|  |  |
| --- | --- |
| Rédigé par : | Philippe Dufresne |
| Révisé par : | Marc-Christian Domingo; Jeannot Dumaresq; Michel Lebrun; Jean Longtin |

# Objectif / but de l’analyse

Cette PON décrit la procédure de préparation (extraction en tube et inactivation) des échantillons pour l'identification des champignons filamenteux d’importance clinique (incluant les champignons opportunistes, dermatophytes et dimorphes) sur l'appareil VITEK® MS (bioMérieux) utilisant la technologie de spectrométrie de masse MALDI-TOF.

# Principe de la méthode / contexte / domaine d’application

L’identification de microorganismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF repose sur l’analyse de spectres de masse générés à partir d’un échantillon provenant d’une culture pure. Le profil ionique obtenu est ensuite comparé aux spectres de références contenus dans la banque de données du manufacturier afin d’identifier le microorganisme.

Alors que les bactéries et levures usuelles peuvent être déposées directement sur la cible d’analyse (avec ou sans extraction à l’acide formique sur lame), une extraction complète en tube est nécessaire avant de procéder à l’identification des champignons filamenteux sur le système MALDI-TOF VITEK® MS. Cette procédure est requise pour maximiser l’extraction de protéines (plus difficile étant donné leur paroi cellulaire rigide) et afin réduire le bruit de fond dû à leur nature hétérogène en culture (hyphes, spores, etc.) et les nombreux métabolites secondaires qu’ils produisent. L’extraction en tube permet aussi la manipulation sécuritaire, car elle mène à une inactivation complète.

# Définitions / abréviations / acronymes

* ASPC : Agence de santé publique du Canada
* CHCA : acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique
* ESB : enceinte de sécurité biologique de catégorie II
* EtOH : alcool éthylique
* FA : Acide formique
* MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption ionization - Time of flight
* PDA : gélose pomme de terre dextrose
* SAB : gélose Sabouraud dextrose
* RPM : rotation par minute

# Responsabilités

Les technologistes sont responsables de générer des résultats de qualité conformes à cette procédure.

Les microbiologistes-infectiologues et les responsables du laboratoire s’assurent que le personnel est formé adéquatement, que la procédure est maintenue à jour et que les résultats sont valides.

# Énoncé / système de fonctionnement

## Spécimen

### Mise en culture

Champignon filamenteux ayant été mis en culture pendant 2 à 8 jours (5 à 25 jours souches à croissance lente) sur les milieux suivants approuvés par bioMérieux.

* gélose pomme de terre dextrose (PDA).
* gélose Sabouraud dextrose\* (SAB; 40 g/L – pH 5,6) *\*avec ou sans chloramphénicol ou gentamicine*.
* gélose Trypcase-soja\*\* (avec ou sans neutralisant) *\*\*pas testée au LSPQ*.

Les conditions et températures d’incubation des spécimens cliniques sont propres à chaque microorganisme et ne font l’objet d’aucune recommandation du fabricant. Pour la mise en culture des champignons, nous vous recommandons une incubation à une température de 30 °C.

### Réception du spécimen et critères de rejet

* Souche mixte ou contaminée par bactéries.
* Selon les procédures usuelles propres à chaque laboratoire.
* Selon les critères de rejets usuels (fuite du spécimen, contenant endommagé, spécimen sans requête ou identifiant).

## Équipement

* Appareil VITEK® MS (bioMérieux)
* Enceinte de sécurité biologique de classe II
* Incubateur (conditions aérobiques) réglé à 30 °C (+/- 2 °C)
* Micropipette de précision (P2 : 0,5 à 2 μl ou P10:1 à 10 μl)
* Micropipettes (P100, P1000 ou équivalentes)
* Microcentrifugeuse capable d'atteindre 10 000 à 14 000 x *g*
* Vortex
* Micropipette permettant pipettage de 15 à 35 mL (optionnel)
* Réfrigérateur réglé à 4 °C (optionnel)

## Matériel et réactifs

Milieux : les trois milieux suivants sont validés par le manufacturier

* gélose pomme de terre dextrose (PDA)
* gélose Sabouraud dextrose\* (SAB; 40 g/L – pH 5,6) *\*avec ou sans chloramphénicol ou gentamicine*.
* gélose Trypcase-soja\*\* (avec ou sans neutralisant) *\*\*pas testé au LSPQ*.

Consommables

* Écouvillons stériles
* Microtubes de 1,5 / 2,0 ml coniques ou RBT de 2 mL (fournis avec la trousse VITEK MS MOULD KIT ref : 41580)
* Embouts de pipette stériles et sans filtre (P2, P10, P100 et P1000)
* Lames VITEK® MS-DS – Lames jetables pour dépôt (ref. : 410893 - bioMérieux)
* Pipette de transfert (optionnel)

Réactifs

Trousse VITEK® MS MOULD KIT (ref. 41580 - bioMérieux)

* Solution R1 – Éthanol (70 % v/v)
* Solution R2 – Acide formique (70 % v/v)
* Solution R3 – Acétonitrile (100 % v/v)

**OU**

Réactifs maison (voir annexe 1 pour préparation et fournisseur recommandés)

* Éthanol anhydre (70 % v/v)
* Acide formique (70 % v/v)
* Acétonitrile (100 % v/v)
* Matrice VITEK® MS-CHCA (ref. : 411071- bioMérieux)

## Matériel et procédures de contrôle de la qualité

Souche d'étalonnage : *Escherichia coli* ATCC® 8739 (incubée 18-24 heures à 35 °C +/- 2 °C sur gélose au sang ou équivalent).

Souches contrôles positifs (Incubation 2 à 8 jours sur gélose PDA 30 °C +/- 2 °C) :

* *Aspergillus flavus* ATCC® 204304 (LSPQ-0589)
* *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404 (optionnel)

Contrôle négatif : Laisser sécher 0,5 µl d’acide formique (solution 2) + 0,5 µl d’acétonitrile (solution R3) sur la cible. Ajouter 1 µl de Matrice VITEK® MS-CHCA.

## Précautions spéciales

* Toujours utiliser des gants non poudrés lors de la manipulation des lames VITEK® MS-DS.
* S'assurer de ne pas prélever de gélose lors du prélèvement de spécimen.

|  |
| --- |
| **Note** : La solution d’acétonitrile (solution R3) est très volatile. Minimiser le temps d’ouverture et s’assurer de bien refermer les tubes pour éviter perte par évaporation. |

### Risques biologiques

Les champignons filamenteux en culture peuvent générer d’importante quantité d’aérosols. Leur manipulation doit se faire en tout temps sous une enceinte de sécurité biologique (ESB) avec l’équipement de protection approprié (gants, blouse) pour réduire le risque d’infection respiratoire.

Les champignons de groupe de risque 3 (GR3 : *Blastomyces, Coccidioides, Histoplasma, Paracoccidioides et Cladophialophora bantiana*) présentent un risque d’infection respiratoire élevé et ne doivent être manipulés que dans un laboratoire de niveau de confinement détenant un permis de GR3 de l’ASPC. En cas de doute faire suivre cultures au LSPQ.

### Risques chimiques

Les réactifs suivants présentent un risque chimique : Éthanol 70 % (solution R1), Acide formique (solution R2), Acétonitrile (solution R3), Matrice VITEK®MS-CHCA. Selon le cas, ils sont inflammables, corrosifs et/ou toxiques. Veuillez-vous référer à la fiche signalétique SIMDUT pour plus de détail.

## Étapes / procédure analytique

### Préparation des réactifs maison (optionnel) : (annexe 1)

### Extraction en tube pour champignons filamenteux (moisissures)

|  |
| --- |
| **Attention** : Les champignons filamenteux doivent toujours être travaillés à l’intérieur d'une enceinte biologique classe II (ESB) avec équipements de protections personnelles adéquats.  La manipulation des champignons de GR3 n’est autorisée que dans un laboratoire de NC3 détenant un permis de l’ASPC. Utilisez toujours des désinfectants de haut-niveau (eau de javel ou peroxyde d’hydrogène accéléré) pour les champignons de GR3. |

1. À l'intérieur d’une l'ESB, préparer et identifier une série de microtubes de 1,5 ou 2 mL. Ajouter à chacun 900 μl d’éthanol 70 % (solution R1). Refermer les tubes pour éviter l’évaporation.
2. Pour chacun des spécimens (sous ESB) :

* Humidifier un écouvillon stérile dans de l'eau déionisé stérile (Ultrapure).
* Presser l’écouvillon sur la paroi du tube pour essorer et bien retirer l'excédent de liquide.
* Avec l’écouvillon humidifié, prélever une section d’environ 1 à 2 cm² de la culture en privilégiant le pourtour de la colonie pour récupérer des spores et des hyphes. Porter attention pour ne pas prélever de gélose.

1. Remettre en suspension le matériel fongique prélevé dans un des microtubes identifiés, préparé à l’étape 1 contenant 900 μl d’éthanol 70 % (solution R1). Jeter l'écouvillon.
2. Bien mélanger au vortex (5 secondes).

|  |
| --- |
| **Note** : L’extrait peut être conservé jusqu’à 8 heures dans l’éthanol 70% (solution R1) sans perte de performance.  La majorité des champignons sont inactivés après cette étape si maintenus dans la solution R1 plus de 10 min. |

1. Centrifuger 2 minutes à 10000 RPM (vitesse de 10 000 à 14 000 x g).
2. Éliminer le surnageant à l'aide d'une pipette (une pipette de transfert à bout effilé peut aussi être utilisée) en prenant soin de ne pas déplacer le culot.

|  |
| --- |
| **Note** : Après cette étape d’inactivation dans l’EtOH, les champignons de GR2 peuvent être travaillés hors d’une ESB sur un banc de travail. Par mesure de précaution, on procèdera sous ESB s’il y a suspicion qu’il puisse s’agir d’un champignon de GR3. |

1. Ajouter 40 μL d’acide formique 70 % (solution R2) et **mélanger au vortex**.

|  |
| --- |
| **Note** : Bien vortexer pour s’assurer que la suspension est homogène. Ne pas ajouter l’acétonitrile à cette étape, ce qui empêcherait la solubilisation complète de l’extrait. |

1. Ajouter 40 μl d'acétonitrile (solution R3) et **mélanger au vortex**.

|  |
| --- |
| **Note** : L’acétonitrile étant très volatile, maintenir fermé le plus possible le tube contenant la solution pour éviter l’évaporation. |

1. Centrifuger à nouveau pendant 2 minutes à 10000 RPM (vitesse de 10 000 à 14 000 x g). Le manufacturier garantit que l’inactivation est totale après cette étape.

|  |
| --- |
| **Note** : Procéder rapidement à l’étape suivante pour éviter la remise en suspension du culot. Si cela se produit, recentrifuger avant de passer à l’étape 10.  Des essais effectués au LSPQ ont démontré que l’extrait peut être conservé à cette étape jusqu’à 24 heures au frigo sans perte de performance. Si c’est le cas, on doit par contre recentrifuger avant de déposer sur la lame. L’acétonitrile étant très volatile, maintenir fermé le plus possible le tube contenant la solution pour éviter l’évaporation. |

1. Déposer sur la lame VITEK® MS-DS **1 μl de surnageant**. Laisser sécher. Pour réduire les reprises, nous vous recommandons de faire les dépôts en duplicata (2 spots).
2. Ajouter **1 μl de matrice** VITEK® MS-CHCA sur chaque échantillon. Laisser sécher à nouveau.
3. Procéder à l’analyse des cibles selon la procédure du manufacturier en sélectionnant qu’il s’agit d’un champignon « Fungi ».

|  |
| --- |
| **Note** : Lorsque les lames VITEK® MS-DS ont été préparées, elles doivent être analysées dans les 72 heures suivantes (conservées à température ambiante dans contenant d’origine). |

### Analyse des cibles VITEK® MS-DS

1. Se référer à la procédure du manufacturier pour la mise en marche de l'appareil et l’analyse des cibles. S’assurer que la banque pour les champignons « fungi » est sélectionnée avant de lancer l’analyse.
2. S’assurer que les dépôts sont **complètement secs** avant l’introduction de la lame dans l’appareil.

### Résultats

1. Se référer à la procédure du manufacturier pour l'interprétation et le suivi des résultats.
2. Seules les genres et espèces se trouvant dans la Base de connaissances V3.2 – (Usage Clinique) peuvent être émis comme résultat au client pour un spécimen clinique de routine (voir section 5.7 ci-dessous).

## Interprétation et rapport

Se référer à la « Liste maîtresse des utilisateurs du groupe MALDI-TOF » en vigueur sur <https://www.inspq.qc.ca/lspq/services/support-aux-laboratoires-maldi-tof> pour interprétation et identification à rapporter selon espèce.

* Résultats concordants acceptés - ≥ 90 % : rapporter au client.\*
* Résultats à confirmer - 89.9 à 60,0 % : faire tests d’identification supplémentaires et/ou soumettre à laboratoire de référence si requis.
* Résultats non conformes à rejeter - < 60 % : faire tests d’identification supplémentaires et/ou soumettre à laboratoire de référence si requis.
* Résultat - aucune identification : faire tests d’identification supplémentaires et/ou soumettre à laboratoire de référence si requis.

\*Si l’espèce n’est pas inscrite comme ayant été validée sur la liste maîtresse, faire suivre au LSPQ pour confirmation par séquençage.

## Valeurs d’alertes ou critiques

L’identification d'une souche de GR3 (*Blastomyces, Coccidioides, Histoplasma, Paracoccidioides* et *Cladophialophora bantiana*) doit être rapportée immédiatement au microbiologiste de garde au laboratoire pour s’assurer qu’il n’y a pas eu de bris de procédure et d’exposition lors de la manipulation de ces agents pathogènes.

## Validation par un microbiologiste-infectiologue

Tous les rapports positifs doivent être validés par le microbiologiste-infectiologue de garde au laboratoire.

## Acheminement du rapport

Selon la procédure de votre laboratoire.

# Politiques / procédures / formulaires / documents associés

Selon les procédures de votre laboratoire.

# Références

* bioMérieux : User Manual 4501-2233-C-fr-NA-VITEK MS Clinical Use-IVDWorkflow[1] 2012/05
* bioMérieux : VITEK® MS Base de connaissances V3.2 - Usage Clinique, 2018. 161150-556 - A.
* bioMérieux : VITEK® MS MOULD KIT (REF 415680), 20892 B – fr – 2015/05.
* bioMérieux : Statement of Inactivation of Moulds by Sample Processing, June 2016. P/N: 008559-1.

# Diffusion

Selon les procédures de votre laboratoire.

# Versions

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Versions** | **Date** | **Auteurs** | **Modifications** |
| 1.0 | 2018-10-13 | Philippe Dufresne  Marc-Christian Domingo  Jeannot Dumaresq  Jean Longtin | Rédaction  Révision  Révision  Révision |
| 2.0 | 2019-05-03 | Philippe Dufresne  Michel Lebrun  Marc-Christian Domingo | * Section 5 : Mise à jour de la numérotation pour alléger le texte. * 5.4 : Correction description solutions R2 et R3 inversée; * 5.6.1 : Omission de page corrigé pour annexe 1; * 5.7 : section retirée (sources potentielles de variation des résultats); * 5.7 (anciennement 5.8) : Interprétation : seuil fixé à 90 % pour résultat accepté, 60.0-89.9 % à vérifier et < 60 % rejeté. Utilisateurs référés à la liste maîtresse du groupe utilisateur MALDI-TOF; * 5.6.4, 2) et section 7 (références) : mise à jour à la banque de connaissance clinique V3.2. |
| 2.1 | 2019-11-22 | Philippe Dufresne | * Correction de coquilles dans le texte * Correction d’omissions à la liste des consommables |

1. Préparation des réactifs maison
   1. Fournisseurs recommandés\*

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Produit** | **Grade** | **Fournisseur/ Distributeur** | **No. Catalogue** |
| Acetonitrile | Biotech >99.93 % (v/v) | SIGMA-ALDRICH  <https://www.sigmaaldrich.com> | 494445-100ML |
| Acide formique | ACS >96 % (v/v) | SIGMA-ALDRICH  <https://www.sigmaaldrich.com> | 695076-100ML |
| Alcool éthylique anhydre | 99.9 % (<0,1 % eau) | Les Alcools de Commerce | P016EAAN |
| Eau | Ultrapure (Biotech)  cert. sans DNase/RNase | Invitrogen / FisherScientific  <https://www.fishersci.ca> | LS10977015 |
| Microtube | Polypropylène, 2 mL, vissable avec joint caoutchouc, stérile | Starstedt/ FisherScientific <https://www.fishersci.ca> | Réf : 72.793.005  NC0418367 |

**\*Note :** Les fournisseurs et distributeurs ne sont fournis qu’à titre indicatif et pour assister les laboratoires dans l’élaboration de leur protocole. D’autres fournisseurs pourront être utilisés s’ils offrent des produits équivalents. Une validation comparative avec la trousse VITEK® MS MOULD KIT est alors requise.

* 1. Matériel et réactifs
* Acetonitrile (grade Biotech)
* Alcool éthylique anhydre
* Acide formique (grade ACS)
* Eau ultrapure (grade biologie moléculaire)
* Tube conique de 50 mL de polypropylène
* Microtubes 2 mL de polypropylène
* Seringue 5 mL
  1. Étapes / procédure

1. **Préparation d'aliquots de travail d’acétonitrile**

|  |
| --- |
| **Note** : Pour limiter l’évaporation du produit, nous recommandons l’utilisation d’une bouteille munie d’un septa en caoutchouc et l’utilisation d’une seringue lorsque vous prélevez un aliquote. |

* À l’aide d’une seringue stérile de 5 mL en polypropylène, prélever 2 mL de la bouteille mère. Aliquoter 1-2 mL dans des microtube de 2 mL de polypropylène.
* Conserver entre 2-25 °C (maximum : 2 semaines).

1. **Préparation solution 70% acide formique (aliquot 1 mL)**

* Pipetter 300 µL d’eau Ultrapure dans un tube microtube de 2 mL en polypropylène.
* Ajouter 700 µL d’acide formique pure. Bien mélanger avec un vortex
* Conserver entre 2-25 °C (maximum : 2 semaines).

1. **Préparation solution 70% alcool éthylique.**

* Dans un tube conique de 50 mL en polypropylène, ajouter 35 mL d’alcool anhydre (conc. > 99.9 %).
* Ajouter 15 mL d’eau Ultrapure. Bien mélanger avec un vortex.
* Conserver entre 2-25 °C (maximum : 2 semaines).
  1. Contrôle de la qualité
* Les réactifs chimiques (acétonitrile, alcool éthylique anhydre et acide formique) peuvent être conservés un maximum de 6 mois après ouverture.
* Les solutions de travail et dilutions peuvent être conservées un maximum de 2 semaines après leur préparation.
* La souche d'étalonnage (*Escherichia coli* ATCC® 8739), la souche contrôle positif (*Aspergillus flavus* ATCC® 204304 ou *Aspergillus brasiliensis* ATCC® 16404) et le contrôle négatif doivent donner les résultats attendus (voir section 5.4– Matériel et procédure de contrôle de la qualité) avec les réactifs préparés.