



## Article Original

## Profil des Levures Isolés des Expectorations et des Lavages Broncho-Alvéolaires à L'hôpital Jamot de Yaoundé et Identifiés par Spectrométrie de Masse

### *Profile of yeast isolated from expectorations and broncho-alveolar washes at Jamot hospital in yaounde and identified by mass spectrometry*

Ngando Laure<sup>1,2</sup>, Agokeng Armel<sup>3</sup> Tafen Kami Toukam<sup>4</sup>, Moutmoune Edith<sup>4</sup>, Douksouna Ngassadi<sup>4</sup> Gonsu Hortense<sup>1,4</sup>, Ranque Stéphane<sup>3</sup>, Same Ekobo Albert Legrand<sup>1,5</sup>

## RÉSUMÉ

**Introduction.** Les nouveaux outils de diagnostic nous permettent non seulement de rechercher la présence de champignons spécifiques dans les produits pathologiques directement, mais également par la culture et identifier parfaitement le champignon. **Matériels et méthodes.** Etude descriptive et transversale qui a été menée de Mai 2023 à Mai 2024. Les échantillons ont été collectés auprès de patients reçus à l'hôpital Jamot de Yaoundé et présentant les signes d'infections respiratoires basses. Nous avons mis les échantillons en culture dans une boîte de Pétri contenant de la Gélose Dextrose de Sabouraud (SDA) associée au chloramphénicol et gentamicine. Les cultures ont poussés entre 24h et 48h. Les colonies de levures ont été isolées. Les échantillons positifs ont été conservés dans un bouillon de cerveau et de cœur additionné de 15% de glycérol et conservés à -20 °C puis à -80 °C jusqu'à l'analyse MALDI-TOF MS. L'identification des espèces par MALDI-TOF a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille, France. **Résultats.** L'effectif de notre population était de 310 avec une prédominance masculine et la tranche d'âge la plus représentée était celle de 41 à 51 ans avec une moyenne d'âge de  $40,9 \pm 16,82$ . En moyenne, nous avons de bons scores d'identification des levures par le MALDI-TOF. Pas d'association significative entre les levures isolées et le sexe. Pas d'association significative entre les levures isolés et l'âge. **Conclusion.** Le Profil de levures identifiées sur MALDI-TOF était en moyenne d'un bon Score avec *Candida albicans* qui était la levure la plus représentée. Nous ne notons pas d'association entre l'âge, le sexe et les levures identifiés.

## ABSTRACT

**Introduction** New diagnostic tools allow us not only to search for the presence of specific fungi in pathological products directly, but also through culture and perfectly identify the fungus. **Material and methods** Descriptive and cross-sectional study which was carried out from May 2023 to May 2024. The samples were collected from patients received at the Jamot hospital in Yaoundé and presenting signs of lower respiratory infections. We cultured the samples in a Petri dish containing Sabouraud Dextrose Agar (SDA) combined with chloramphenicol and gentamicin. The cultures grew between 24 and 48 hours. The yeast colonies were isolated. Positive samples were preserved in brain and heart broth supplemented with 15% glycerol and stored at -20°C then -80°C until MALDI-TOF MS analysis. Species identification by MALDI-TOF was carried out at the Parasitology-Mycology Laboratory of IHU Méditerranée Infection, Marseille, France. **Results:** The number of our population was 310 with a male predominance and the most represented age group was 41 to 51 years old with an average age of  $40.9 \pm 16.82$ . On average we had good yeast identification scores by MALDI-TOF. No significant association between isolated yeasts and sex. No significant association between isolated yeasts and age. **Conclusion:** The Profile of yeasts identified on MALDI-TOF had on average a good score with *Candida albicans* which was the most represented yeast. We do not note any association between age, sex and the yeasts identified.

1 Département de Microbiologie, Parasitologie, Hématologie et Maladies infectieuses, Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun  
2 Laboratoire National de santé publique, Yaoundé, Cameroun  
3 Laboratoire de l'IUH Méditerranée Infection, Marseille, France  
4 Laboratoire de Bactériologie du CHUY, Yaoundé, Cameroun  
5 Laboratoire de Parasitologie, CHUY, Yaoundé, Cameroun

## Auteur correspondant :

Laure Ngando,  
Département de Microbiologie, Parasitologie, Hématologie et Maladies infectieuses, Faculté de Médecine et Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun  
Tel : 00237 699818148  
Email : [laurengando2013@gmail.com](mailto:laurengando2013@gmail.com)

**Mots-clés :** Profil, Levures, Expectorations et LBA, Hôpital Jamot, Spectrométrie de Masse.

**Keywords:** Profile, Yeasts, Sputum and BAL, Jamot Hospital, Mass Spectrometry

**POINTS SAILLANTS****Ce qui est connu du sujet :**

L'émergence des champignons microscopiques et la difficulté de diagnostic par les méthodes élémentaires

**La question abordée dans cette étude :**

Quel est le profil des levures isolées des expectorations et des liquides broncho-alvéolaires à l'hôpital Jamot de Yaoundé et identifiées par spectrométrie de masse ?

**Ce que cette étude apporte de nouveau :**

1. La spectrométrie de masse permet d'identifier certains champignons émergents comme *Ohmeri diutina*.
2. La spectrométrie de masse permet d'améliorer le profil des levures

**les implications pour la pratique, les politiques ou les recherches futures :**

Permet de nous familiariser à la spectrométrie de masse, l'implémenter dans les pays à revenus faibles et envisager des méthodes d'identification plus performantes.

**INTRODUCTION**

L'émergence des champignons microscopiques est à l'origine des progrès importants dans la connaissance épidémiologique et les nouvelles possibilités diagnostiques [1,2]. Les nouveaux outils de diagnostic nous permettent non seulement de rechercher la présence de champignons spécifiques dans les produits pathologiques directement, mais également par la culture et identifier parfaitement le champignon. Ces nouvelles méthodes dont l'une est précisément basée sur la spectrométrie de masse, dénommée MALDI-TOF MS (Matrix-Associated Laser Desorption and Ionisation, Time Of Flight), est apparue comme une technique alternative d'identification des champignons. Cette méthode présente certains avantages comme la rapidité, la fiabilité et son faible coût en ce qui concerne les consommables d'où l'intérêt de notre étude, connaître le profil des levures isolés des expectorations à l'hôpital Jamot de Yaoundé identifiés par spectrométrie de Masse (Maldi-TOF) [3].

**MATERIEL ET MÉTHODE**

Etude descriptive et transversale qui a été menée de Mai 2023 à Mai 2024. Les échantillons ont été collectés auprès de patients reçus à l'hôpital Jamot de Yaoundé et présentant les signes d'infections respiratoires basses. Le consentement a été obtenu de chaque patient inclus après information sur l'étude.

Nous avons collectés 310 échantillons d'expectorations et liquides broncho alvéolaires (LBA).

Nous avons mis les échantillons en culture dans une boîte de Pétri contenant de la Gélose Dextrose de Sabouraud (SDA) associée au chloramphénicol et gentamicine.

Les cultures ont poussés entre 24h et 48h. Les colonies de levures ont été isolées. Les échantillons positifs ont été conservés dans un bouillon de cerveau et de cœur additionné de 15 % de glycérol et conservés à -20 °C puis à -80 °C jusqu'à l'analyse MALDI-TOF MS.

L'identification des espèces par MALDI-TOF a été réalisée au Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'IHU Méditerranée Infection, Marseille, France.

Des isolats frais ont été obtenus à partir d'échantillons stockés après décongélation et inoculation sur milieu de Sabouraud associée au chloramphénicol et à la

gentamicine. Les cultures ont été incubées à 30°C. Les colonies isolées ont été traitées comme décrit par le fabricant : une colonie isolée a été prélevée à l'aide d'anses en plastique et a été suspendue dans un microtube contenant 900 p.L d'alcool éthylique anhydre (Carlo Erba SDS, Val de Reuil, France) et 300 p.L d'eau stérile (Eau HPLC, Prolabo, BDH, Fontenay-sous-Bois, France). Après une étape de centrifugation de 5 minutes à 13 000 tr/min, le culot a été remis en suspension dans 10 piL d'acide formique (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Après 5 minutes d'incubation, 10 piL d'acétonitrile (Prolabo BDH) ont été ajoutés. La suspension a ensuite été centrifugée à 13 000 tr/min pendant 2 min. Les extraits par isolat ont été déposés. Enfin, les échantillons ont été recouverts de 1 p,L de matrice HCCA (acide a-cyano-4-hydroxycinnamique) (Sigma-Aldrich, Lyon, France). Les analyses MALDI-TOF MS ont été réalisées au laboratoire de l'IHU, à Marseille, France, utilisant un système Microflex LT (Bruker Daltonics GmbH, Brême, Allemagne). Le logiciel Biotyper a comparé le profil protéique des micro-organismes obtenus à partir des spectres de référence. Pour la validation clinique, l'identification des spectres avec les valeurs logscore associées, a été réalisée avec le Biotyper en utilisant soit la bibliothèque interne (5945 spectres), soit la base de données Bruker disponible dans le commerce dédiée aux champignons (4111 spectres). Les valeurs Logscore n'ont donc pas été strictement utilisées comme critères interprétatifs pour la fiabilité de l'identification, mais ont été fournies pour indiquer que selon le fabricant, des scores < 1,70 indiquent une identification peu fiable, tandis que des scores de 1,70 à 1,99 et > 2,0 indiquent une identification acceptable au niveau du genre et de l'espèce, respectivement [4].

**RÉSULTATS****Les caractères sociodémographiques des patients**

L'effectif de notre population était de 310 avec une prédominance masculine et la tranche d'âge la plus représentée était celle de 41 à 51 ans avec une moyenne d'âge de 40,9 ± 16,82 (Tableau I).

**Tableau I** : les caractères sociodémographiques des patients

Variable	Effectif	Pourcentage
<b>Sexe</b>		
Masculin	168	54,2
Féminin	142	45,8
<b>Age</b>		
<21 ans	33	10,6
[21-31]ans	65	21,0
[31-41]ans	58	18,7
[41-51]ans	69	22,3
[51-61]ans	41	13,2
[61-71]ans	32	10,3
≥ 71 ans	12	3,9

**Le Profil des Levures isolées par MALDI –TOF**

Le *Candida albicans* était la levure la plus représentée avec 56,6% ; 19,4% de cultures n'étaient pas disponibles (Tableau II).

**Tableau II : le profil des levures isolées par MALDI-TOF**

Variable	Effectif	Pourcentage
<b>Levures isolées</b>		
<i>Candida albicans</i>	174	56,1
<i>Candida tropicalis</i>	19	6,1
<i>Candida parapsilosis</i>	12	3,9
<i>Kodamaea ohmeri</i>	8	2,6
<i>Diutina rugosa</i>	8	2,6
<i>Candida krusei</i>	4	1,3
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4	1,3
<i>Candida glabrata</i>	3	1
<i>Candida haemulonii</i>	3	1
ND	60	19,4
Autres *	15	4,8

\* = *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lusitanae*, *Cryptococcus neoformans*, *Enterobacter* sp, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Orthopsilosis*, *Pichia caribbia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sacchomyces paradoxus* avec 1 cas chacun, *Enterobacter cloacae* 2, *Enterobacter kobei*

### Les scores d'identification des différentes levures par la Maldi-Toff (spectrométrie de masse)

En moyenne, nous avons de bons scores d'identification des levures par le MALDI-TOF (Tableau III).

### L'association entre les levures isolées et le sexe

Pas d'association significative entre les levures isolées et le sexe (Tableau IV).

### L'association entre les levures isolées et l'âge

Pas d'association significative entre les levures isolées et l'âge (Tableau V).

**Tableau III : les scores d'identification des différentes levures par la Maldi-Toff (spectrométrie de masse)**

Variable	Effectif	Moyenne ± ET	Médiane (IQ)	Min -Max	Mode
Score d'identification	278	2,06 ± 0,32	2,11 (1,91-2,29)	1,1-2,99	2,33

**Tableau IV : association entre les levures isolées et le sexe**

Variable indépendante	Total	Sexe		OR (IC à 95%)	Valeur p
		Masculin n (%)	Féminin n (%)		
<i>Candida albicans</i>	174 (56,1)	97 (55,7)	77 (44,3)	1,2 (0,7-1,8)	0,535
<i>Candida tropicalis</i>	19 (6,1)	6 (31,6)	13 (68,4)	0,4 (0,1-0,99)	0,041
<i>Candida parapsilosis</i>	12 (3,9)	5 (41,7)	7 (58,3)	0,6 (0,2-2)	0,374
<i>Kodamaea ohmeri</i>	8 (2,6)	3 (37,5)	5 (62,5)	0,5 (0,12-2,1)	0,477
<i>Diutina rugosa</i>	8 (2,6)	7 (87,5)	1 (12,5)	6,1 (0,7-50)	0,074
<i>Candida krusei</i>	4 (1,3)	4 (100)	0 (0)	//	0,128
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4 (1,3)	2 (50)	2 (50)	0,9 (0,1-6,2)	1,000
<i>Candida glabrata</i>	3 (1)	1 (33,3)	2 (66,7)	0,4 (0,04-4,7)	0,595
<i>Candidahaemulonii</i>	3 (1)	3 (100)	0 (0)	//	0,253
Autres	15 (5,4)	7 (46,7)	8 (53,3)	0,7 (0,3-2,1)	0,580
ND	60 (19,4)	33 (55)	27 (45)	1 (0,6-1,8)	1,000

**Tableau V : association entre les levures isolées et l'âge**

Variables	Total	Age				Valeur p
		<21ans	[21-41]ans	[41-61]ans	≥ 61ans	
<i>Candida albicans</i>	174 (56,1)	23 (13,2)	63 (36,2)	63 (36,2)	25 (14,4)	0,291
<i>Candida tropicalis</i>	19 (6,1)	1 (5,3)	7 (36,8)	7 (36,8)	4 (21,1)	0,736
<i>Candida parapsilosis</i>	12 (3,9)	0 (0)	7 (58,3)	5 (41,7)	0 (0)	0,228
<i>Kodamaea ohmeri</i>	8 (2,6)	0 (0)	3 (37,5)	2 (25)	3 (37,5)	0,233
<i>Diutina rugosa</i>	8 (2,6)	0 (0)	6 (75)	2 (25)	0 (0)	0,181
<i>Candida krusei</i>	4 (1,3)	0 (0)	2 (50)	2 (50)	0 (0)	0,716
<i>Pichia kudriavzevii</i>	4 (1,3)	0 (0)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0,801
<i>Candida glabrata</i>	3 (1)	0 (0)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0)	0,656

## DISCUSSION

La fréquence des levures est variable en fonction des différentes conditions climatiques, professionnelles et socio-économiques. Les levures sont les mycoses les plus courantes [5].

Notre étude a été réalisée chez des patients présentant des symptômes d'infection pulmonaire basse. Toutefois, le deuxième constat concernant la tranche d'âge n'est pas en phase avec nos constatations. En effet, la tranche d'âge la plus touchée par les levures se situait entre 41 et 51 ans, correspondant aux adultes âgés. La culture est très

importante et spécifique pour différencier phénotypiquement les espèces de levures [6]. Nous avons constaté avec la culture fongique un taux de positivité de 80,7%. Ce taux peut être considéré comme ceux constatés en Égypte avec 71,5 % [7], en Iran avec 85,7 % [8] et en Italie avec 98,6 % [9]. Cependant, un taux moindre a été constaté au Canada avec 43,8 % [9]]. Ces différences peuvent s'expliquer par les milieux de culture utilisés. La puissance du MALDI-TOF MS dans l'identification des champignons et des bactéries, avec une précision d'identification de 94,2 % au niveau de l'espèce sur des isolats testés dans un laboratoire en Afrique tropicale, a déjà été démontrée [4]. Ainsi, les résultats de cette étude pourraient servir de base à de futures études épidémiologiques sur les levures en utilisant cette même technique.

### CONCLUSION

L'effectif de notre population était de 310 avec une prédominance masculine et la tranche d'âge la plus représentée est celle de 41 à 51 ans avec une moyenne d'âge de  $40,9 \pm 16,82$ . Le *Candida albicans* était la levure la plus représentée avec 56,6% ; 19,4% de cultures n'étaient pas disponibles. En moyenne, nous avons de bons scores d'identification des levures par le MALDI-TOF. Nous ne notons pas d'association significative entre les levures isolées et le sexe et aussi pas d'association significative entre les levures isolés et l'âge.

### CONFLIT D'INTERETS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt.

### RÉFÉRENCES

1. Chabasse D, Guiguen C, Contet-Audonnet N. Abrégé de mycologie médicale. *Masson (éd)*, Paris, 1999.
2. Chandener J, Desoubieux G. La transition épidémiologique des mycoses en Afrique subsaharienne : de la surface vers la profondeur. *Bull. Soc. Pathol. Exot*, 2015 ; 108 : 41-45.
3. Lecellier A. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat en Science, Reims, 2013.  
<http://www.theses.fr/2013REIMS023/document>
4. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie diagnostique clinique. *FEMS Microbiol Rev* 2012 ; 36 : 380-407
5. Rodop G, Saracli MA, Gümrül R, Taner Yildiran S. Disrnburion des espèces de *Malassezia* chez des patients atteints de pityriasis versicolor en Turquie. *J Mycol Med* 2014 ; 24 : 117-23.
6. Becker P.T, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification d'isolats de champignons filamenteux par spectrométrie de masse MALDI-TOF : évaluation clinique d'une bibliothèque de spectres de référence étendue. *Med Mycol* 2014 ; 52 : 826-34.
7. Croxatto A, Prod'homme G, Greub G. Applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF en microbiologie diagnostique clinique. *FEMS Microbiol Rev* 2012 ; 36 : 380-407.
8. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, et al. Identification de routine des moisissures en laboratoire clinique par spectrométrie de masse à temps de vol par désorption et ionisation laser assistée par matrice. *PLoS One* 2011 ; 6 : e28425.
9. Becker P.T, de Bel A, Martiny D, Ranque S, Piarroux R, Cassagne C, et al. Identification d'isolats de champignons filamenteux par spectrométrie de masse MALDI-TOF : évaluation clinique d'une bibliothèque de spectres de référence étendue. *Med Mycol* 2014 ; 52 : 826-34.