

**PROCEDURE DE VERIFICATION DE LA TECHNIQUE**

**ENSEMENCEMENT - CULTURE - RECONNAISSANCE DES COLONIES**

**EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :**

**Ensemencement – Culture – Reconnaissance des colonies.**

**Méthode qualitative PORTEE A**

## DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte/Mesurande :</b>	Echantillons biologiques de patients ou souche transmise
<b>Principe de la Mesure :</b>	Ensemencement sur milieux gélosés en fonction du type de prélèvement. Incubation des milieux à des températures différentes (30°C et/ou 35°C). Reconnaissance des colonies à partir d'une culture d'au moins 24h.
<b>Méthode de mesure :</b>	Méthode manuelle
<b>Unités :</b>	NA
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	PAR1
<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :</b>	<b>Cf annexe</b> : liste références et lots de tous les réactifs utilisés pour les tests de performance

<b>MISE EN ŒUVRE</b>	
<b>Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :</b>	Techniciens de Parasitologie Mycologie Biologiste : J.Guitard
<b>Procédure de validation :</b>  EP-SA-PA-MYCO-ANA-PG-002	<p>1-<u>Objet du document</u> Ensemencement des specimens biologiques d'origine humaine et souches transmises avec reconnaissance des colonies après culture d'au moins 24 h à 30°C et/ou 35°C (fonction du milieu utilisé).</p> <p>2-<u>Déroulement des tests de performance</u> Cf evaluation des performances</p> <p>3-<u>Conclusion</u> Cf évaluation des performances</p>
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	EP-HUEP-QUAL-SMQ-PG-007
<b>Période d'évaluation :</b>	2013
<b>Date de mise en service :</b>	Antérieure à la demande d'accréditation
<b>Autorisation de mise en service par :</b>	C.Hennequin

**MAITRISE DES RISQUES + 5M intégré**

**1 : criticité forte**

**2 : criticité moyenne**

**3 : criticité faible**

Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise	Criticité
<b>Type d'échantillon primaire :</b> culture levure à partir d'échantillon d'origine humaine	Echantillons multiples (urines, échantillons pulmonaires, selles, écouvillons, biopsies...) ou souche transmise	<b>Catalogue des Analyses</b> EP-SA-PA-PLUS-THEM-IT-001 <b>Manuel prélèvement</b> EP-HUEP-PRE-PRE-PG-003	1
<b>Prétraitement de l'échantillon</b>	Traitement différent en fonction de l'échantillon	<b>Modes opératoires techniques</b> EP-SA-PA-MYCO-ANA-DE-001/EP-SA-PA-MYCO-ANA-MT-001/EP-SA-PA-MYCO-ANA-MT-005/EP-SA-PA-MYCO-ANA-PT-004/EP-SA-PA-PLUS-ANA-IT-003/EP-SA-PA-PLUS-PRE-PG-001	2
<b>Main d'œuvre (habilitation du personnel)</b>	Personnel habilité	<b>Habilitation des techniciens</b> EP-SA-PA-CADRE-ORP-PG-003/EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-008/EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-009/EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-010/EP-SA-PA-PLUS-ORP-DE-014/EP-SA-PA-PLUS-POS-DE-001	1
<b>Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :</b>	Atmosphère stérile (travailler sous PSM)	<b>Entretien PSM</b> EP-SA-PA-EHS-THEM-DE-002	1
<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</b>	Date de péremption des milieux gélosés  Respect des conditions de stockage	<b>* Feuille de suivi des réactifs</b> <b>*Vérification des versions des fiches techniques fournisseurs</b> <b>*CQI au changement de lot</b> EP-SA-PA-PLUS-GDA-PG-001/EP-SA-PA-PLUS-GDA-DE-005/EP-SA-PA-PLUS-GDA-DE-008/EP-SA-PA-PLUS-GDA-PG-001/EP-SA-PA-PLUS-ANA-MT-001	1
<b>Matériau de référence :</b> Souches de contrôle	Souches ATCC (CQI) <i>C.albicans</i> ATCC 90028 <i>C.krusei</i> ATCC 6258 <i>C.parapsilosis</i> ATCC 22019	Préparation/Contrôle/Conservation souches (CQI) CQI pour chaque nouveau lot de Chromagar.	1
<b>Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques</b>	PSM /Centrifugeuse/réfrigérateurs/congérateurs /étuves (cf. liste en annexe)	Entretien Page 4 sur 17 Recolement sur sonde et suivi métrologique des enceintes thermo-statiques	1

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### Contrôle interne de qualité : souches ATCC

Les souches ATCC sont repiquées une fois par semaine sur SCG et sur Chromagar pour l'identification par spectrométrie de masse et sur les milieux de culture en cas de changement de lot.

### Contrôle externe de qualité :

CTCB (3 contrôles par an dont un échantillon=souche de mycologie à ensemercer)  
UKNEQAS (3 contrôles par an pour l'antifongogramme)

### **SPECIFICITE & SENSIBILITE DIAGNOSTIQUES**

ChromAgar (BD) sensibilité 99% Spécificité 99%

### BIBLIOGRAPHIE :

(1) données fournisseur

(2) Odds F. Chromagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species.  
Journal of Clinical Microbiology, 1994, 1923-1929

### **CONTAMINATION**

Non applicable

### **COMPARAISON DE METHODES**

Non applicable

## RECONNAISSANCE DES COLONIES par différents opérateurs

L'ensemencement des échantillons est faire sur SCG, les colonies de levures qui poussent sont alors repiquées sur Chromagar pour l'identification

	N° échantillon	Date ensemencement	Date lecture	lecteur 1	Résultat 1	lecteur 2	Résultat 2	Nature du prélèvement	Identification par spectro de masse
1	3100607827	06/10/13	11/10/13	FB	Col rose seche type C. krusei	DR	Col rose seche type C. krusei	urine	C. krusei
2	3100610500	06/10/13	11/10/13	FB	Col verte type C. albicans	DR	Col verte type C. alb	expectoration	C. albicans
3	3100413013	04/10/13	11/10/13	FB	Col rose	DR	Col rose	aspiration	C. glabrata
4	3100613025	06/10/13	11/10/13	FB	Col rose	DR	Col rose	urine	C. glabrata
5	3112709592	02/12/13	02/12/13	IL	Col rose	JG	Col rose	Liquide abdom.	C. glabrata
6	3112808035	02/12/13	02/12/13	IL	Col verte type C. Albicans + col rose	JG	Col verte type C. albicans et rose	selles	C. albicans, C. glabrata
7	3111783509	02/12/13	02/12/13	IL	Col violet foncé	JG	Col violet foncé	pus	C. lusitaniae
8	3112089281	02/12/13	02/12/13	IL	Col rose	JG	Col rose	ecouvillon	C. guilliermondii
9	3112808035	02/12/13	02/12/13	IL	Col rose et verte	JG	Col rose et verte	selles	C. glabrata et albicans
10	3112704846	02/12/13	02/12/13	IL	Col verte type C. albicans	JG	Col verte type C. albicans	expectoration	C. albicans
11	3112705426	29/11/13	29/11/13	FB	Col verte type C. albicans	JG	Col verte type C. albicans	expectoration	C. albicans
12	3112705439	02/12/13	02/12/13	IL	Col verte type C. albicans	JG	Col verte type C. alb	aspiration	C. albicans
13	3112707391	02/12/13	02/12/13	IL	Col verte type C. Albicans + col rose	JG	Col verte type C. Albicans et rose	expectoration	C. albicans et C. glabrata
14	3112707391	02/12/13	02/12/13	IL	Col rose et verte	JG	Col rose et verte	expectoration	C. albicans et C. glabrata
15	3112607397	02/12/13	02/12/13	IL	Col verte type C. albicans	JG	Col verte type C. alb	expectoration	C. albicans
16	3112909973	02/12/13	02/12/13	IL	Col verte type C. albicans	JG	Col verte type C. albicans	ecouvillon	Calbicans

**Conclusions :**

La concordance est parfaite entre lecteurs pour la reconnaissance de l'aspect et/ou couleur des colonies.

**Comparaison de la couleur des colonies sur ChromAgar pour *C.tropicalis* et *C.krusei* en 48h avec les résultats de la spectrométrie de masse (SM)**

NUMERO	DATE	<i>Candida tropicalis</i> suspecté	<i>Candida krusei</i> suspecté	IDENTIFICATION AU
		Oui / Non	Oui / Non	MALDI-TOF
2060642115	7-juin-12	non	oui	<i>C. krusei</i>
2053131395	7-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2060341547	7-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2060846215	12-juin-12	oui	non	pas de pic
2061152194	14-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061047748	14-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061149417	14-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2060846215	15-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061358287	15-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061556978	20-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061558296	20-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061962890	21-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061962881	21-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061962787	22-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061860324	22-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2061863527	22-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>

2062066964	25-juin-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2062675459	2-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2062675462	2-juil.-12	oui	non	pas de pic
2062879598	2-juil.-12	non	oui	<i>C. krusei</i>
2062675462	3-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2062985203	3-juil.-12	non	non	<i>C. tropicalis</i>
2062984600	5-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2062980710	5-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2062676489	5-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2062984598	6-juil.-12	oui	non	pas de pic
2070591811	9-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070386500	9-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070391863	9-juil.-12	non	oui	<i>C. krusei</i>
2070590491	9-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070693790	9-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070387506	9-juil.-12	non	non	<i>C. krusei</i>
2062984598	9-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070693771	12-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070995705	12-juil.-12	non	oui	<i>C. krusei</i>
2070995713	12-juil.-12	non	oui	<i>C. krusei</i>
2070693608	12-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070895723	12-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070995515	12-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070795112	12-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070801419	12-juil.-12	oui	non	<i>C. tropicalis</i>
2070995985	13-juil.-12	non	oui	<i>C. krusei</i>



**Conclusion :** l'aspect et la couleur des colonies de *C. krusei* et *C. tropicalis* sur ChromAgar à 48h est bien valable pour identifier ces espèces. En cas de doute une identification par SM est réalisée.

### COMPARAISON DUREE ET TEMPERATURE D'INCUBATION

#### Validation de l'utilisation du Chromagar de 24 à 96h et à des températures d'incubation différentes

Pour des raisons de praticabilité, nous avons voulu validé l'utilisation de la spectrométrie de masse pour identifier des levures isolées sur des Chromagar de 24 à 96h, ainsi que sur des Chromagar incubés à 30, 35 et 37°C.

Espèce	Température d'incubation	Temps d'incubation (heures)			
		24	48	72	96
<i>C. albicans</i>	30	Vert très pâle	Vert très clair	Vert d'eau	Vert d'eau
	35	Vert clair	Vert clair	Vert	Vert d'eau
	37	Vert clair	Vert d'eau	Vert	Vert d'eau
<i>C. krusei</i>	30	Rose mat très pâle	Rose mat	Rose mat	Rose mat
	35	Rose mat pâle	Rose mat	Rose mat	Rose mat
	37	Rose mat pâle	Rose mat	Rose mat	Rose mat
<i>C. tropicalis</i>	30	Rose	Bleu	Bleu	Bleu foncé
	35	Mauve	Bleu	Bleu	Bleu foncé
	37	Mauve	Bleu	Bleu	Bleu foncé
<i>C. dubliniensis</i>	30	Blanc	Vert clair	Vert d'eau	Vert d'eau
	35	Blanc	Vert d'eau	Vert foncé	Vert foncé
	37	Blanc	Vert d'eau	Vert foncé	Vert foncé
<i>C. glabrata</i>	30	Crème	Rose	Rose	Rose
	35	Rose	Rose	Rose	Rose foncé
	37	Rose	Rose	Rose	Rose foncé
<i>C. lusitaniae</i>	30	Blanc	Rose très pâle lisse	Rose pâle lisse	Rose pâle lisse
	35	Rose très pâle lisse	Rose pâle lisse	Rose pâle lisse	Rose pâle lisse
	37	Rose très pâle lisse	Rose pâle lisse	Rose pâle lisse	Rose pâle lisse
<i>C. parapsilosis</i>	30	Blanc	Blanc mat et rugueux	Rose pâle mat et rugueux	Rose pâle mat et rugueux

	35	Blanc mat	Blanc mat et rugueux	Rose pâle mat et rugueux	Rose pâle mat et rugueux
	37	Blanc mat	Blanc mat et rugueux	Rose pâle mat et rugueux	Rose pâle mat et rugueux

**Conclusion** : les souches de levures sont différenciables dès 24h, une lecture à 48h au moins est nécessaire pour obtenir les couleurs typiques décrites par le fabricant, cette lecture typique est possible jusqu'à 96h.

La température d'incubation n'affectait pas l'aspect des colonies surtout pour les espèces identifiables par la couleur sur Chromagar (*C.albicans* – *C. krusei*- *C.tropicalis*)

### COMPARAISON EXAMEN DIRECT ET CULTURE

	Technique	N° échantillon	Nature prélèvement	Date lecture	Lecteur	Résultat	Résultat culture	conclusion
1	Giemsa	3102444131	ecouvillon	24/10/13	FB	Rares levures bourgeonnantes	<i>C. albicans</i> et <i>krusei</i>	conforme
2	Noir chlorazole ou fungifluor /giemsa	3102545296	biopsie	25/10/13	FB	Nombreux fil myceliens	neg	conforme
3	Giemsa	3102952213	ecouvillon	31/10/13	JG	neg	<i>C. albicans</i>	conforme
4	Giemsa	3102952197	ecouvillon	31/10/13	JG	Levures	<i>C. albicans</i>	conforme
5	Giemsa	3102851409	ecouvillon	31/10/13	JG	neg	neg	conforme
6	Etat frais /Giemsa	3103155615	LBA	31/10/13	FB	Neg	<i>C. albicans</i>	conforme
7	Giemsa	3110562497	ecouvillon	06/11/13	DR	Neg	neg	conforme
8	Giemsa	3110562495	ecouvillon	06/11/13	DR	bacteries	neg	conforme
9	Giemsa	3111274139	ecouvillon	14/11/13	DR	Qq levures bourgeonnantes	<i>C. albicans</i>	conforme
10	Giemsa	3111376441	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	neg	conforme
11	Giemsa	3111274086	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	neg	conforme

12	Giemsa	3111375968	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	neg	conforme
13	Giemsa	3111274090	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	neg	conforme
14	Giemsa	3111376520	ecouvillon	14/11/13	DR	Neg	neg	conforme
15	Noir chlorazole ou fungifluor / Giemsa	4021970087	Biopsie	25/02/14	YS	Neg	A. fum	conforme
16	Giemsa	4021970080	ecouvillon	25/02/14	YS	Tres rares levures filamenteuses	C. albicans	conforme
17	Etat frais /Giemsa	4031725286	LBA	17/03/14	YS	PJ kyste	C. albicans, IF pos, PCR pos	conforme
1	Etat frais	3100303611	expectoration	03/10/13	FB	Neg	A. fum	conforme
2	Etat frais	3100303836	Expectoration	03/10/13	FB	Rares levures filamentueuse	A. fum, C. Glabrata, C. tropicalis	conforme
3	Etat frais	3100303846	expectoration	03/10/13	FB	Neg	A. fum	conforme
4	Etat frais	3100203859	expectoration	03/10/13	FB	Neg	A. fum	conforme
5	Etat frais	3100303982	aspiration	03/10/13	FB	Neg	neg	conforme
6	Etat frais	3100303985	Expectoation	03/10/13	FB	Neg	neg	conforme
7	Etat frais	3100303986	aspiration	03/10/13	FB	Neg	aureobasidium	conforme
8	Etat frais	3100303994	expectoration	03/10/13	FB	Neg	C. albicans	conforme
9	Etat frais	3100710482	aspiration	07/10/13	FB	Neg	A. versicolor	conforme
10	Etat frais	3100610486	expectoration	07/10/13	FB	Qq lev et pseudofil	C. albicans	conforme
11	Etat frais	3100510492	expectoration	07/10/13	FB	Qq lev et pseudofil	C. albicans	conforme
12	Etat frais	3100710495	expectoration	07/10/13	FB	Qq lev et pseudofil	C. albicans	conforme
13	Etat frais	3100610500	expectoration	07/10/13	FB	Rares filaments	C. albicans	conforme
14	Etat frais /	3102238193	LBA	22/10/13	YS	Rares FM	A. fum	conforme

	Giemsa							
15	Etat frais	3102238670	aspiration	22/10/13	FB	Neg	C. albicans	conforme
16	Etat frais	3102138679	expectoration	22/10/13	FB	Neg	A. fum	conforme
17	Etat frais	3102545231	aspiration	25/10/13	DR	Neg	C. albicans	conforme
18	Etat frais	3102545414	expectoration	25/10/13	FB	Neg	A. fum	conforme
19	Etat frais	3102545415	expectoration	25/10/13	FB	rare FM	A. fum	conforme
20	Etat frais	3102545417	Aspiration	25/10/13	FB	Neg	A fum, peni	conforme
21	Etat frais	3102545418	Aspiration	25/10/13	FB	Neg	CFS	conforme
22	Etat frais	3103154661	drain	31/10/13	JG	Neg	neg	conforme
23	Etat frais	3103054643	Aspiration	31/10/13	JG	Neg	C. albicans, peni, A fum	conforme
24	Etat frais / Giemsa	3103054659	LBA	31/10/13	JG	Neg	neg	conforme
25	Etat frais	3110459581	expectoration	04/11/13	NI	Neg	A fum, C pararugosa	conforme
26	Etat frais	3110459503	expectoration	04/11/13	NI	Nombreux pseudofil	C. dubliniensis et inconspicua	conforme
27	Etat frais	3110459584	expectoation	04/11/13	NI	Neg	A fum, A flavus, C pararugosa	conforme
28	Etat frais	3110259513	expectoration	04/11/13	NI	Très nombreux pseudofil	C. dubnliniensis, C. inconspicua	conforme
29	Etat frais	3110459579	expectoration	04/11/13	NI	Neg	C. albicans	conforme

### **Conclusion :**

Les résultats des cultures comparés aux résultats des examens directs montrent une meilleure sensibilité de la culture comme décrit dans la littérature.

**Un seul prélèvement est positif à l'examen direct et négatif en culture conformément à ce qui est décrit dans la littérature concernant la mauvaise sensibilité de la culture pour les biopsies (4).**

## **BIBLIOGRAPHIE**

- (1) données fournisseur
- (2) Odds F. Chromagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important Candida species.  
Journal of Clinical Microbiology, 1994, 1923-1929
- (3) ANOFEL (fascicule et CDrom)
- (4) Rickerts et Al. CID 2005
- (5) Mycopathologia. 2013 Dec;176(5-6):377-85. doi: 10.1007/s11046-013-9657-9. Epub 2013 Sep 18.  
USE OF MYCOLOGICAL, NESTED PCR, AND REAL-TIME PCR METHODS ON BAL FLUIDS FOR DETECTION OF ASPERGILLUS FUMIGATUS AND A. FLAVUS IN SOLID ORGAN TRANSPLANT RECIPIENTS.  
Zarrinfar H<sup>1</sup>, Mirhendi H, Makimura K, Satoh K, Khodadadi H, Paknejad O.
- (6) Mycoses. 2005;48 Suppl 1:12-7. Clinical evaluation of Aspergillus-PCR for detection of invasive aspergillosis in immunosuppressed patients.  
Lass-Flörl C<sup>1</sup>, Gunsilius E, Gastl G, Freund M, Dierich MP, Petzer A.

**CONCLUSION:**

**La technique d'ensemencement des prélèvements à visée mycologique est validée dans notre laboratoire.**

**Le personnel est habilité pour la reconnaissance des colonies sur milieux spécifiques.**

**L'identification de certaines espèces de levures est possible à partir des milieux chromogènes selon les recommandations du fournisseur, quelque soit la température (30/35/37°C) et la durée d'incubation (24/48/96h).**

**En cas de doute sur l'aspect de la colonie, une identification par spectrométrie de masse est réalisée.**

# ANNEXE

## Liste LOTS ET REFERENCE REACTIFS UTILISES POUR LES TESTS

	SCG		Chromagar	
	référence	lot	référence	lot
juin-12	56594	2C2433/ 2E2434	257480	2066848
juil-12				2081473
sept-13		3F2446		3162159
oct-13				3218486
nov-13		3F2192		
dec-2013				3246147/ 3281415

## Liste matériel

Pièce	Matériel	Code labo	N°inventaire
Réserve 1	Réfrigérateur	RR3	113224
Réserve 1	Réfrigérateur	RR4	EP10.2 116861
Réserve 1	Congélateur -35	RC1	502981 T
Réserve 1	Congélateur -35	RC2	116619
Réserve 1	Congélateur -35	RC4	116887
Réserve 1	congélateur -80	RC3	76094
Réserve 1	Etuve	Bactec	84619
Divers	Réfrigérateur	DiR1	113225
Divers	Réfrigérateur	DiR2	26844
Myco	Réfrigérateur	MR1	26843
Myco	Etuve	ME1	76865
Myco	Etuve	ME2	3586
Myco	Hotte	MH1	79584
Myco	Microscope	M10	78450
Myco	Microscope	M13	8595
Myco	Imprimante		5005468
Myco	Densitometre		84184
Dermato	Hotte	DH1	72153
Dermato	Hotte	DH2	16117
Dermato	Microscope	M6	80581
Dermato	Microscope	M7	80586
Dermato	Microscope	M9	79569
Dermato	Loupe		3550
Laverie	Réfrigérateur	LaR1	971171 T
Parasitologie	Centrifugeuse	PCent1	33760



Parasitologie	Centrifugeuse	PCent2	3570
Parasitologie	Microscope	M2	80584
Parasitologie	Microscope	M4	75393
Parasitologie	Microscope	M14	75394
Parasitologie	Microscope	M3	79570
Parasitologie	Microscope	M5	3552
Parasitologie	Imprimante		5013188
Couloir / Séro	Réfrigérateur	SR1	971172 T
Couloir	etuve	CE4	76864
Couloir	etuve	CE5	3587
Couloir	etuve	CE7	3588
Couloir	etuve	CE8	34249

### **Liste matériel critique**

EP-SA-PA-METRO-MAT-DE-002