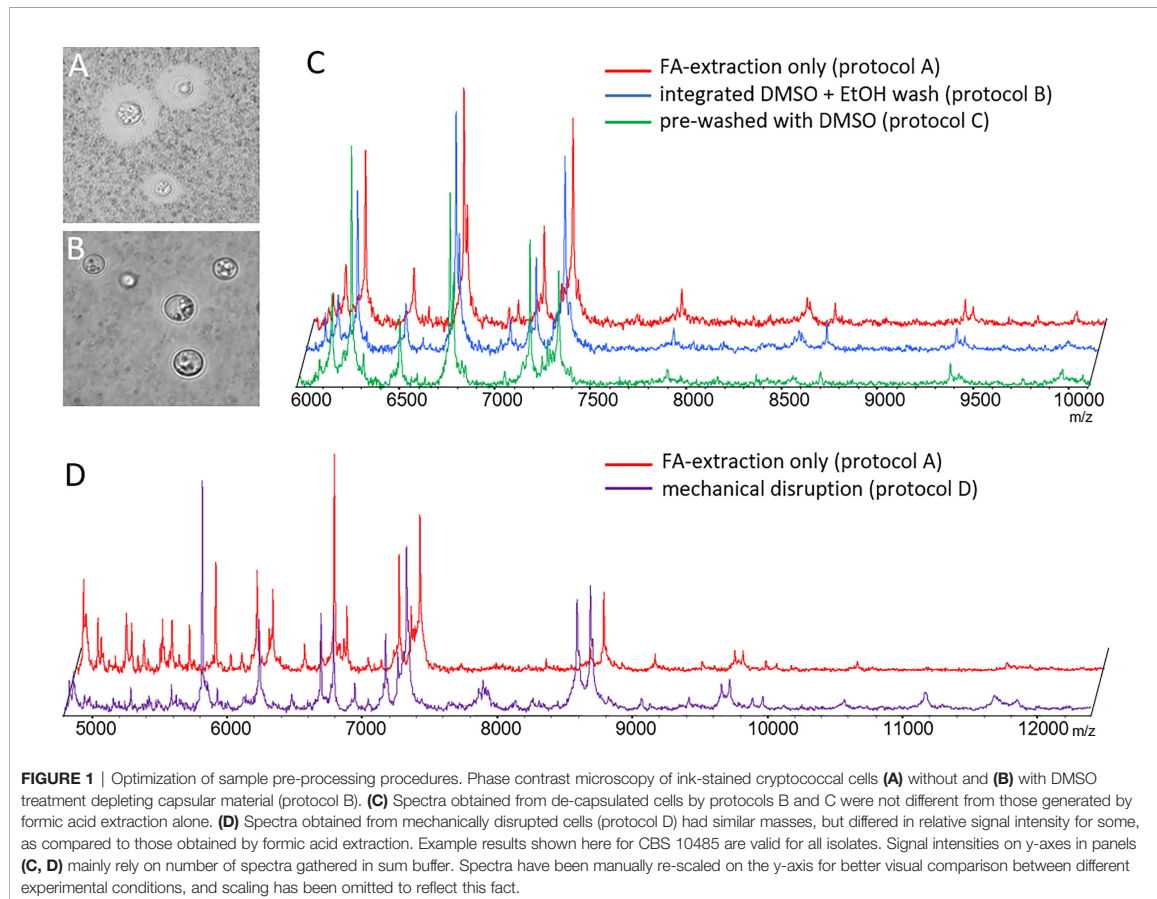
Next, we created MSPs for 13 reference strains encompassing seven molecular types of the *C. neoformans/gattii* complexes (Meyer et al., 2003; Hagen et al., 2015), using the standard extraction procedure (pre-processing protocol A). Cluster analysis of the MSPs generated suggested sufficient distance to clearly distinguish between *C. neoformans* complex molecular types VNIV (*C. deneoformans*) and VNI/II, and possibly also between VNI and VNII themselves, but less so among molecular types within the *C. gattii* complex (Figure 2).

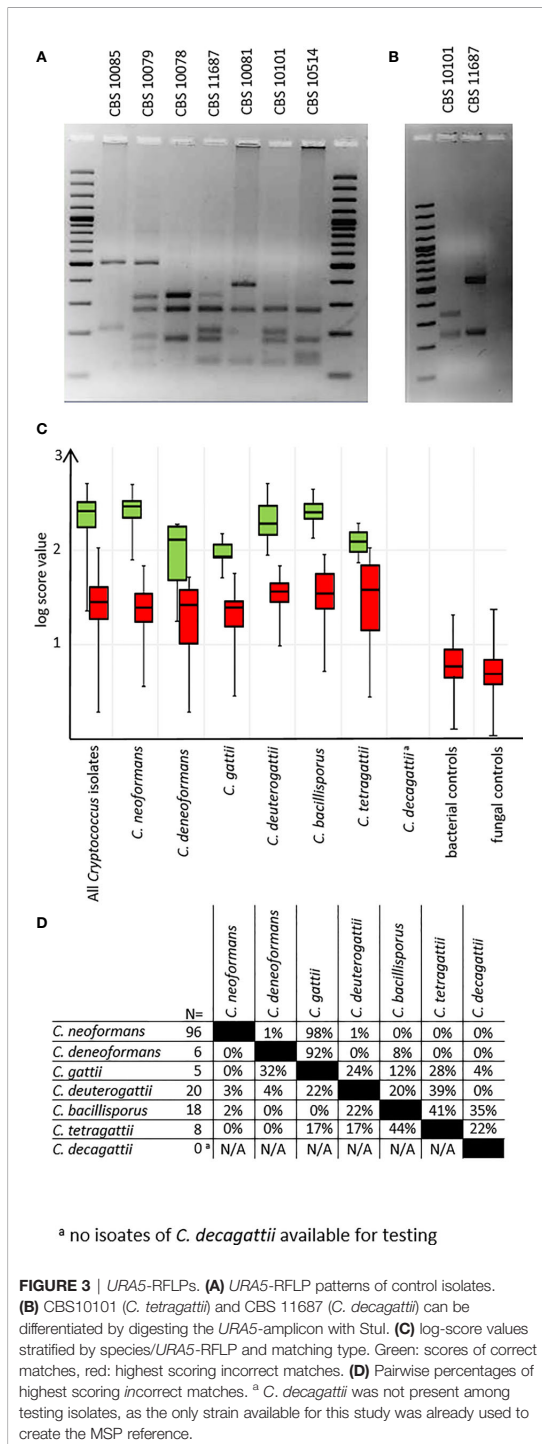
Identification Performance

Mass spectra for all test isolates were obtained using preprocessing protocol A. Were MALDI-TOF results using the new MSP set deviated from previous data, URA5-RFLP typing was repeated as the gold standard (Figure 3A). All but two deviations could be resolved (see below). To discriminate between *C. tetragattii* and potential *C. decagattii* strains, we sequenced the URA5-amplicon obtained from CBS 11687 (*C. decagattii*, deposited at GenBank under the accession number MH605184) and compared it to the respective sequence of CBS 10101 (*C. tetragattii*, gene bank accession AY973155). Restriction with StuI was found, and experimentally confirmed, to discriminate the two species (Figure 3B). However, there were no further *C. decagattii* isolates among our strains. *C. decagattii* remains a rare species, and only a single isolate of this molecular type (CBS 11687) was available for this study, which was already included in the reference set. Therefore, the final test collection encompassed only six of the seven species used for generation of references.

From the test collection, we were able to correctly identify 143/153 (93.5%) of the isolates on species-level using duplicate spots, with the top log score ≥ 2.000 (Figure 3C), as recommended by the manufacturer. Of the remaining ten isolates, eight still gave correct species matches at scores between 1.700 and 1.999, considered only genus-level by the manufacturer. Among the negative control set, there were no results higher than a log score of 1.300, indicating no false positives are to be expected under routine diagnostic conditions (Figure 3C). Inconsistent identifications were only observed for two *C. tetragattii* isolates where repetitively top matches of different spots of the same preparation were *C. tetragattii*, *C. gattii*, or *C. deuterogattii*, all at values above 1.999.

Because of this, and the close relations found during cluster analysis (Figure 2), we also inspected the log score difference from the correct to the highest scoring false match for each spot (Figure 3D) for those tests where a second species matched above the significance threshold. Only 3% of all tested spots (14 out of 428) matched a second MSP with a log score >1.999 . As expected from the cluster analysis, these "best false" second matches were found only among species in the *C. gattii*





complex. This was the case for three *C. bacillisporus* isolates giving a second best match with *C. decagattii*, with a log score difference between 0.1 to 0.4. In addition to the two inconsistent *C. tetragattii* isolates discussed above, one additional *C. tetragattii* isolate also gave a second best match with *C. decagattii*. The score values for both matches were near 2.000. The close relationships of the different species will likely also have implications on properly identifying hybrid isolates.

CONCLUSION

Cryptococcal typing and species identification is complicated by the ongoing discovery of new species (Farrer et al., 2019), and the formation of inter-species hybrids (Hagen et al., 2015). Nevertheless, our data confirms that proper routine identification of clinically relevant non-hybrid *C. neoformans/gattii* complex molecular types using MALDI-TOF is possible with the current algorithms and standard workflows. In our hands, the only exception was distinguishing the rarer types *C. tetragattii* and *C. decagattii*, which was not sufficiently possible. This may be due to the fact, that only low numbers of isolates of these lineages were available for testing.

The MSP sets generated in this study are freely available from <https://github.com/oliverbader/BioTyper-libraries> for use with the molecular type- (Meyer et al., 2003) or the species nomenclatures (Hagen et al., 2015).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Performed experiments: MB, NW, MK, OB. Contributed typed strains: NW, MK, CB, WT, AC. Wrote the manuscript: MB, AC, OB. Prepared the revision: MB, OB. Supervised the study: MW, UG, AC, OB. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study received funding from Thai-German mobility scheme “CryptoType” to AC and OB (grant number 01DP13001). Article publishing fees were covered by the Open-Access-publications funds of the Universitätsmedizin Göttingen.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Agnieszka Goretzki for expert technical assistance. This study was mainly funded by the Thai-German mobility scheme “CryptoType” to AC and OB.

REFERENCES

- Bader, O. (2017). Fungal Species Identification by MALDI-ToF Mass Spectrometry. *Methods Mol. Biol.* 1508, 323–337. doi: 10.1007/978-1-4939-6515-1_19
- Boekhout, T., Theelen, B., Diaz, M., Fell, J. W., Hop, W. C., Abeln, E. C., et al. (2001). Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 147, 891–907. doi: 10.1099/00221287-147-4-891
- Carriconde, F., Gilgado, F., Arthur, I., Ellis, D., Malik, R., Van De Wiele, N., et al. (2011). Clonality and alpha-a recombination in the Australian *Cryptococcus gattii* VGII population—an emerging outbreak in Australia. *PLoS One* 6, e16936. doi: 10.1371/journal.pone.0016936
- Cogliati, M., Prigitano, A., Esposito, M. C., Romano, L., Grancini, A., Zani, A., et al. (2018). Epidemiological trends of cryptococcosis in Italy: Molecular typing and susceptibility pattern of *Cryptococcus neoformans* isolates collected during a 20-year period. *Med. Mycol.* 56, 963–971. doi: 10.1093/mmy/myx152
- Fang, L. F., Zhang, P. P., Wang, J., Yang, Q., and Qu, T. T. (2020). Clinical and microbiological characteristics of cryptococcosis at a university hospital in China from 2013 to 2017. *Braz. J. Infect. Dis.* 24, 7–12. doi: 10.1016/j.bjid.2019.11.004
- Farrer, R. A., Chang, M., Davis, M. J., Van Dorp, L., Yang, D. H., Shea, T., et al. (2019). A New Lineage of *Cryptococcus gattii* (VGV) Discovered in the Central Zambesian Miombo Woodlands. *mBio* 10 (6), e02306-19. doi: 10.1128/mBio.02306-19
- Firacative, C., Trilles, L., and Meyer, W. (2012). MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS One* 7, e37566. doi: 10.1371/journal.pone.0037566
- Hagen, F., Khayhan, K., Theelen, B., Kolecka, A., Polacheck, I., Sionov, E., et al. (2015). Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet. Biol.* 78, 16–48. doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.009
- Herkert, P. F., Dos Santos, J. C., Hagen, F., Ribeiro-Dias, F., Queiroz-Telles, F., Netea, M. G., et al. (2018). Differential In Vitro Cytokine Induction by the Species of *Cryptococcus gattii* Complex. *Infect. Immun.* 86 (4), e00958-17. doi: 10.1128/IAI.00958-17
- Jin, L., Cao, J. R., Xue, X. Y., Wu, H., Wang, L. F., Guo, L., et al. (2020). Clinical and microbiological characteristics of *Cryptococcus gattii* isolated from 7 hospitals in China. *BMC Microbiol.* 20, 73. doi: 10.1186/s12866-020-01752-4
- Kangogo, M., Bader, O., Boga, H., Wanyoike, W., Folba, C., Worasilchai, N., et al. (2015). Molecular types of *Cryptococcus gattii/Cryptococcus neoformans* species complex from clinical and environmental sources in Nairobi, Kenya. *Mycoses* 58, 665–670. doi: 10.1111/myc.12411
- Kidd, S. E., Hagen, F., Tschärke, R. L., Huynh, M., Bartlett, K. H., Fyfe, M., et al. (2004). A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17258–17263. doi: 10.1073/pnas.0402981101
- Kostrzewa, M., and Maier, T. (2017). “Criteria for Development of MALDI-TOF Mass Spectral Database,” in *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology, one ed.* Eds. H. N. Shah and S. E. Garbia (Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons Ltd), 39–54.
- Kronstad, J. W., Attarian, R., Cadieux, B., Choi, J., D’souza, C. A., Griffiths, E. J., et al. (2011). Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 193–203. doi: 10.1038/nrmicro2522
- Kwon-Chung, K. L., Boekhout, T., Fell, J. W., and Diaz, M. (2002). Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. honduricus* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremonomycetidae). *Taxon* 51, 804–806. doi: 10.2307/1555045
- Lee, G. A., Arthur, I., Merritt, A., and Leung, M. (2019). Molecular types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in Western Australia and correlation with antifungal susceptibility. *Med. Mycol.* 57 (8), 1004–1010. doi: 10.1093/mmy/myy161
- McTaggart, L. R., Lei, E., Richardson, S. E., Hoang, L., Fothergill, A., and Zhang, S. X. (2011). Rapid identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3050–3053. doi: 10.1128/JCM.00651-11
- Meyer, W., Castaneda, A., Jackson, S., Huynh, M., Castaneda, E. Iberoamerican Cryptococcal Study Group (2003). Molecular typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 189–195. doi: 10.3201/eid0902.020246
- O’Meara, T. R., and Alspaugh, J. A. (2012). The *Cryptococcus neoformans* capsule: a sword and a shield. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 387–408. doi: 10.1128/CMR.00001-12
- Posteraro, B., Vella, A., Cogliati, M., De Carolis, E., Florio, A. R., Posteraro, P., et al. (2012). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Method for Discrimination between Molecular Types of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2472–2476. doi: 10.1128/JCM.00737-12
- Springer, D. J., Billmyre, R. B., Filler, E. E., Voelz, K., Pursall, R., Mieczkowski, P. A., et al. (2014). *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. *PLoS Pathog.* 10, e1004285. doi: 10.1371/journal.ppat.1004285
- Tangwattanachuleeporn, M., Somporn, P., Poolpol, K., Gross, U., Weig, M., and Bader, O. (2013). Prevalence and Antifungal Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* Isolated from Pigeon Excreta in Chon Buri Province, Eastern Thailand. *Med. Mycol. J.* 54, 303–307. doi: 10.3314/mmj.54.303
- Thomaz, D. Y., Grenfell, R. C., Vidal, M. S., Giudice, M. C., Del Negro, G. M., Juliano, L., et al. (2016). Does the Capsule Interfere with Performance of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*? *J. Clin. Microbiol.* 54, 474–477. doi: 10.1128/JCM.02635-15
- Trilles, L., Meyer, W., Wanke, B., Guarro, J., and Lazera, M. (2012). Correlation of antifungal susceptibility and molecular type within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *Med. Mycol.* 50, 328–332. doi: 10.3109/13693786.2011.602126
- Voelz, K., Johnston, S. A., Smith, L. M., Hall, R. A., Idnurm, A., and May, R. C. (2014). ‘Division of labour’ in response to host oxidative burst drives a fatal *Cryptococcus gattii* outbreak. *Nat. Commun.* 5, 5194. doi: 10.1038/ncomms6194
- Worasilchai, N., Tangwattanachuleeporn, M., Meesilpavikkai, K., Folba, C., Kangogo, M., Gross, U., et al. (2017). Diversity and Antifungal Drug Susceptibility of *Cryptococcus* Isolates in Thailand. *Med. Mycol.* 55, 680–685. doi: 10.1093/mmy/myw130.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Bernhard, Worasilchai, Kangogo, Bii, Trzaska, Weig, Groß, Chindamporn and Bader. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

8.3.1. Bekannte Zitierungen dieses Artikels, (Stand Juni 2022)

Lizarazo, J. and Castañeda, E., 2022. Central Nervous System Cryptococcosis due to *Cryptococcus gattii* in the Tropics. *Current Tropical Medicine Reports*, pp.1-7.

Gutiérrez, J. O., 2022. Micosis en pacientes inmunocomprometidos. *Medicine-Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 3415-25.

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med Uwe Groß für seine Unterstützung bei meiner Arbeit und der schnellen und positiven Rückmeldung in den letzten Wochen, die mich motiviert haben diese Arbeit zu Ende zu bringen.

Ich danke Prof. Dr. med Michael Weig mich zusammen mit Dr. Bader unterstützt zu haben.

Ich danke Frau Agnieszka Goretzki mich in den Laboralltag eingeführt zu haben. Ganz besonders danke ich ihr dafür, mir bei den Sequenzierungen, die mir nicht gelingen wollten, geholfen zu haben, sodass ich am Ende doch noch eine Genomsequenz vorliegen hatte.

Ich danke dem Team der klinischen Diagnostik der Medizinischen Mikrobiologie, die für mich die YOTL Datenbank in der Praxis getestet haben und deren Platz am MALDI-ToF Massenspektrometer ich oft besetzt habe.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei Dr. Oliver Bader, meinem Betreuer aus der Medizinischen Mikrobiologie, Mykologie für seine Unterstützung und Motivation bedanken. Dank ihm und seiner Hilfe konnte ich 2021 das Projekt „CryptoType“ mit der Publikation abschließen.

Ohne ihn hätte ich diese Dissertation neben meiner Arbeit und meinem familiären Alltag nicht zu Ende gebracht. Einen besseren Betreuer hätte ich nicht haben können und ich bin froh, dass ich bei ihm und mit ihm meine Arbeit schreiben durfte.

Lebenslauf

Mein Name ist Mareike Bernhard und ich wurde am 30.06.1989 als Älteste von fünf Kindern in Koblenz geboren. Von 1992 bis 1995 verbrachte ich meine Kindheit in Ndanda, einem kleinen Ort im Süden von Tansania, in dem mein Vater als Arzt in einem Krankenhaus arbeitete. Dort besuchte ich den lokalen Kindergarten und lernte die Landessprache Kiswahili fließend sprechen. Zu meiner Einschulung zog ich mit meiner Familie wieder nach Koblenz.

Ich besuchte von 1995 bis 1999 die Grundschule Moselweiß und wechselte 1999 auf das altsprachliche Görres Gymnasium in Koblenz. Hier lernte ich als weitere Fremdsprachen Latein, Englisch und Französisch. In meiner Schulzeit engagierte ich mich als Mittelstufensprecherin und nahm an 3 Schüleraustauschen teil, unter anderem an einem privaten Austausch über drei Monate nach Lausanne, den französischsprachigen Teil der Schweiz.

In der Oberstufe belegte ich die Leitungskurse Französisch, Mathematik und Kunst, welche meine breiten Interessen widerspiegelten. Ich schloss 2008 die Schule mit dem Abitur und einer Abiturnote von 1,8 ab.

Nach meinem Abitur entschied ich mich für einen Freiwilligendienst im Ausland und reiste mit dem DeD (Deutscher Entwicklungsdienst, heute Teil der GiZ, Gesellschaft für internationale Zusammenarbeit) für 12 Monate nach Malawi. Dort lebte ich zusammen mit 2 weiteren Freiwilligen in Chipunga, einem kleinen Dorf bei Mzuzu im Norden des Landes, und begleitete den dortigen Gesundheitsbeauftragten bei seinen Tätigkeiten. Darüber hinaus half ich bei der Arbeit auf der dortigen Kaffeefarm und legte mit einigen Frauen aus dem Dorf einen Heilpflanzengarten an.

Während dieser Zeit fasste ich den Entschluss, Medizin studieren zu wollen und bekam 2009 die Chance, mein Studium an der Universitätsklinik Göttingen zu beginnen. Nach meinem Physikum im Jahr 2011 entschloss ich mich, nochmals nach Ostafrika zu reisen, um dort zu arbeiten. Zur Vorbereitung dieses Auslandsaufenthaltes absolvierte ich die tropenmedizinische Sommerakademie in Würzburg.

Im September 2012 reiste ich für sechs Monate nach Bagamoyo in Tansania. Dort arbeitete ich im District Hospital auf dem neu erbauten Premature Cord für Frühgeborene. Ich hatte aber auch die Möglichkeit, die Arbeit im dortigen Krankenhaus zu begleiten und lernte die gesamte Krankenhausversorgung kennen. Dank eines deutschen Kinderarztes konnte ich den Lehrgang „helping babies breath“ mitbetreuen. Es wurden dabei ÄrztInnen und Krankenschwestern in der Reanimation von Neugeborenen geschult. Eine weitere Aufgabe fand ich in der privaten Klinik meiner tansanischen Gastmutter, die auf Mutter-Kind Gesundheit spezialisiert war. Hier begleitete ich die monatlichen Wachstumskontrollen sowie die Impfungen der Kinder, durfte jedoch auch bei Geburten dabei sein.

Zurück in Göttingen begann ich im Dezember 2013 meine Dissertation mit dem Thema „Verbesserung der MALDI-TOF-basierten Identifizierung humanpathogener Pilze durch die

Erstellung individueller Datenbanken“. Diese umfasst insgesamt drei Publikationen („Yeast On-Target Lysis (YOTL), a Procedure for Making Auxiliary Mass Spectrum Data Sets for Clinical Routine Identification of Yeasts“ 2014, „Towards proteomic species barcoding of fungi- an example using *Scedosporium* /*Pseudallescheria* genus isolates“ 2016, „CryptoType – datasets for MALDI-TOF based differentiation of *Cryptococcus neoformans/gattii* complex isolates“ 2021).

Nach meinem schriftlichen 2. Staatsexamen absolvierte ich mein praktisches Jahr (PJ) in der Neurophysiologie der Universitätsmedizin Göttingen, sowie in der Chirurgie und Inneren Medizin der Helios Klinik in Nordheim.

Im Mai 2016 beendete ich das Medizinstudium mit dem mündlichen Examen und begann im Dezember desselben Jahres in der Inneren Medizin am Krankenhaus der Augustinerinnen, Köln, zu arbeiten. Nur unterbrochen durch die Geburt meines ersten Kindes 2017 mit anschließender Elternzeit arbeitete ich hier bis zum Oktober 2019. Im Anschluss zog ich zusammen mit meiner Familie zurück in meine Heimatstadt Koblenz, wo ich seither in der gastroenterologischen Abteilung des Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Standort Kemperhof, arbeite.

Nach der Geburt meines zweiten Kindes 2020 arbeitete ich während der Elternzeit für 6 Monate in der hausärztlichen Gemeinschaftspraxis Dres. Bernhard. Hier konnte ich unter der Leitung meines Vaters das Arbeiten in einer Arztpraxis kennenlernen. Im Oktober 2021 habe ich nach Beendigung der Elternzeit wieder meine alte Stelle in der Gastroenterologie im Kemperhof aufgenommen. Da mir die Arbeit in der Hausarztpraxis viel Spaß gemacht hat, ist es perspektivisch mein Ziel, den Facharzt für Allgemeinmedizin zu erwerben und in die Praxis einzusteigen.