

**PROCEDURE DE VERIFICATION DE LA TECHNIQUE**

**IDENTIFICATION DES LEVURES PAR SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-TOF,  
CHROMAGAR ET ID32**

**EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :**

**Identification des levures par spectrométrie de masse MaldiTof**

**Technique qualitative avec une détermination quantitative**

**PORTEE A**

## DESCRIPTION DE LA METHODE

<b>Analyte/Mesurande :</b>	Identification des levures
<b>Principe de la Mesure :</b>	<p>Identification de levures par une technique de spectrométrie de masse de type MALDI TOF.</p> <p>Un échantillon de colonies de levures est déposé sur une plaque, un laser UV intégré au spectromètre irradie la composite matrice-échantillon et libère les protéines chargées positivement. Après migration des peptides dans une chambre sous vide, la détermination de la masse et de la charge des peptides permet de déterminer un spectre qui sera comparé à une banque de données.</p> <p>La validation de l'identification est basée sur un score et/ou une répétabilité de l'espèce.</p>
<b>Méthode de mesure :</b>	Comparaison d'un spectre protéique à une banque de données
<b>Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :</b>	colonie fongique
<b>Marquage CE (Oui/Non) :</b>	Oui
<b>Codage C.N.Q. (s'il existe) :</b>	NA
<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :</b>	<u>Cf annexe : liste références et lots de tous les réactifs utilisés pour les tests de performance</u>

## MISE EN ŒUVRE

<b>Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :</b>	Techniciens de Parasitologie Mycologie  Stagiaire BTS  Biologiste : J.Guitard
<b>Procédure de validation :</b>  EP-SA-PA-MYCO-ANA-PG-004	1- <u>Objet du document</u>  Identification de levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.  2- <u>Déroulement des tests de performance</u>  Cf. chapitre évaluation des performances  3- <u>conclusion</u>  Cf. chapitre évaluation des performances
<b>Procédure de gestion de la portée flexible :</b>	EP-HUEP-QUAL-SMQ-PG-007
<b>Période d'évaluation :</b>	2011 - 2014
<b>Date de mise en service :</b>	2011
<b>Autorisation de mise en service par :</b>	C.Hennequin

<b>MAITRISE DES RISQUES + 5M intégré</b>			
<b>1 : criticité forte</b>	<b>2 : criticité moyenne</b>		<b>3 : criticité faible</b>
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	Qualité du dépôt	<b>MO techniques</b> EP-SA-PA-PLUS-ANA-PT-001 EP-SA-PA-MYCO-ANA-DE-002 EP-SA-PA-MYCO-ANA-MT-001	1
<b>Main d'œuvre (habilitation du personnel) :</b>	Personnel habilité	<b>Habilitation du personnel</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>	Appareil dans pièce avec température 15-30°C	Contrôle température de la pièce par une sonde	3
<b>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</b>	Date de péremption Marquage CE	<b>Feuille de suivi des réactifs</b> EP-SA-PA-PLUS-ANA-DE-003 <b>Notice des réactifs</b>	1
<b>Matériau de référence :</b> Souches de contrôle	BTS Souches ATCC (CQI) : <i>Candida albicans</i> ATCC 90028™ <i>Candida krusei</i> ATCC 6258™ <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019™	<b>MO techniques</b> EP-SA-PA-PLUS-ANA-PT-001 EP-SA-PA-PLUS-ANA-PT-002 EP-SA-PA-MYCO-ANA-MT-001	1
<b>Equipements : Exigences métrologiques (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques spécifiques</b>	Hotte chimique	Entretien hotte	2
	Spectromètre de masse (Bruker)	cf.notice fournisseur	1
	Congélateurs et réfrigérateurs	Raccordement sur sonde et suivi métrologique des enceintes thermostatiques	

## EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

### Contrôle interne de qualité : souches ATCC

Les souches ATCC sont testées à chaque changement de matrice et de BTS (1 \*/ semaine)

### Contrôle externe de qualité :

CTCB (3 contrôles par an dont un échantillon=souche de mycologie à identifier)

### Description tests

Les tests de spectrométrie de masse ont été réalisés avec les techniques d'extraction complète Bruker, d'extraction complète du laboratoire, et d'extraction rapide du laboratoire.

### Contexte scientifique

Le spectromètre de masse MALDI-TOF MALDI Biotyper a été conçu par Bruker à l'usage de la Bactériologie et l'identification des bactéries. Cette technologie détermine le profil protéique de ces dernières et le compare à une base de données, proposant dix résultats d'identification avec chacun un score d'identification. Selon Bruker, seuls les scores supérieurs ou égaux à 2 obtenus par extraction complètes sont interprétables pour le rendu d'un résultat d'identification.

Critères BRUKER	Identification	Score d'identification X	Répétabilité
	Forte probabilité à l'espèce	$2,300 \leq X \leq 3,000$	Non considérée
	Genre sécurisé, espèce probable	$2,000 \leq X \leq 2,299$	
	Genre probable	$1,700 \leq X \leq 1,999$	
	Degré de confiance insuffisant	$0,000 \leq X \leq 1,699$	

Le laboratoire de Parasitologie-Mycologie utilise également le MALDI Biotyper pour identifier les colonies de levures qui se sont développées sur une gélose *Candida* CHROMagar. Cependant, les levures et leur paroi cellulaire plus résistante que celle des bactéries nécessitent un traitement drastique pour obtenir une identification : une extraction complète mise au point par Bruker. Le laboratoire a tout de même optimisé ce protocole avec l'utilisation d'acide formique pur et non dilué afin d'obtenir de meilleurs résultats. Les volumes de réactifs à ajouter ont parallèlement dû être revus.

Protocole de Bruker	Protocole du laboratoire
Ajout de <b>50µL</b> d'acide formique à <b>70%</b>	Ajout de <b>30µL</b> d'acide formique <b>pur</b>
Ajout de <b>50µL</b> d'acétonitrile pur	Ajout de <b>30µL</b> d'acétonitrile pur
<b>Possibilité de redéposer</b> 1,2µL de surnageant si le dépôt est trop faible	<b>Un seul dépôt</b> de 1,2µL de surnageant

LABORATOIRE PARASITOLOGIE MYCOLOGIE	Identification	Score d'identification X	Répétabilité
	Espèce validée	$2,000 \leq X$	Non considérée
	Espèce validée si répétabilité	$1,700 \leq X \leq 1,999$	Minimum 2 fois
	Espèce validée si répétabilité mais nouveau passage par précaution	$X < 1,700$	Minimum 2 fois

Pour des questions de temps et de praticabilité, le technicien identifie les levures par un autre type d'extraction dit "rapide", consistant à traiter un dépôt de colonie par de l'acide formique pur puis de le recouvrir d'une matrice. Pour rendre le résultat, le laboratoire tient alors compte de la répétabilité, c'est-à-dire que si l'espèce rendue par le premier résultat d'identification avec un score inférieur à 2 est la même que celle rendue par le deuxième résultat quel que soit le score, alors l'espèce est validée.

Le but de cette étude est de savoir si nous pouvons considérer la répétabilité du premier résultat d'identification d'extraction rapide en cas de score inférieur à 2, et si les résultats obtenus en extraction complète avec le protocole du laboratoire sont identiques à ceux obtenus avec le protocole de Bruker.

### Résultats de la comparaison des méthodes d'extraction (bilan) et validation de la répétabilité en extraction rapide

Espèce	Score d'appariement X en extraction directe	Nombre de souches étudiées		Score d'identification X en extraction complète	
				Protocole de Bruker	Protocole du laboratoire
<i>Candida albicans</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	10		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
	$1,300 \leq X \leq 1,699$	10		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida pelliculosa</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	1		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida dubliniensis</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	3	1	$2,000 \leq X \leq 2,299$	$1,700 \leq X \leq 1,999$
	$1,300 \leq X \leq 1,699$	3		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida glabrata</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	10		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
	$1,300 \leq X \leq 1,699$	1		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida guillemondii</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	2		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida kefyr</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	2		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida lusitanae</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	3		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida parapsilosis</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	2		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
	$1,300 \leq X \leq 1,699$	1		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida pararugosa</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	1		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
	$1,300 \leq X \leq 1,699$	1		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$
<i>Candida tropicalis</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	4		$2,000 \leq X \leq 3,000$	$2,000 \leq X$
	$1,300 \leq X \leq 1,699$	1		$2,300 \leq X \leq 3,000$	$2,000 \leq X$
<i>Geotrichum silvicola</i>	$1,700 \leq X \leq 1,999$	1		$2,000 \leq X \leq 2,299$	$2,000 \leq X$

<i>Magnusiomyces capitatus</i>	1,700 ≤ X ≤ 1,999	1	2,300 ≤ X ≤ 3,000	2,000 ≤ X
<i>Pichia cactophila</i>	1,700 ≤ X ≤ 1,999	2	2,000 ≤ X ≤ 2,299	2,000 ≤ X

### Exactitude des techniques d'extraction (en détail) et validation de la répétabilité

Date	N°pr élt	Espèc e Maldi 1	Score 1	Espèc e Maldi 2	Sc or e 2	Lettr e A B C	Ré pét ab ilité	EC pr ot o2 Sc or e	EC prot o1 Scor e	EC Espèce	Techniq ues complé mentaire s (CHR, ID32, Séq., ...)	Remarq ues
03- juin	8678 1	C.albi cans	1,956	C.albic ans		B	9	2		C.albic ans		Vert
03- juin	8724 7	C.albi cans	1,994	C.albic ans		B	10	2,3 23		C.albic ans		Vert
02- juil	4338 5	C.albi cans	1	C.albic ans	1, 63 5	B/B	10	2		C.albic ans (1)		Repiqua ge
29- oct	3504 8972	C.albi cans	1,879	C.albic ans	1	B		2	2	C.albic ans		
29- oct	3504 4131	C.albi cans	1,976	C.albic ans	1	B		2	2	C.albic ans		V
29- oct	3504 4131	C.albi cans	1	C.albic ans	1, 77 8	B		2,3 1	2	C.albic ans		B
29- oct	3504 9017	C.albi cans	1	C.albic ans	1	B		2	2,27	C.albic ans		
31- oct	3505 3122	C.albi cans	1	C.albic ans	1	B		2	2	C.albic ans		
29- oct	3504 9062	C.albi cans	1,893	C.albic ans	1, 88 7	B		2,3 55	2	C.albic ans		
31- oct	3505 3595	C.albi cans	1	C.albic ans	1, 93 1	B		2	2	C.albic ans		

02- juil	434 68	C. albicans	1,593	C. albicans	1,528	C/A	10	2		C. albicans (10)		Repiquage / Vertes
21- oct	3503 2103	C. albicans	1,679	C. albicans	1,659	C		2	2,298	C. albicans		C. albicans
21- oct	3503 2111	C. albicans	1	C. albicans	1,647	C		2	2	C. albicans		C. albicans
16- oct	1964 1verte	C. albicans	1,67	C. albicans	1			2	2	C. albicans	Latex dubli.	C. albicans
14- oct	17533 Col verte	C. albicans	1,663	C. albicans	1			2	2	C. albicans		C. albicans

<u>23-</u> <u>oct</u>	<u>3503</u> <u>3946</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1</u>	<u>C</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>
<u>21-</u> <u>oct</u>	<u>3502</u> <u>7991</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1,613</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1,6</u>		<u>2,39</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>
<u>14-</u> <u>oct</u>	<u>3501</u> <u>4690</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1</u>		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>
<u>05-</u> <u>nov</u>	<u>3505</u> <u>4663</u>	<u>C</u> <u>.albicans</u>	<u>1,619</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	<u>1</u>		<u>2,23</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>albicans</u>	

<u>03-</u> <u>juin</u>	<u>83404</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,788</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>		<u>5</u>	<u>2,367</u>		<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>Aubergine</u>
<u>29-</u> <u>oct</u>	<u>3504</u> <u>9009</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,85</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>31-</u> <u>oct</u>	<u>3505</u> <u>3588</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>25-</u> <u>oct</u>	<u>3503</u> <u>7477</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,921</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,611</u>		<u>2,073</u>	<u>2,37</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>21-</u> <u>oct</u>	<u>3502</u> <u>5964</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>		<u>2,181</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>31-</u> <u>oct</u>	<u>3504</u> <u>9100</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,835</u>		<u>2</u>	<u>2,286</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>31-</u> <u>oct</u>	<u>3504</u> <u>8867</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,794</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>		<u>2,262</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>EC 2 :</u> <u>2,297</u> <u>SCG</u>
<u>24-</u> <u>oct</u>	<u>38213</u> <u>colblanche</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,86</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>		<u>2,37</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>23-</u> <u>oct</u>	<u>28388</u> <u>rose</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,893</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,54</u>		<u>2,31</u>	<u>2,33</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>21-</u> <u>oct</u>	<u>3502</u> <u>8113</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,736</u>		<u>2</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>29-</u> <u>oct</u>	<u>3504</u> <u>9070</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,385</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,252</u>	<u>2</u>	<u>2,222</u>	<u>2,294</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	
<u>26-</u> <u>nov</u>	<u>3508</u> <u>9988</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>1,657</u>		<u>2,286</u>	<u>2</u>	<u>C.</u> <u>glabrata</u>	<u>EC 1</u> <u>double</u> <u>dépôt</u> <u>: 2,167</u>



03-juin	75605	C. colliculosa	1	C. colliculosa	1,617	2	2		C. colliculosa		Blanc
03-juin	82418	C. dubliniensis	1	C. dubliniensis	1	3	2		C. dubliniensis		Vert
07-nov	3505 9513	C. dubliniensis	1,802	C. dubliniensis	1		2,012	2	C. dubliniensis		
08-nov	60240	C. dubliniensis	1,76	C. dubliniensis	1,337		2,101	2,06	C. dubliniensis		
20-nov	3508 5037	C. dubliniensis	1	C. dubliniensis	1,631		2	1	C. dubliniensis		
07-nov	3505 9503	C. dubliniensis	1	C. dubliniensis	1,556		2	2	C. dubliniensis		
16-oct	23200 colverte	C. dubliniensis	1,65	C. dubliniensis	1,53		2	2	C. dubliniensis	Latex dubli. +	C. dubliniensis
16-oct	17528 colbleue	C. dubliniensis	1,605	C. dubliniensis	1		2	2	C. dubliniensis	Latex dubli. +	C. dubliniensis
27-mai	51440 colrose	C. guilliermondii	1,978	C. guilliermondii	1		2,214	2	C. guilliermondii		
07-nov	3506 0405	C. guilliermondii	1	C. guilliermondii	1		2	2,149	C. guilliermondii		
18-oct	3504 8157	C. kefyrr	1	C. kefyrr	1,819		2	2	C. kefyrr		

06-nov	3505 5136	C. kefyr	1,752	C. kefyr	1		2,085	2	C. kefyr		
03-juin	16947 colrose	C. lusitaniae	1,77	C. lusitaniae	1,504		2	2,234	C. lusitaniae		
03-juin	3502 6063	C. lusitaniae	1	C. lusitaniae	1		2	2,157	C. lusitaniae		
23-oct	3501 6907	C. lusitaniae	1	C.lusitaniae	1,635		2	2	C. lusitaniae		
16-oct	84290	C. parapsilosis	1	C. parapsilosis	1	3	2		C. parapsilosis		Frisé (Para ou Or ?)
31-oct	84276	C. parapsilosis	1,861	C. parapsilosis	1,782	5	2		C.parapsilosis		Rose pâle
16-oct	3507 2390	C. parapsilosis	1	C. parapsilosis	1	4	2,342/ 2,337		C.parapsilosis		C. parapsilosis à 2/10
08-nov	59584	C. pararugosa	1	C. pararugosa	1,64		2,097	2	C. pararugosa		
08-nov	59581	C. pararugosa	1	C. pararugosa	1,31		2	2	C. pararugosa		
07-nov	3506 2482	C. tropicalis	1,901	C. tropicalis	1		2	2,391	C. tropicalis		Rose
13-nov	3506 7975	C. tropicalis	1	C. tropicalis	1	6	2	2			
14-nov	3506 8998	C. tropicalis	1	C. tropicalis	1		2	2			

08-nov	64666	C. tropicalis	1,964	C. tropicalis	1,954	2	2,17	C. tropicalis		
31-oct	3503 2525	C. ropicalis	1,593	C. tropicalis	1,357	2	2,306	C. tropicalis	EC1 : 2,271	C. tropicalis
13-nov	3505 9558	Geotrichum silvicola	1	G. silvicola	1	3	2,105	G. silvicola	2,321	
04-nov	3504 9379	M. capitatus	1	M. capitatus	1,972	2	2	M. capitatus		
14-nov	59513 B	Pichia cactophila	1	P. cactophila	1	3	2	2		
14-nov	59503 B	Pichia cactophila	1	P. cactophila	1,875	2	2,069	2		
13-nov	53135 B	Z. baillii	1,766	Z. baillii	1,375	2	1,921	2,016		

**Conclusion :** l'extraction complète et l'extraction rapide du laboratoire sont validées pour l'identification des levures.

La répétabilité peut être prise en compte si les scores sont inférieurs à 2 pour identifier l'espèce.

<b>COMPARAISON DE METHODES :</b>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	<b>Oui</b>
<b>Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :</b>	Autres techniques utilisées au laboratoire(ChromAgar) et galerie ID32C. Certains tests complémentaires ayant servi à faire la vérification sur site du Maldi-Tof ne sont plus utilisés.

### Description tests

La vérification sur site des tests biochimiques à l'aide de galerie d'ID32C (Biomérieux) a été réalisée selon les recommandations fournisseurs avec des souches de référence ATCC (N=10) sur une période allant du 09 septembre au 20 novembre 2014.

### Contexte scientifique

Cette technologie détermine le profil d'assimilation de nombreux sucres d'une souche de levure isolée sur un milieu SCG ou Chromagar. Ce profil sera alors comparé à une base de données, proposant un ou 2 résultats d'identification avec chacun un score d'identification.

### COMPARAISON DES RESULTATS IDENTIFICATION PAR GALERIE ID32C ET SPECTROMETRE DE MASSE MALDI TOF

*C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* 22019, *krusei* 6258

	Souche	Date	Opérateur (lecteur)	Lot ID32	Durée incubation	résultat	SM
1	ATCC90028	09/09/14	NI (PF)	1002651370	24h	99.9%	C. alb 1.9 *2
2	ATCC22019	09/09/14	NI (NI)		48h	92.8% esculine neg	
3	ATCC90028	17/09/14	NI (JG)		48h	99.9%	C. alb 1.98*2
4	ATCC22019	29/09/14	SV (SV)		48h	99.1%	C. par >2
5	ATCC 90028	10/10/14	SV (HT)		48h	99.9%	C. alb >2
6	ATCC6258	17/10/14	HT (HT)	1003326111	48h	97.8%	C. kru >2
7	ATCC22019	22/10/14	HT (HT)		48h	99.1%	C par 1.98 *2
8	ATCC90028	29/10/14	HT(HT)		48h	99.9%	C alb >2
9	ATCC6258	05/11/14	HT(HT)		48h	97.8%	C kru >2
10	ATCC90018	20/11/14	HT(HT)		48h	99.9%	C alb 1.6 *2

**Conclusion:** Ces tests montrent une reproductibilité des résultats avec la spectrométrie de masse.

### **CONCLUSION:**

**Cette technique d'identification des levures par les galeries biochimiques est apte à être utilisée au laboratoire.**

**Comparaison de la couleur sur ChromAgar des souches de *C. tropicalis* et *C. krusei* en 48h et des résultats de la Spectrométrie de masse**

NUMERO	DATE	<i>Candida tropicalis</i> suspecté sur Chromagar	<i>Candida krusei</i> suspecté sur Chromagar	IDENTIFICATION AU MALDI-TOF
		Oui / Non	Oui / Non	
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 :**

Dans la majorité des cas, à chaque fois qu'une des deux espèces (*C. tropicalis* ou *C. krusei*) étaient suspectées sur le milieu chromogène, il y a eu confirmation par la spectrométrie de masse.

<b>CONTAMINATION (indispensable en portée B)</b>	
Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, $\beta$ HCG) :	<b>OUI</b>

Extraction rapide

Date 05/09/2014

Plaque numero : 201409053327myco

PDP= pas de pics détectés

position	Echantillon	Résultat 1	Score 1	Résultat	Score
E6	BTS	<i>E. coli</i>	2.197	<i>E. coli</i>	2.189
E7	Témoin négatif	PDP		PDP	
E8	Souche 3271	<i>C. albicans</i>	1.936	<i>C. albicans</i>	1.844
E9	Témoin négatif	PDP		PDP	
E10	Souche 30416	<i>C. kefyr</i>	1.836	<i>C. kefyr</i>	1.713
E11	Témoin négatif	PDP		PDP	
E12	Souche 26824	PDP		PDP	
F1	Souche 29820	<i>C. albicans</i>	1.51	<i>C. albicans</i>	1.50
F2	Témoin négatif	PDP		PDP	
F3	Souche 92359	<i>C. parapsilosis</i>	1.963	<i>C. parapsilosis</i>	1.897
F4	Témoin négatif	PDP		PDP	
F5	Souche 30416	<i>C. parapsilosis</i>	1.861	<i>C. parapsilosis</i>	1.713
F6	Témoin négatif	PDP		PDP	
F7	Souche Zarour	<i>C. guilliermondii</i>	2.217	<i>C. guilliermondii</i>	1.912
F8	Témoin négatif	PDP		PDP	
F9	Souche 26624	<i>C. albicans</i>	1.974	<i>C. albicans</i>	1.873
F10	Témoin négatif	PDP		PDP	
F11	Souche 25363	<i>G. silvicola</i>	1.922	<i>G. silvicola</i>	1.866
F12	Témoin négatif	PDP		PDP	
G1	Souche 25363 bis	<i>C. kefyr</i>	2.017	<i>C. kefyr</i>	1.822
G2	Témoin négatif	PDP		PDP	
G3	Souche 29768	PDP		PDP	
G4	Témoin négatif	PDP		PDP	
G5	Souche 29768	<i>C. glabrata</i>	2.21	<i>C. glabrata</i>	1.95
G6	Témoin négatif	PDP		PDP	
G7	Souche 29797	<i>C. glabrata</i>	2.193	<i>C. glabrata</i>	1.879
G8	Témoin négatif	PDP		PDP	
G9	Souche 24255	<i>C. kefyr</i>	1.791	<i>C. kefyr</i>	1.747

G10	Témoign négatif	PDP		PDP	
G11	Souche 30181	<i>C. kefyr</i>	2.181	<i>C. kefyr</i>	1.786
G12	Témoign négatif	PDP		PDP	
H1	Souche 29820	<i>C. albicans</i>	1.801	<i>C. albicans</i>	1.797
H2	Témoign négatif	PDP		PDP	
H3	Souche 29820 bis	<i>C. krusei</i>	2.273	<i>C. krusei</i>	2.003
H4	Témoign négatif	PDP		PDP	
H5	Souche 28280	<i>C. albicans</i>	1.51	<i>C. albicans</i>	1.51
H6	Témoign négatif	PDP		PDP	
H7	Souche 28280 bis	<i>C. norvegensis</i>	2.07	<i>C. norvegensis</i>	1.847
H8	Témoign négatif	PDP		PDP	
H9	Souche 28280 ter	<i>C. glabrata</i>	1.992	<i>C. glabrata</i>	1.758
H10	Témoign négatif	PDP		PDP	
H11	Souche 28280 quatre	<i>C. krusei</i>	1.915	<i>C. krusei</i>	1.783
H12	Témoign négatif	PDP		PDP	

**Conclusion :** Pas de contamination retrouvée entre les puits pour la spectrométrie de masse.

<b>ROBUSTESSE (indispensable en portée B)</b>	
<b>Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :</b>	<b>Oui</b>

**Souches ATCC Reproductibilité après extraction rapide.**

*C. albicans* ATCC 90028, *paraspilosis* 22019, *krusei* 6258

		Lot OS		Lot BTS		Matrice		score
		lot	Ouvert le	lot	Reconstitué le	lot	Reconstitué le	
ATCC 22019	05/05/14 SV	BCBK4955	17/02/14	17328	28/4/14	173092	06/05/14	1.935 (9/10)
ATCC 22019	17/06/14 DR	BCBK4955	17/02/14	17328	11/06/14	173092	17/06/14	1.96 (9/10)
ATCC 22019	08/07/14 IL	BCBM5428	01/07/14	173670	08/07/14	194205	08/07/14	2.144
ATCC 90028	14/05/14 SV	BCBK4955	17/02/14	17328	05/05/14	173092	14/05/14	1.868 (10/10)
ATCC 90028	03/06/14 FB	BCBK4955	17/02/14	17328	20/05/14	173092	04/06/14	1.92 (9/10)
ATCC 90028	24/06/14 DR	BCBK4955	01/07/14	173670	24/06/14	173092	24/06/14	2.017
ATCC 90028	15/07/14 IL	BCBM5428	01/07/14	173670	08/07/14	194205	15/07/14	1.903 (9/10)
ATCC 6258	19/05/14 SV	BCBK4955	17/02/14	17328	20/05/14	173092	21/05/14	2.128
ATCC 6258	09/06/14 DR	BCBK4955	17/02/14	17328	11/06/14	173092	11/06/14	2.3
ATCC 6258	30/06/14 DR	BCBM5428	01/07/14	173670	24/06/14	194205	01/07/14	2.172
ATCC 6258	22/07/14 IL	BCBM5428	01/07/14	173670	22/07/14	194205	22/07/14	2.402

**Conclusion** : la reproductibilité de cette technique est parfaite

**Souches ATCC (C. parapsilosis) Répétabilité après extraction rapide**

		Lot OS		Lot BTS		Matrice		score
		lot	Ouvert le	lot	Reconstitué le	lot	Reconstitué le	
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.044
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.981 (8/10)
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.029
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.986 (9/10)
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.044
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.064
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.033
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.081
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.949 (9/10)
ATCC 22019	23/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.98 (8/10)

Identification de la plaque 2013102303327

Position des dépôts G10/G11/ H1/H2/H3/H4/H5/H6/H7/H8

**Souches ATCC (C. krusei) Répétabilité après extraction rapide**

		Lot OS		Lot BTS		Matrice		score
		lot	Ouvert le	lot	Reconstitué le	lot	Reconstitué le	
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.06
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.388
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.127
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.057
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.295
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.427
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.235
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.225
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.192
ATCC 6258	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.23



Identification de la plaque 2013102403327,  
Position des dépôts B7/B8/B9/B10/B11/B12/C1/C2/C3/C4

**Souches ATCC (C. albicans) Répétabilité après extraction rapide**

		Lot OS		Lot BTS		Matrice		score
		lot	Ouvert le	lot	Reconstitué le	lot	Reconstitué le	
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.773 (10/10)
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.038
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.92 (10/10)
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.954 (10/10)
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.97 (10/10)
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.935 (10/10)
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	2.036
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.841 (10/10)
ATCC 90028	24/10/13 FB	BCBK4955	17/02/14	171328	22/10/13	173092	22/10/13	1.945 (10/10)

Identification de la plaque 2013102403327  
Position des dépôts A9/A10/A11/A12/B1/B2/B3/B4/B5/B6

**Conclusion:** Ces tests montrent une reproductibilité et une répétabilité des résultats avec la spectrométrie de masse.

La robustesse de la technique est parfaite

**CONCLUSION:**

**Cette technique d'identification des levures par le spectromètre de masse (Bruker) est apte à être utilisée au laboratoire.**

**Une base de données validée par le laboratoire existe pour l'identification des espèces de Trichosporon car la base Bruker est incomplète (cf. article 4).**

## ANNEXE

### BIBLIOGRAPHIE

**1- Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory.**

CHEN JH et al.

JCM 2013 Dec;51(12):3981-7.doi:10.1128/JCM.01437-13.Epub 2013 sep 18.

**2- Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (Maldi-Tof MS) systems for the identification of Candida species.**

Lacroix C. et al

CMI 2014 Feb;20(2):153-8.doi:10.1111/1469-0691.12210.Epub 2013 Apr 17.

**3- Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates.**

Rosenvinge FS et al.

Mycoses. 2013 May; 56(3):229-35.doi: 10.1111/myc.12000. Epub 2012 Aug 26.

4- Usefulness of matrix-assisted laser desorption ionisation-time-of-flight mass spectrometry for identifying clinical Trichosporon isolates.

JN de Almeida Junior et al.

CMI 2014

### BIBLIOGRAPHIE galerie ID32C

1- Barnett J .H., Payne R.W., Yarrow D. Yeasts: **Characteristics and identification (1983) Cambridge University Press**

2- Gutierrez J., Martin E., Lozano C., Coronilla J., Nogales C.: **Evaluation of the ATB32C, automicrobic system and API20C using clinical yeast isolates. (1994) Ann Biol Clin 50, 443-446**

3- Monget D., Caniaux I, Desmonceaux M., Guicherd M. : **ATB 32C : A new automate method for the identification of yeasts (1987) Florence fifth international symposium on rapid methods and automation in microbiology and immunology 4-6 nov 1987.**

## Liste réactifs et milieux

	Solution OS		Matrice	
	référence	lot	référence	lot
juin-12	19182-250ml	BCBG5845V	8290200	12.25504429000
juil-12				12.255344281032
sept-13		BCBK4955V		162917
oct-13				173092
nov-13				173092/174755
dec-2013				194205
sept-14				

	BTS		acide formique		
	référence	lot	référence	lot	
juin-12	8255343	12.255343113003	94318-50-ml-f	BCBK6176V	
juil-12					
sept-13		162271			
oct-13					
nov-13					
dec-2013					171328
sept-14					193224

	acétonitrile		chromagar		SCG	
	référence	lot	référence	lot	référence	lot
juin-12	34967-IL	SZBD051BV	257480	2066848	56594	2C2433/ 2E2434
juil-12				2081473		3F2446
sept-13				3162159		3F2192
oct-13				3218486		
nov-13				3246147/ 3281415		
dec-2013				4178247		
sept-14						

## Liste réactifs et milieux

	Chromagar		ID32	
	référence	lot	référence	lot
15/09/14	257480	4178247	32200	1002651370
10/10/14		423260		
13/10/14				4259349
17/11/14				

## 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 suite

<b>Pièce</b>	<b>Matériel</b>	<b>Code labo</b>	<b>N°inventaire</b>
laverie	réfrigérateur	LaR1	TE971171
Myco	Etuve	ME1	76865
Myco	Hotte	MH1	79584
Myco	densitomètre		84184
Myco	Logiciel Apiweb (BioMerieux)	SATOLPARTNN	94368

### Liste matériel critique

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