



**Université de POITIERS**  
**Faculté de Médecine et de Pharmacie**

**ANNEE 2013**

**Thèse n°**

**THESE**  
**POUR LE DIPLOME D'ETAT**  
**DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
(arrêté du 17 Juillet 1987)

présentée et soutenue publiquement  
le 19 Novembre 2013  
par Monsieur FERRANT Yohan  
né le 23 février 1984

Carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC (bioMérieux) :  
Evaluation de ses performances et comparaison à d'autres systèmes  
d'identification de bactéries anaérobies et de corynébactéries au Laboratoire de  
microbiologie du C.H.U. de Poitiers.

Composition du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Denis SARROUILHE, Professeur de Physiologie

Membres :

Madame Sarah AYRAUD-THEVENOT, Maître de Conférences

Monsieur Pierre SALLEE, Docteur en Pharmacie

Directeur de thèse :

Madame Blandine JANVIER, Bactériologiste



**PHARMACIE**

**Professeurs**

- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- JOUANNETAUD Marie-Paule, Chimie Thérapeutique
- LEVESQUE Joël, Pharmacognosie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

**Maîtres de Conférences**

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

**PAST - Maître de Conférences Associé**

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

**Professeur 2<sup>nd</sup> degré**

- DEBAIL Didier

**Maître de Langue - Anglais**

- LILWALL Amy

# REMERCIEMENTS

A Monsieur Denis Sarrouilhe,

Professeur de Physiologie à la Faculté de Pharmacie de Poitiers,  
Qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon Jury de thèse.  
Je vous remercie particulièrement pour votre écoute et pour la célérité avec laquelle vous avez répondu à mes interrogations.

A Madame Blandine Janvier,

Bactériologiste au Laboratoire de microbiologie du C.H.U. de Poitiers,  
Qui m'a fait l'honneur d'être la Directrice de ma thèse.  
En plus de la confiance que vous m'avez apporté, vous êtes restée continuellement disponible et de bons conseils. Vous avez apporté du sérieux dans mon travail ainsi que tout ce dont j'avais besoin pour traiter au mieux ce sujet que vous-même m'avez proposé. Je vous remercie particulièrement pour votre patience qui a été grandement sollicitée.

A Madame Sarah Ayrault-Thévenot,

Professeur d'Epidémiologie à la Faculté de Pharmacie de Poitiers,  
Qui m'a fait l'honneur d'être membre de mon Jury.  
Pour votre gentillesse et votre écoute.

A Monsieur Pierre Sallée,

Docteur en Pharmacie et Pharmacien titulaire d'officine.  
Merci d'avoir accepté de faire partie de mon Jury et d'avoir pris le temps de juger ce travail. C'est toi qui m'as fait découvrir ce métier. Je n'ai rien oublié de tes précieux conseils qui m'ont permis d'évoluer au fil des années et me suis grandement inspiré de tes qualités et de ton expérience. Merci pour tous ces bons moments passés ensemble.

A Madame Hélène Filhastre,

Pour son application, sa disponibilité et sa bienveillance qui ont permis de couvrir facilement la distance séparant Poitiers de Mayotte.

A mes parents et à mon frère,

Qui ont toujours été là pour moi, dans les plus beaux moments comme dans les plus difficiles. Par votre présence, votre amour et votre patience, vous m'avez toujours soutenu et accompagné. Vous êtes ceux qui ont fait en sorte que j'en sois là aujourd'hui. Vous avez réussi en faisant de votre mieux et je n'ai de cesse de prendre exemple sur vous dans ma vie. Soyez certains de la tendresse et de l'amour que je vous porte.

A Camille,

Pour ton intelligence, ton enthousiasme et ta générosité qui ont largement contribué à ce que la rédaction de cette thèse se déroule dans de bonnes conditions. Je te suis reconnaissant de m'avoir aidé et suis très fier de t'avoir à mes côtés. Je m'emploierai à t'apporter le soutien que tu mérites dans tes projets futurs. D'autant plus que nous avons toute la vie devant nous...

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
LES BACTERIES ANAEROBIES .....	2
I. Généralités .....	2
A. Caractéristiques principales .....	2
1. Toxicité de l'oxygène .....	2
2. Classification des anaérobies (Taxonomie) .....	3
II. Origine des bactéries anaérobies .....	6
A. Environnement .....	6
B. Flore commensale anaérobie chez l'homme .....	6
1. Peau .....	7
2. Nez .....	7
3. Bouche et pharynx .....	7
4. Tractus digestif .....	8
5. Tractus génito-urinaire .....	8
III. Facteurs de pathogénicité des bactéries anaérobies .....	8
A. Synergie bactérienne .....	9
B. Déficience immunitaire .....	9
C. Inhalation du contenu stomacal .....	9
D. Ischémie tissulaire .....	9
E. Sécrétion d'enzymes et de toxines .....	9
F. Production de gaz .....	10
IV. Scénario typique d'une infection à anaérobie .....	11
A. Destruction tissulaire initiale .....	11
B. Développement de l'infection primaire .....	11
C. Dissémination .....	11
D. Colonisation .....	11
E. Abcédation .....	12
F. Complications systémiques .....	12
LES BACTERIES ANAEROBIES AU LABORATOIRE .....	13
I. Généralités .....	13
A. Historique .....	13

1.	Postulats de Henle-Koch.....	13
B.	Diagnostic de laboratoire en infectiologie .....	14
1.	Conditions préalables et méthodologie générale .....	14
2.	Matériel d'analyse .....	14
3.	Sécurité dans un laboratoire d'analyse .....	15
II.	Recherche de bactéries anaérobies .....	15
A.	Objectifs.....	15
B.	Description .....	16
1.	Prélèvement .....	16
2.	Analyse .....	17
	LES CORYNEBACTERIES.....	28
I.	Généralités .....	28
A.	Caractères morphologiques et bactériologiques .....	28
B.	Habitat.....	28
II.	Pouvoir pathogène .....	29
III.	Diagnostic bactériologique.....	31
A.	Objectif .....	31
B.	En pratique .....	31
	Carte ANC – VITEK® 2 Systems (bioMérieux).....	33
I.	Informations générales du produit .....	33
A.	Applications.....	33
B.	Description .....	34
C.	Conditions de conservation et de manipulation .....	36
II.	Procédure d'utilisation .....	36
A.	Etape préalable.....	36
B.	Echantillon bactérien.....	36
1.	Conditions de culture .....	37
2.	Préparation de l'inoculum bactérien.....	37
C.	Incubation et lecture .....	39
III.	Résultats .....	40
A.	Niveaux de fiabilité .....	40
B.	Pourcentages de probabilité .....	41
C.	Tests complémentaires .....	42
D.	Informations complémentaires.....	44

E.	Tests autonomes ANC .....	44
	Evaluation de la carte VITEK® 2 ANC : Travail expérimental.....	45
I.	Objectif .....	45
II.	Matériel et méthodes.....	46
A.	Souches bactériennes étudiées.....	46
B.	Mode opératoire .....	47
1.	Utilisation des systèmes VITEK® 2.....	47
2.	Contrôle qualité.....	48
3.	Séquençage .....	48
III.	Résultats .....	52
A.	Résultats généraux .....	52
B.	Tests complémentaires, séquençages et observations.....	59
1.	Genre <i>Bacteroides</i> .....	60
2.	Genre <i>Fusobacterium</i> .....	60
3.	Genre <i>Prevotella</i> .....	61
4.	Genre <i>Veillonella</i> .....	62
5.	Genre <i>Actinomyces</i> .....	62
6.	Genre <i>Bifidobacterium</i> .....	62
7.	Genre <i>Clostridium</i> .....	62
8.	Genre <i>Eggerthella</i> .....	64
9.	Genre <i>Propionibacterium</i> .....	64
10.	Genre <i>Fingoldia</i> .....	64
11.	Genre <i>Peptoniphilus</i> .....	64
12.	Genre <i>Peptostreptococcus</i> .....	65
13.	Genre <i>Corynebacterium</i> .....	65
14.	Genre <i>Arcanobacterium</i> .....	66
C.	Résultats finaux .....	66
IV.	Discussion .....	72
	CONCLUSION .....	85
	SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	86
	ANNEXES.....	91
	RESUME .....	99

## Liste des figures

Figure 1: Aspect du milieu VF avant (gauche) et après (droite) inoculation et incubation d'une bactérie aéro-anaérobie facultatif. ....	2
Figure 2: Principe schématisé de la coloration de Gram.....	18
Figure 3: Sachet d'anaérobiose AnaeroGen™. ....	21
Figure 4: Jarre.....	21
Figure 5: Galerie d'identification API® 20A. ....	24
Figure 6: Schéma d'une carte d'identification à utiliser avec le système VITEK® 2. ....	33
Figure 7 : Densitomètre.....	37
Figure 8 : Station Compacte Satellite®. ....	39
Figure 9 : Automate VITEK® 2 Compact.    Figure 10 : Automate VITEK® 2.....	39
Figure 11 : Informations sur une carte d'identification (ID) utilisée. ....	40
Figure 12 : Exemple de séquence automatique avec une couleur différente pour les quatre différents nucléotides. ....	51
Figure 13 : Aperçu Seqscape®. ....	51

Les visuels estampillés "propriété de bioMérieux" ont été utilisés avec leur consentement écrit.

## Liste des tableaux

Tableau 1: Principales bactéries anaérobies à Gram négatif isolées chez l'homme.....	4
Tableau 2: Principales bactéries anaérobies à Gram positif isolées chez l'homme.....	5
Tableau 3: Concentration bactérienne selon les sites anatomiques et ratio anaérobies / aérobies. ....	7
Tableau 4: Bactéries anaérobies pouvant être incriminées en fonction du contexte infectieux. ....	17
Tableau 5: Infections pour lesquelles les corynébactéries peuvent être incriminées. ....	30
Tableau 6 : Liste des genres et espèces bactériens identifiables par la carte ANC.....	34
Tableau 7 : Composition des puits de la carte ANC (les puits numérotés de 1 à 64 et non mentionnés dans ce tableau sont vides). ....	35
Tableau 8 : Conditions de culture utilisées dans cette étude. ....	37
Tableau 9 : Niveaux de confiance possibles attribués à la carte ANC.....	41
Tableau 10 : Tests complémentaires proposés par la carte VITEK® 2 ANC.....	43
Tableau 11 : Tests autonomes requis pour l'identification par la carte VITEK® 2 ANC.....	44
Tableau 12 : Origine de prélèvement des 66 souches cliniques étudiées. ....	46
Tableau 13 : Identification des 66 souches cliniques de bactéries anaérobies et corynébactéries par la carte ANC, sans application des tests complémentaires. ....	56
Tableau 14 : Souches incorrectement identifiées par la carte VITEK® 2 ANC, sans application des tests complémentaires.....	57

Tableau 15 : Identification par la carte ANC (sans application de tests complémentaires) des souches dont l'identification n'avait pas été concluante par API®. ....	58
Tableau 16 : Résultat des séquençages obtenus sur les souches incorrectement identifiées par VITEK®. ....	59
Tableau 17 : Identification, après intégration des tests additionnels, des 59 souches cliniques de bactéries anaérobies et corynébactéries par la carte ANC. ....	70
Tableau 18 : Souches incorrectement identifiées par la carte VITEK® 2 ANC, après considération des tests additionnels. ....	71
Tableau 19 : Identification par la carte ANC, après considération des tests additionnels, des souches dont l'identification par API® n'avait pas été concluante. ....	71
Tableau 20 : Performances de la carte VITEK® 2 ANC avant et après l'application des tests additionnels. ....	72
Tableau 21 : Espèces identifiables par différents systèmes d'identification. ....	82
Tableau 22 : Disparités des identifications des souches de bactéries anaérobies obtenues avec la carte ANC et le système API®. ....	83
Tableau 23 : Disparités des identifications des souches de corynébactéries obtenues avec la carte ANC et le système API®. ....	84

# INTRODUCTION

En pathologie humaine, les bactéries anaérobies sont responsables d'infections pouvant toucher un grand nombre de parties du corps humain. Que l'atteinte soit pleuro-pulmonaire, oto-rhino-laryngée, cutanée, intra-abdominale, gynécologique ou osseuse, les bactéries anaérobies peuvent être à l'origine d'infections modérées à sévères avec une mortalité et une morbidité élevées.

En pratique, les cliniciens traitent avec succès bon nombre de ces infections en supprimant les pathogènes anaérobies parfois involontairement au cours d'une antibiothérapie à large spectre. En effet, leurs mauvaises conditions de prélèvement et d'acheminement jusqu'au laboratoire ainsi que les délais de culture importants et les coûts élevés liés à leur recherche font des bactéries anaérobies des pathogènes sous diagnostiqués.

La gravité des infections causées par les bactéries anaérobies mérite que l'on s'attarde sur ces germes afin de mieux les connaître et mieux les identifier. Un diagnostic rapide et précis permet la mise en place d'une thérapeutique adaptée à l'inverse d'un traitement probabiliste incertain. On évitera ainsi des effets indésirables inutiles, des traitements parfois coûteux et l'apparition de résistances.

Cette étude a pour but d'évaluer l'efficacité d'un matériel d'identification automatique de la plupart des bactéries anaérobies et des espèces de corynébactéries fréquemment rencontrées en microbiologie clinique, et non encore utilisé au sein du Laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Poitiers au cours de cette étude : la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC.

Dans un premier temps, nous évoquerons des généralités sur les bactéries anaérobies et corynébactéries (habitat, pathogénicité et diagnostic) puis nous verrons comment elles peuvent être identifiées en laboratoire.

Par la suite, nous présenterons la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC de bioMérieux ainsi que les tenants et aboutissants du travail expérimental réalisé entre Janvier 2011 et Septembre 2012 au laboratoire du C.H.U. de Poitiers.

Pour finir, les résultats de l'identification de ces bactéries obtenus à l'aide de l'automate VITEK<sup>®</sup> seront comparés à ceux obtenus par les techniciens grâce aux galeries API<sup>®</sup> et/ ou au séquençage.

# LES BACTERIES ANAEROBIES

## I. Généralités

### A. Caractéristiques principales

#### 1. Toxicité de l'oxygène

Les bactéries anaérobies constituent un ensemble très complexe de bactéries ayant comme point commun l'incapacité, totale ou partielle, de cultiver en présence de dioxygène. Ce caractère connu depuis longtemps peut être aisément observé lors d'une culture de ces germes en anaérobiose simple en utilisant par exemple la gélose VF (Viande-Foie), milieu de culture utilisé en microbiologie pour étudier le type respiratoire d'une bactérie (donc ses rapports avec l'oxygène) (Figure 1). Les bactéries anaérobies ne se développant qu'à l'abri du dioxygène, elles coloniseront de fait la partie basse du milieu de culture.



#### Résultats

**Type aérobie strict :** culture en haut du tube (donc seulement en présence de dioxygène)

**Type aéro-anaérobie :** culture dans tout le tube (présence et absence de dioxygène)

**Type anaérobie strict :** culture en bas du tube (en l'absence de dioxygène)

**Type micro-aérophile :** culture en haut du tube, légèrement sous la surface (zone de pression faible en dioxygène mais dont la présence est indispensable)

Figure 1 : Aspect du milieu VF avant (gauche) et après (droite) inoculation et incubation d'une bactérie aéro-anaérobie facultatif. (Photographie personnelle)

Les bactéries anaérobies sont inhibées ou tuées par l'oxygène atmosphérique en raison de leur déficience en transporteurs d'électrons (1). Cette déficience entraîne la formation de composés toxiques comme l'ion superoxyde ( $O_2^-$ ) ou le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) qui possèdent un pouvoir oxydant puissant, dégradant les molécules organiques (ADN, protéines).

Des enzymes peuvent éliminer ces composés :

- la superoxyde dismutase
- la catalase
- les peroxydases.

Les êtres vivants qui ne possèdent pas ces enzymes meurent en présence d'oxygène et sont donc anaérobies strictes. Une bactérie anaérobie est donc incapable de se multiplier dans l'atmosphère normale et nécessite une atmosphère réduite en oxygène.

Le degré de sensibilité à l'oxygène est toutefois variable d'une espèce à l'autre. Ainsi, *Bacteroides fragilis*, parmi les espèces les moins sensibles, ne se multiplie pas lorsqu'il est exposé à l'air mais peut y survivre des heures, voire même plusieurs jours (2) alors que d'autres bactéries anaérobies strictes comme *Clostridium novyi* sont tuées si elles restent seulement quelques minutes au contact de l'air (3).

Certaines bactéries, dites E.O.S. (Extremely Oxygen Sensitive) ne peuvent survivre, même brièvement, en présence d'oxygène. Ces germes sont d'isolement difficile ; leur culture ne pourra s'obtenir que dans certaines conditions d'incubation.

## 2. Classification des anaérobies (Taxonomie)

Des infections à bactéries anaérobies ont été décrites dès l'Antiquité, mais c'est seulement en 1877 que Pasteur et Joubert ont cultivé la première bactérie anaérobie pathogène : *Clostridium septicum*.

A la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, les découvertes se sont multipliées avec Veillon, Welch, Nicolaïer, Vincent, etc. Ainsi dès 1898, grâce à Veillon, deux grands groupes de bactéries anaérobies ont été différenciés : la **flore tellurique**, exogène, toxigène, constituée de bactéries de l'actuel genre *Clostridium* (*C. tetani*, *C. botulinum*, *C. perfringens*, ...) et la **flore endogène** non toxigène mais virulente qui fut par la suite nommée "flore de Veillon".

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, de nombreux médecins et biologistes français ont contribué, par leurs observations cliniques et leurs travaux à l'Institut Pasteur, à une plus grande connaissance de ces bactéries et à leur classification. Depuis le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, des équipes américaines – Moore et ses collaborateurs au Virginia Polytechnic Institute ainsi que Finegold et ses collaborateurs à l'Université de Californie – ont également beaucoup apporté à la classification de ces bactéries.

Ils ont en outre amélioré et simplifié les techniques d'isolement et d'identification de ces bactéries permettant ainsi à la plupart des laboratoires de les rechercher et de les identifier selon les mêmes critères.

A la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, la nomenclature de ces bactéries a été régulièrement mise à jour selon les résultats des nombreux travaux réalisés. Ces dernières années, la taxonomie des bactéries anaérobies strictes a été en perpétuelle évolution, en particulier celle des bacilles à Gram négatif (4).

Quelques exemples de travaux ayant participé à leur classification :

- production des acides terminaux du métabolisme bactérien, analysée par chromatographie liquide en phase gazeuse (5) ;
- composition en acides gras de la paroi bactérienne (6) ;
- composition en bases de l'ADN, migration et étude du polymorphisme allélique des enzymes métaboliques (7) ;
- composition en quinones isoprénoïdes (8, 9) ;
- spectrométrie de masse (10).

Mais les plus grands bouleversements sont intervenus en fonction des résultats obtenus par la biologie moléculaire et notamment l'étude de la séquence du gène de l'acide ribonucléique ribosomal 16S (ARN, 16S) ou encore la technique d'hybridation ADN/ADN (11, 12).

La taxonomie des bactéries anaérobies a subi de profonds bouleversements en raison d'un intérêt plus grand pour ces bactéries longtemps ignorées et de méthodes d'étude de plus en plus performantes. Les tableaux 1 et 2 donnent une classification récente des principaux genres et espèces rencontrés chez l'homme.

Bacilles à Gram négatif	Cocci à Gram négatif
<p><b>Bacteroides</b>  groupe <i>fragilis</i> : <i>caccae</i>, <i>distasonis</i>, <i>eggherthii</i>, <i>fragilis</i>, <i>merdae</i>, <i>ovatus</i>, <i>stercoris</i>, <i>thetaiotaomicron</i>, <i>uniformis</i>, <i>vulgatus</i>  autres : <i>capillosus</i>, <i>coagulans</i>, <i>galacturonicus</i>, <i>pectinophilus</i>, <i>putredinis</i>, <i>pyogenes</i>, <i>splanchnicus</i>, <i>tectus</i>, <i>ureolyticus</i></p> <p><b>Bilophila</b> <i>wadsworthia</i></p> <p><b>Fusobacterium</b> <i>gonidiaformans</i>, <i>mortiferum</i>, <i>naviforme</i>, <i>necrophorum</i>, <i>nucleatum</i>, <i>russii</i>, <i>varium</i>, <i>ulcerans</i></p> <p><b>Leptotrichia</b> <i>buccalis</i>, <i>sanguinegens</i></p> <p><b>Porphyromonas</b> <i>asaccharolytica</i>, <i>cangingivalis</i>, <i>circumdentaria</i>, <i>endodontalis</i>, <i>gingivalis</i>, <i>levii</i>, <i>macacae</i>, <i>salivosa</i></p> <p><b>Prevotella</b> <i>bivia</i>, <i>buccae</i>, <i>buccalis</i>, <i>corporis</i>, <i>dentalis</i>, <i>denticola</i>, <i>disiens</i>, <i>enoeca</i>, <i>heparinolytica</i>, <i>intermedia</i>, <i>loescheii</i>, <i>melaninogenica</i>, <i>nigrescens</i>, <i>oralis</i>, <i>oris</i>, <i>oulorum</i>, <i>pallens</i>, <i>tanneriae</i>, <i>veroralis</i>, <i>zoogloformans</i></p>	<p><i>Veillonella atypica</i>, <i>dispar</i>, <i>parvula</i>  <i>Acidaminococcus fermentans</i>  <i>Megasphera elsedenii</i></p>

Tableau 1 : Principales bactéries anaérobies à Gram négatif isolées chez l'homme.

Bacilles à Gram positif	Cocci à Gram positif
<b>Actinobaculum</b> schaalii	<b>Anaerococcus</b> hydrogenalis, lactolyticus, octavius, prevotii, tetradius, vaginalis
<b>Actinomyces</b> canis, catuli, europaeus, funkei, georgiae, gerencseriae, graevenitzii, israelii, meyeri, naeslundii, neuui, odontolyticus, radidentis, radingae, turicensis, urogenitalis, viscosus	<b>Finegoldia</b> magna
<b>Atopobium</b> fossor, minutum, parvulum, rimaie, vaginae	<b>Gallicola</b> barnesae
<b>Bifidobacterium</b> adolescentis, angulatum, asteroidis, bifidum, breve, catenulatum, denticolens, dentium, infantis, lactis, longum, pseudocatenulatum, pseudolongum	<b>Peptococcus</b> niger
<b>Bulleidia</b> extracta	<b>Peptoniphilus</b> asaccharolyticus, harei, indolicus, ivorii, lacrimalis
<b>Catenibacterium</b> mitsuokai	<b>Peptostreptococcus</b> anaerobius, micros, productus
<b>Clostridium</b> baratii, bifermentans, botulinum, butyricum, cadaveris, clostridioforme, difficile, fallax, glycolicum, hastiforme, histolyticum, innocuum, limosum, malenominatum, novyi, paraputrificum, putrefaciens, putrificum, perfringens, ramosum, septicum, sordellii, sporogenes, subterminale, symbiosum, tertium, tetani	
<b>Collinsella</b> aerofaciens, intestinalis, stercoris	
<b>Cryptobacterium</b> curtum	
<b>Eggerthella</b> lenta	
<b>Eubacterium</b> brachy, combesii, contortum, cylindroides, infirmum, limosum, minutum, moniliforme, multiforme, nitrogenes, nodatum, rectale, saburreum, saphenum, tenue, tortuosum, ventriosum, vurii	
<b>Holdemania</b> filiformis	
<b>Lactobacillus</b> acidophilus, brevis, delbrueckii, casei, catenaformis, cellobiosus, coryniformis, crispatus, curvatus, fermentum, fornicalis, helveticus, iners, jensenii, oris, rhamnosus, salivarius, vaginalis	
<b>Mobiluncus</b> curtisii, mulieris	
<b>Mogibacterium</b> diversum, neglectum, pumilum, timidum, vescum	
<b>Propionibacterium</b> acnes, avidum, granulosum, propionicus	
<b>Slackia</b> exigua, heliotrinireducens	

Tableau 2 : Principales bactéries anaérobies à Gram positif isolées chez l'homme.

Parmi les bacilles à Gram négatif, le genre *Bacteroides* a été divisé en 1989 en trois genres principaux – *Bacteroides*, *Prevotella* et *Porphyromonas* – par les équipes de Shah et Collins (8, 9). Du fait de l'extrême hétérogénéité des souches de *Bacteroides*, ils ont fait éclater ce genre et ont créé *Prevotella* et *Porphyromonas*. A la différence des *Bacteroides* du groupe *fragilis*, les *Prevotella* et *Porphyromonas* ne produisent ni glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) ni 6-phosphogluconate déshydrogénase.

De nouvelles espèces ont également été décrites dans ces trois genres. Dans le genre *Bacteroides*, le groupe *fragilis* est bien individualisé mais d'autres espèces, appartenant toujours au genre *Bacteroides*, seront probablement reclassées dans des genres nouveaux. Ainsi, *Bacteroides gracilis* est devenu *Campylobacter gracilis* en 1995 (13) et *Bacteroides forsythus* est devenu *Tannerella forsythensis* en 2002 (14).

Parmi les bacilles à Gram positif, de nouveaux genres ont été créés pour des espèces appartenant jusqu'alors au genre *Eubacterium* : *Collinsella* (15), *Eggerthella* (16), *Mogibacterium* (17).

Le genre *Peptostreptococcus*, qui regroupait presque tous les cocci à Gram positif isolés en clinique, a été divisé en plusieurs nouveaux genres : *Anaerococcus*, *Gallicola*, *Peptoniphilus*, *Schleiferella* (18), *Finegoldia* (19) et *Peptostreptococcus* (20).

## II. Origine des bactéries anaérobies

Elles peuvent provenir de l'environnement, mais les bactéries anaérobies sont la plupart du temps issues de la flore endogène de l'homme (21).

### A. Environnement

Les bactéries anaérobies sont fréquentes dans le sol et les eaux (douces et salées). Elles sont parfois retrouvées à la surface des végétaux. Elles peuvent jouer un rôle de pathogènes opportunistes si elles disposent d'une **porte d'entrée**, notamment une brûlure, une blessure ou une morsure.

### B. Flore commensale anaérobie chez l'homme

Les bactéries anaérobies font partie de la flore endogène normale de l'homme. La flore normale exerce des effets bénéfiques (22) :

- maintien de l'équilibre du milieu : elle est responsable du fait qu'un microorganisme pathogène ne peut accomplir la première étape d'une infection, à savoir coloniser la peau et les muqueuses, par manque de place ; cette fonction est appelée **résistance à la colonisation** ;
- stimulation permanente du système immunitaire, du fait de la pénétration fréquente d'agents commensaux dans les tissus de l'hôte lors de microtraumatismes ;

Les bactéries anaérobies sont confinées à certains sites anatomiques par différentes structures (paroi intestinale par exemple) qui les empêchent, dans les conditions homéostasiques, de coloniser de nouveaux territoires.

Toutes les surfaces du corps humain sont colonisées par cette flore commensale dont le rôle principal est de nous protéger de l'invasion par un agent pathogène (23). Ces flores, dont la proportion de bactéries anaérobies peut être grande (Tableau 3), sont présentes sur la peau, dans la bouche, le nez, la gorge, le tractus intestinal bas, le vagin et la portion terminale de l'urètre (24).

La nature des bactéries varie selon les sites anatomiques. Ces bactéries ne deviennent pathogènes que si elles sont déplacées vers une zone habituellement stérile, à l'occasion de traumatismes, d'interventions chirurgicales, de nécrose ou de maladies dégénérative ; elles peuvent ainsi sortir de leur confinement et causer des dommages de sévérité variable (21, 25).

Site anatomique	Nombre de bactéries (g <sup>-1</sup> ou mL <sup>-1</sup> )	Rapport anaérobies / aérobie
<b>Bouche</b>		
salive	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	
surface dentaire	10 <sup>10</sup> -10 <sup>11</sup>	1/1
sillon gingival	10 <sup>11</sup> -10 <sup>12</sup>	1/1
<b>Tractus gastro-intestinal</b>		
estomac	10 <sup>2</sup> -10 <sup>5</sup>	
intestin grêle	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup>	1/1
iléon	10 <sup>4</sup> -10 <sup>7</sup>	1/1
colon	10 <sup>11</sup> -10 <sup>12</sup>	1/1
<b>Vagin</b>	10 <sup>8</sup> -10 <sup>9</sup>	1000/1
		3 à 5/1

Tableau 3: Concentration bactérienne selon les sites anatomiques et ratio anaérobies / aérobie (24).

### 1. Peau

Les bactéries anaérobies présentes sur la peau appartiennent essentiellement aux genres *Propionibacterium* et *Peptostreptococcus*. *P. acnes* est présent au niveau des follicules pileux, dans les zones riches en sébum. *P. granulosum* est retrouvé dans les mêmes zones mais en quantité dix fois moins grande. *P. avidum* est plus souvent isolé des zones cutanées humides.

Ces bactéries produisent des acides gras volatils qui s'opposent à la multiplication des bactéries exogènes (24). Dans certaines situations pathologiques (escarre sacrée par exemple), la flore cutanée peut être contaminée par de la flore fécale.

### 2. Nez

La flore nasale est voisine de celle de la peau.

### 3. Bouche et pharynx

Des bactéries anaérobies sont présentes dans les cryptes amygdaliennes, entre les papilles de la langue, sur la plaque dentaire et surtout dans le sillon gingival.

En dehors des *Bacteroides* du groupe *fragilis* et des bacilles à Gram positif du genre *Clostridium*, presque tous les genres bactériens anaérobies peuvent être présents dans la bouche. La flore bucco-pharyngée associe notamment *Fusobacterium* (en particulier *F. nucleatum*), *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Leptotrichia* (en particulier *L. buccalis*), *Veillonella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* et des cocci anaérobies à Gram positif et négatif.

Lorsque ces bactéries anaérobies adhèrent à la plaque dentaire, elles contribuent à la formation des caries et peuvent générer des maladies parodontales (26).

#### 4. Tractus digestif

La quantité de bactéries anaérobies augmente au fur et à mesure que l'on descend vers le colon.

Œsophage, estomac et duodénum sont peu colonisés, probablement en raison de l'acidité et d'un potentiel d'oxydoréduction relativement haut. L'iléon terminal et le colon sont riches en micro-organismes ( $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de fèces). Ces bactéries jouent un rôle important dans la digestion des aliments, la synthèse de vitamines, la stimulation du système immunitaire, etc.

Parmi plus de 400 espèces différentes colonisant ce site anatomique, les bactéries anaérobies sont cent à mille fois plus nombreuses que les bactéries aérobies et appartiennent aux genres *Bacteroides* (groupe *fragilis* en particulier), *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Bilophila* (*B. wadsworthia* en particulier), *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* ou encore des cocci anaérobies à Gram positif et négatif.

#### 5. Tractus génito-urinaire

Seulement quelques bactéries sont présentes dans la portion terminale de l'urètre.

La flore vaginale anaérobie de la femme est, dans les conditions normales, principalement composée de *Lactobacillus*, de cocci à Gram positif et de bacilles à Gram négatif (*Prevotella disiens*, *P. bivia*). La composition de cette flore varie en fonction de l'âge, selon l'imprégnation hormonale (27) :

- de la puberté à la ménopause, les bactéries les plus importantes sont les lactobacilles qui produisent de l'acide lactique à partir du glycogène, abaissant le pH autour de 4,5. Cette acidité empêche la multiplication d'autres bactéries ;
- pendant la menstruation, le pH augmente et favorise alors la prolifération de bactéries anaérobies exogènes notamment celles appartenant aux genres *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Mobiluncus* et *Gardnerella* (notamment *G. vaginalis*).

### III. Facteurs de pathogénicité des bactéries anaérobies

Le terme **pathogénicité** se rapporte à une espèce, le terme **virulence** se rapporte à l'ampleur de la propriété pathogène d'une souche d'une espèce pathogène. A ces deux termes, on peut mettre en parallèle la **sensibilité** d'une espèce hôte (homme, animal) et la **réceptivité** d'un individu d'une espèce hôte sensible.

Dans des conditions normales, les muqueuses et la peau hébergent un grand nombre de bactéries anaérobies. Ces micro-organismes n'ont aucun pouvoir invasif, mais tout déplacement de ces bactéries vers les tissus voisins peut former un foyer primitif puis entraîner une infection locale.

A partir de ce foyer primitif, les bactéries anaérobies vont se développer et diffuser dans les tissus du voisinage. Elles se comportent alors comme des bactéries opportunistes.

Il en est de même pour les infections exogènes : les *Clostridium* telluriques, par exemple, pénètrent à l'occasion de blessures et se développent en profitant de circonstances favorables.

D'autres facteurs, développés ci-après, peuvent également intervenir dans cette pathogénicité (28).

#### A. Synergie bactérienne

Un pus anaérobie contient souvent six à huit micro-organismes différents, dont la spécificité de chacun peut contribuer au développement de l'infection.

#### B. Déficience immunitaire

Une déficience immunitaire est globalement favorable à la survenue d'une infection. Il n'est pas rare qu'une infection à bactéries anaérobies se manifeste au cours du diabète, d'un cancer ou d'une leucose.

#### C. Inhalation du contenu stomacal

Le contenu acide de l'estomac crée des lésions œsophagiennes ou bronchiques et peut permettre l'installation de bactéries anaérobies provenant de la flore bucco-dentaire.

#### D. Ischémie tissulaire

Par un abaissement local de la pression partielle en oxygène, l'ischémie tissulaire favorise la survenue d'infections à germes anaérobies. De plus, la prise en charge thérapeutique est rendue difficile par la mauvaise diffusion des traitements antibiotiques au sein du tissu touché (28).

#### E. Sécrétion d'enzymes et de toxines

Les espèces anaérobies les plus pathogènes sécrètent des enzymes et des toxines. Ainsi, les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont les plus virulents et les plus fréquemment rencontrés dans les septicémies et les infections intra-abdominales (29, 30) : des souches de *Bacteroides fragilis* productrices d'une entérotoxine responsable de diarrhée aiguë chez des enfants ont été décrites (31).

*Bacteroides fragilis*, l'espèce la plus souvent rencontrée, possède de nombreux facteurs de virulence :

- un **lipopolysaccharide** (LPS) de surface qui joue un rôle dans l'adhésion aux cellules épithéliales et endothéliales ;
- la **production d'une endotoxine** (de nature lipopolysaccharidique) ;
- une **capsule** (polysaccharidique) qui favorise la formation d'abcès ;
- un **système efficace de captation du fer** à partir de l'hémine (provenant notamment de l'hémoglobine, rendue accessible à la suite de l'activité d'une hémolysine) ;
- la **production d'un certain nombre d'enzymes** permettant à la bactérie de diffuser dans les tissus (telles que collagénase, hyaluronidase, fibrinolysine, neuraminidase, héparinase, protéase, etc.) ou permettant encore de supporter la teneur en oxygène du sang artériel (enzymes antioxydantes telles que catalase et superoxyde dismutase) ou de résister aux antibiotiques (bêta-lactamase) (**32**).

D'autres bactéries anaérobies de la flore de Veillon, qui peuvent être impliquées dans des pathologies infectieuses, possèdent des facteurs de virulence (**33**) :

- *Fusobacterium necrophorum*, responsable du syndrome angine-infarctus pulmonaire de Lemierre, produit une hémolysine, des facteurs d'agrégation plaquettaire, une endotoxine liée au LPS, des lipases, une hémagglutinine et une leucotoxine (extracellulaire) ;
- plusieurs espèces du genre *Prevotella*, en particulier *P. intermedia* et *P. melaninogenica*, possèdent une capsule de nature polysaccharidique ;
- *Porphyromonas gingivalis* joue un rôle important dans la pathologie buccodentaire car il possède des facteurs d'adhésion (hémagglutinines), des enzymes favorisant sa diffusion (collagénase, trypsinase, hexoaminidase, protéase) et également une endotoxine liée au LPS ;
- *Clostridium perfringens* possède une phospholipase C (létale, nécrosante et hémolytique), quatre autres toxines létales et nécrosantes, cinq hémolysines, une phosphatase acide, une sphingomyélinase, etc. ;
- parmi les cocci à Gram positif, l'espèce *Finnegoldia magna* est la plus souvent isolée en pathologie, notamment dans les infections ostéo-articulaires. Il a été montré qu'elle était capable d'adhérer au collagène et au fibrinogène et de produire une collagénase (**34, 35**).

## F. Production de gaz

Certaines bactéries anaérobies produisent de grandes quantités de gaz, correspondant à des acides gras volatiles, qui peuvent cliver et comprimer les tissus et ainsi favoriser la diffusion de l'infection.

## IV. Scénario typique d'une infection à anaérobie

Les maladies infectieuses se constituent du fait d'interactions variables entre un agent infectieux et un macro-organisme possédant des mécanismes de défense spécifiques et non spécifiques. Ces interactions sont aussi dénommées « relations hôte-parasite ».

Les symptômes d'une maladie découlent d'une part des lésions cellulaires et tissulaires provoquées par l'agent nocif, et d'autre part des réactions de défense de l'hôte.

Un rôle important dans la genèse d'une infection est dévolu à la flore normale (dite commensale) de la peau et des muqueuses. D'une part elle peut provoquer des infections endogènes commensales, d'autre part elle est prépondérante dans la résistance à la colonisation par un agent pathogène (22).

Concernant les anaérobies, le scénario typique du déroulement de l'infection reflète l'enchaînement d'étapes décrit ci-dessous.

### A. Destruction tissulaire initiale

Il existe des conditions qui prédisposent le patient à l'infection : traumatisme, accident, extraction dentaire, rupture de l'appendice, chirurgies orale, gynécologique ou abdominale, etc. Ces événements sont responsables de la destruction tissulaire initiale.

### B. Développement de l'infection primaire

Cette étape n'est pas forcément initiée par les bactéries anaérobies. Les bactéries aéro-anaérobies facultatifs réduisent localement le potentiel d'oxydoréduction et créent les conditions favorables au développement des bactéries anaérobies commensales présentes au niveau du site de l'infection.

Suivant la localisation de l'infection, les bactéries anaérobies sont incriminées dans des affections telles que sinusite ou otite chroniques, actinomyose, pneumonie, pleurésie, dermite, ostéite, salpingite, vaginose, péritonite, etc.

### C. Dissémination

Les bactéries peuvent gagner la circulation sanguine puis disséminer dans tout l'organisme.

### D. Colonisation

A distance, là où une mauvaise vascularisation crée des conditions d'anaérobiose, des micro-caillots bactériens vont se multiplier dans les capillaires étroits, créant ainsi un ou plusieurs thrombus septiques.

## E. Abcédation

Un abcès se formera et des bactéries pourront alors disséminer par voie hématogène vers d'autres sites.

## F. Complications systémiques

Les complications peuvent apparaître à la suite d'un mécanisme physiopathologique qui est fonction de l'agent causal et / ou de sa localisation tissulaire, notamment (24) :

- une hémolyse intra-vasculaire ;
- une nécrose tissulaire ;
- un choc ;
- une coagulation intra-vasculaire ;
- un collapsus cardiovasculaire.

# LES BACTERIES ANAEROBIES AU LABORATOIRE

Les bactéries anaérobies sont de plus en plus souvent isolées dans de nombreuses infections endogènes. L'amélioration des techniques diagnostiques et l'augmentation des patients à terrains fragiles en sont des explications.

En effet, dès lors que les prélèvements, l'acheminement au laboratoire et les méthodes de culture sont effectués selon les règles appropriées, leur isolement devient plus fréquent.

## I. Généralités

### A. Historique

#### 1. Postulats de Henle-Koch

Vers la fin du XIX<sup>ème</sup> siècle, on met en évidence dans de nombreuses maladies connues de longue date des micro-organismes considérés dès lors comme responsables de la survenue de ces maladies, selon les postulats de Henle-Koch établis en 1890 par R. Koch (**22**).

Ces postulats sont librement formulés :

- l'agent pathogène que l'on met en rapport avec les modifications pathologiques et l'évolution clinique d'une maladie doit être isolé ;
- avec une culture pure de l'agent pathogène, une maladie identique (chez l'homme) ou analogue (chez l'animal) doit pouvoir être reproduite ;
- l'agent pathogène ne doit pas apparaître comme « parasite aléatoire » dans d'autres maladies ou chez le sujet sain.

C'est à partir de ces postulats que les causes d'une maladie infectieuse sont encore établies aujourd'hui.

Si ces critères ne sont pas tous remplis, cela n'exclut cependant pas le rôle étiologique d'un agent pathogène isolé. C'est essentiellement dans des infections où l'agent pathogène ne peut être cultivé in vitro que ces critères classiques ne peuvent être remplis.

## B. Diagnostic de laboratoire en infectiologie

Les infections sont diagnostiquées de façon **directe** par la mise en évidence de l'agent infectieux ou de l'un de ses éléments constitutifs, ou **indirecte** par la détection d'anticorps.

Pour le diagnostic de laboratoire, les conditions préalables indispensables sont le prélèvement correct d'un échantillon adéquat et son transport adapté. Les procédés classiques de mise en évidence directe de l'agent pathogène comprennent la microscopie et la culture. L'identification prend alors en compte des caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimiques.

Aujourd'hui, la mise en évidence de séquences de nucléotides spécifiques d'un agent infectieux par des techniques de biologie moléculaire prend une place de plus en plus importante. La biologie moléculaire a un statut de méthode d'identification de référence.

### 1. **Conditions préalables et méthodologie générale**

La microbiologie diagnostique ou clinique prend en compte le diagnostic de laboratoire des infections. Pour exploiter toutes les compétences du laboratoire au bénéfice des patients, une coopération entre le médecin clinicien et le personnel du laboratoire est indispensable.

Les pré-requis à cela sont d'une part une connaissance de la physiopathologie et de la clinique des infections par le personnel du laboratoire, et d'autre part une connaissance du travail de laboratoire par le médecin clinicien.

Les méthodes traditionnelles pour la mise en évidence directe de l'agent infectieux reposent sur la microscopie, la culture et la mise en évidence d'éléments spécifiques tels qu'une toxine ou un antigène.

### 2. **Matériel d'analyse**

La nature du matériel à analyser dépend :

- de la présomption diagnostique clinique ;
- de la localisation de l'infection ;
- de l'espèce d'agent infectieux suspecté.

En règle générale, afin d'isoler l'agent infectieux précocement, il convient de prélever du matériel à analyser avant de débiter un traitement anti-infectieux.

Le transport du matériel vers le laboratoire doit se faire dans des conditionnements spécifiques qui comportent souvent des milieux de transport, ceux-ci étant soit enrichis en éléments sélectifs de croissance (flacon d'hémoculture par exemple), soit purs, si dépourvus d'éléments nutritifs.

Le matériel doit être accompagné d'une demande d'examen rassemblant les informations nécessaires pour une meilleure interprétation. Les laboratoires doivent pouvoir disposer des données cliniques permettant d'orienter les procédures d'analyse.

### 3. Sécurité dans un laboratoire d'analyse

Le personnel de laboratoire manipule régulièrement, par la force des choses, des microorganismes pathogènes. Il doit donc suivre rigoureusement des règles spécifiques de travail pour ne nuire ni à soi, ni aux autres, ni à l'environnement.

La sécurité d'un laboratoire débute par des contraintes de construction et d'équipement (exemple : laboratoire sous pression négative, sas de sécurité, etc.). Elle se poursuit par le respect des règles de base du travail dans un laboratoire de microbiologie, à savoir :

- interdiction de manger, boire, fumer ;
- port de tenues de protection ;
- promotion du pipetage mécanique ;
- désinfection des mains et des surfaces de travail à la fin de toute procédure et immédiatement en cas de contamination ;
- collecte méthodique du matériel contaminé ;
- contrôle de la santé du personnel ;
- procédures validées et formation du personnel.

## II. Recherche de bactéries anaérobies

### A. Objectifs

La recherche de bactéries anaérobies s'inscrit dans le cadre du diagnostic étiologique de diverses suppurations fermées, essentiellement d'origine endogène, mais également dans celui d'infections superficielles faisant suite à une morsure ou un traumatisme (36).

Cette recherche doit être systématique dans certains cas :

- présence de gaz dans les tissus ;
- odeur fétide de l'échantillon ;
- formation d'abcès, de gangrènes, de nécrose du tissu ;
- examen microscopique évocateur (*Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp., etc.).

La recherche de bactéries anaérobies ne doit pas être effectuée à partir de prélèvements naturellement colonisés par une flore en partie anaérobie. Puisque les anaérobies ne sont pathogènes que si on les retrouve dans un site d'où ils sont normalement absents, cela signifie qu'il est indispensable de connaître la flore anaérobie humaine.

## B. Description

### 1. **Prélèvement**

Deux règles importantes sont à respecter (24) :

- ne pas contaminer l'échantillon prélevé par une flore dite « normale » ;
- réduire au maximum le contact avec l'oxygène de l'air.

Tous les sites normalement colonisés ne doivent pas être prélevés pour une recherche de bactéries anaérobies. Sont ainsi proscrits les prélèvements buccaux et pharyngés, les expectorations, selles, urines et écouvillonnages vaginaux.

Tout site proche d'une muqueuse doit au préalable être décontaminé en surface, ou bien le mode de prélèvement doit permettre d'éviter la zone colonisée.

#### a) Technique de prélèvement

Le prélèvement est effectué dans le service clinique ou au bloc opératoire. Quelques règles sont nécessaires pour garantir sa qualité :

- éviter le contact avec l'air ;
- éviter la dessiccation ;
- ne pas utiliser d'écouvillons secs ;
- éviter la contamination par la flore commensale ;
- prélever dans la zone la plus profonde de la lésion ;
- respecter les délais et conditions de conservation avant l'arrivée au laboratoire.

Les écouvillons, bien que déconseillés, sont parfois le seul moyen de prélever. Ils sont alors acheminés au laboratoire dans des milieux de transport de type gélose molle.

Les pus et liquides aspirés, de faible volume, sont immédiatement inoculés dans un milieu de transport (24). La plupart des bactéries anaérobies d'intérêt médical peuvent néanmoins survivre plusieurs heures dans un pus de volume supérieur à 1 mL ou dans une biopsie tissulaire (37).

#### b) Délais et conditions de conservation avant l'arrivée au laboratoire

Les prélèvements sont maintenus droits et à température ambiante, les températures basses favorisant la diffusion de l'oxygène. Ils doivent être acheminés au laboratoire le plus rapidement possible.

### c) Renseignements cliniques

Sur la feuille de prescription accompagnant le prélèvement doivent figurer :

- la température interne du patient ;
- le traitement anti-infectieux en cours ;
- le jour et l'heure du prélèvement ;
- le site et la nature précise du prélèvement.

## 2. Analyse

### a) Liste des pathogènes à rechercher

Les genres bactériens anaérobies les plus souvent impliqués en fonction du contexte infectieux sont indiqués dans le tableau suivant.

CONTEXTE INFECTIEUX	BACTERIES ANAEROBIES
Infektions oculaires	<i>Actinomyces, Clostridium, Propionibacterium</i>
Infektions dentaires	<i>Eubacterium, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Treponema</i>
Infektions ORL	<i>Actinomyces, Fusobacterium, Porphyromonas, Prevotella, Propionibacterium</i>
Abcès cérébraux	<i>Actinomyces, Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Prevotella, Propionibacterium</i>
Infektions pleuro-pulmonaires	<i>Actinomyces, Fusobacterium, Prevotella</i>
Infektions ostéo-articulaires	<i>Actinomyces, Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium, Prevotella, Propionobacterium</i>
Infektions de la peau et des tissus mous	<i>Bacteroides, Clostridium, Fusobacterium</i>
Infektions intra-abdominales	<i>Bacteroides, Bilophila, Clostridium, Egghertella, Fusobacterium</i>
Endométrites	<i>Fusobacterium, Prevotella, Porphyromonas</i>
Infektions par un dispositif intra-utérin	<i>Actinomyces, Eubacterium</i>

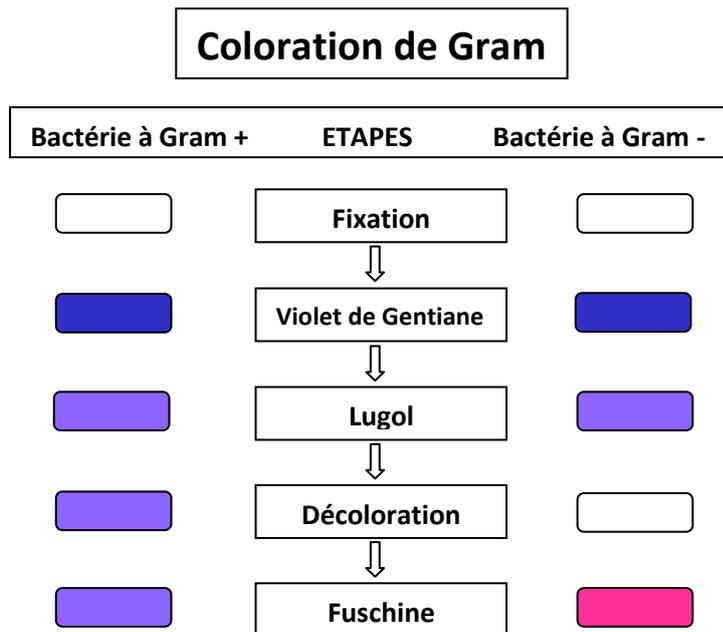
Tableau 4 : Bactéries anaérobies pouvant être incriminées en fonction du contexte infectieux.

### b) Examen macroscopique

La recherche de bactéries anaérobies est souvent orientée par l'aspect du pus (purulent ou non) et la présence éventuelle d'une odeur nauséabonde (évocatrice de la présence d'anaérobies) (24).

### c) Examen direct

Un frottis est réalisé à partir des différents prélèvements : les biopsies sont broyées, les écouvillons sont déchargés dans du bouillon type thioglycolate. Après fixation à la chaleur (flamme d'un bec bunsen), les frottis sont colorés au Gram (Figure 2), en insistant sur l'étape à la safranine (ou fuschine) pour bien visualiser au microscope optique certains bacilles à Gram négatif très fins.



La **coloration de Gram** permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et ainsi distinguer, classifier et donner une information rapide sur la bactérie, tant sur le **type** que sur la **forme**.

La paroi des bactéries à Gram positif empêche la décoloration du complexe colorant-lugol par l'alcool ce qui fait apparaître une coloration bleue. Les bactéries à Gram négatif sont sensibles à la décoloration et sont alors colorées en rose par la fuschine.

Figure 2 : Principe schématisé de la coloration de Gram.

La plupart des pus anaérobies sont polymicrobiens et certaines morphologies sont évocatrices lors de l'observation au Gram : bacilles à Gram négatif **fusiformes** (extrémités effilées) évoquant *Fusobacterium nucleatum*, bacilles à Gram positif à **bouts carrés** éventuellement **sporulés** évoquant *Clostridium* spp., bacilles à Gram positif **plus ou moins ramifiés** évoquant *Actinomyces* spp. (forme des "grains" dans le pus) ou *Propionibacterium* spp., bacilles à Gram négatif **polymorphes** et **vacuolisés** évoquant *Bacteroides* spp., ou encore **petits** bacilles à Gram négatif **incurvés**.

Les polynucléaires peuvent être absents au centre des abcès où ils sont détruits par les enzymes cellulaires ou par les toxines bactériennes.

#### d) Mise en culture

##### (1) *Milieux de culture*

Quelles que soient les qualités propres des géloses et additifs employés, une réduction convenable est nécessaire à la croissance bactérienne anaérobie.

Les géloses doivent être préparées et conservées à l'abri de l'air. L'adjonction d'agents réducteurs avant autoclavage, telle que la L-cystéine, limite la quantité de substances néoformées au contact de l'oxygène et toxiques pour les bactéries anaérobies.

Les milieux permettant la culture des bactéries anaérobies sont des milieux enrichis en sang et en vitamine K. Ils renferment en général un agent réducteur et peuvent être rendus sélectifs par addition d'un ou plusieurs antibiotiques (24).

Les milieux liquides sont à éviter en primo-culture, les infections à anaérobies étant souvent polymicrobiennes. Ils peuvent être toutefois utiles pour enrichir une culture mono-microbienne de bactérie anaérobie à croissance lente.

### (a) Milieux gélosés en boîtes

- Milieux non sélectifs

Les bases les plus utilisées sont Brucella, Cœur-Cerveille (BHI), Columbia, Schaedler et Wilkins-Chalgren, enrichies avec 5 % de sang, vitamine K<sub>1</sub> et hémine. Tous les anaérobies facultatifs sont malheureusement, eux aussi, capables de se développer sur ces milieux riches.

- Milieux sélectifs

L'addition d'un ou plusieurs antibiotiques permet d'inhiber de façon plus ou moins sélective la croissance des bactéries aéro-anaérobies facultatives :

- ✕ les aminosides (kanamycine, néomycine, gentamycine), à la concentration finale voisine de 50 µg/mL (de 8 à 64 µg/mL), sont sans action sur les bactéries anaérobies strictes mais inhibent bon nombre d'anaérobies facultatifs (**24**) ;
- ✕ la colistine, la polymyxine et l'acide nalidixique inhibent de nombreux aérobies, mais aussi quelques anaérobies à Gram négatif. Le milieu Columbia additionné d'acide nalidixique et de colistine (gélose ANC) peut être utilisé pour sélectionner les bactéries anaérobies à Gram positif ;
- ✕ la vancomycine à 7 mg/L empêche la croissance des cocci et bacilles aérobies à Gram positif (staphylocoques, streptocoques, ...), mais aussi de certains anaérobies comme *Clostridium*, *Propionibacterium* ou *Peptostreptococcus*. Par exemple, le milieu Schaedler qui contient néomycine et vancomycine sélectionne les bactéries anaérobies à Gram négatif sauf les *Porphyromonas* spp. qui sont sensibles à la vancomycine. Le milieu LKV de Serlabo<sup>®</sup>, qui contient vancomycine et kanamycine, est plutôt utilisé pour sélectionner les genres *Bacteroides* et *Prevotella*.
- ✕ on peut aussi ajouter du phényléthylalcool ou phényléthanol pour inhiber la croissance des bacilles à Gram négatif aéro-anaérobies facultatifs (notamment les entérobactéries) et ainsi sélectionner les bactéries anaérobies à Gram positif (**38**).

### (b) Milieux spécifiques

Des milieux spécifiques peuvent être utilisés pour l'isolement d'une ou plusieurs espèces bactériennes. C'est le cas du milieu CCA (Cycloserine-Céfoxitine-Amphotéricine B) de bioMérieux, souvent employé pour la détection de *Clostridium difficile*, ou le milieu BBE (*Bacteroides*-Bile-Esculine) de Serlabo<sup>®</sup> qui peut être utilisé pour sélectionner les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et *Bilophila wadsworthia*.

### (c) Milieux liquides

- ✕ Les bouillons TGY (Trypticase-Glucose-extrait de levure), VL (milieu Viande-Levure), Schaedler ou encore le milieu cystéiné de Rosenow sont commercialisés prêts à l'emploi.
- ✕ Les flacons pour hémocultures anaérobies peuvent être utilisés comme des milieux pré-réduits. Ces bouillons enrichis doivent cependant être inoculés à la seringue pour ne pas dénaturer l'atmosphère anaérobie.

#### (2) Technique d'ensemencement

Elle est variable selon le type de prélèvement (36) :

- en séparation : technique la plus utilisée qui consiste à inoculer le matériel bactérien de façon fractionnée sur le disque de gélose, généralement par trois repiquages successifs, afin d'obtenir des colonies isolées (donc pures) dans l'un des trois secteurs et de mettre en évidence leur forme, leur aspect et leur couleur ;
- en étoile, avec une anse calibrée pour les prélèvements nécessitant une culture quantitative.

Le but de l'ensemencement est l'**obtention de colonies isolées**. Sur une gélose nutritive, une colonie isolée constitue une culture pure, puisqu'issue d'une cellule bactérienne.

#### (3) Conditions d'incubation

##### (a) Atmosphère anaérobie

- Techniques d'anaérobiose

S'il s'agit d'isoler des bactéries extrêmement sensibles à l'oxygène (EOS), une enceinte anaérobie complètement équipée est nécessaire.

S'il s'agit de réaliser des isolements ou des tests de sensibilité aux antibiotiques de bactéries relativement aéro-tolérantes, comme *Bacteroides fragilis*, des systèmes plus simples comme les jarres sont suffisants, mais la qualité de l'anaérobiose doit alors être contrôlée (utilisation de souches témoins notamment).

Les **jarres** (Figure 4) ont l'avantage de permettre d'incuber des boîtes de Pétri. En plastique, en verre ou en métal, elles sont équipées d'un couvercle hermétique muni de deux ou trois valves.

L'anaérobiose est obtenue de deux manières classiquement :

- ✕ trois cycles de vide-réinjection de mélange gazeux (N<sub>2</sub> 80 %, H<sub>2</sub> 15 %, CO<sub>2</sub> 5 %) en présence d'un catalyseur comme le Palladium ;
- ✕ dépôt dans la jarre d'un sachet d'anaérobiose commercialisé (Figure 3) qui provoque une réaction catalytique transformant l'oxygène atmosphérique en eau.

Dans ce second cas, un délai de deux à plusieurs heures est nécessaire à l'obtention de l'anaérobiose. Chaque ouverture de la jarre détruit l'anaérobiose et oblige à renouveler l'ensemble de l'opération si nécessaire.



Figure 3 : Sachet d'anaérobiose AnaeroGen™.



Figure 4 : Jarre.

(Photographies personnelles)

Lorsqu'un sachet AnaeroGen™ (OXOID®, composant actif : acide ascorbique) est placé dans une jarre fermée, l'oxygène présent dans l'atmosphère de la jarre est rapidement absorbé alors que se produit simultanément un dégagement de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Quand il est utilisé correctement, ce produit permet de réduire le taux d'oxygène jusqu'à une concentration inférieure à 1 % en moins de 30 minutes. La concentration en CO<sub>2</sub> est comprise entre 9 et 13 %.

Cette méthode d'anaérobiose diffère sensiblement des méthodes traditionnelles utilisées puisqu'il n'y a pas de dégagement d'hydrogène et elle ne nécessite donc pas l'utilisation d'un catalyseur. De plus, l'addition d'eau n'est pas nécessaire pour activer la réaction (39).

Les **chambres** ou les **stations anaérobies** sont plus adaptées à la manipulation des anaérobies EOS, toutes les étapes se faisant en anaérobiose continue. Leurs inconvénients communs sont la lourdeur des manipulations, l'investissement important et l'entretien nécessaire.

- Contrôle de la qualité de l'anaérobiose

Certaines méthodes sont du domaine des laboratoires spécialisés, comme les techniques physiques de mesure de la concentration en O<sub>2</sub> ou du potentiel redox.

Une méthode plus simple consiste à co-incuber une souche connue pour sa sensibilité à l'oxygène, comme *Fusobacterium nucleatum*. Il suffit de constater qu'elle s'est bien développée dans l'atmosphère que l'on utilise pour conclure à une bonne anaérobiose.

## (b) Incubation

Les primocultures anaérobies sont généralement examinées après 48h d'incubation à 37°C (24). Une analyse n'est déclarée négative qu'après au moins 5 jours de culture (pour les germes dont la croissance est lente et difficile tels que *Actinomyces* ou *Porphyromonas*, les milieux sont conservés jusqu'à 15 jours).

Les cultures obtenues en anaérobiose sont comparées à celles obtenues sur une gélose au sang (gélose MHS par exemple) incubée sous CO<sub>2</sub>.

Toute colonie suspecte est repiquée dans ces deux atmosphères (l'une aérobie, l'autre anaérobie) afin de s'assurer du caractère anaérobie strict de la bactérie. Certaines bactéries, bien que classées parmi les anaérobies strictes, sont aérotolérantes et poussent dans une atmosphère enrichie en 10 % de CO<sub>2</sub> : *Propionibacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp., *Bifidobacterium* spp. et *Clostridium tertium*.

### e) Examen des cultures

#### Aspects caractéristiques de certaines espèces sur gélose au sang :

- double zone d'hémolyse autour des colonies : *Clostridium perfringens* ;
- aspect en mie de pain : *Fusobacterium nucleatum* (verdissement de la gélose autour des colonies après exposition à l'air, indiquant la production de peroxyde d'hydrogène) ;
- colonie lisse, ronde, blanc porcelaine : *Propionibacterium acnes* ;
- aspect irrégulier "molaire" : *Actinomyces israelii* ;
- colonie brun-rouge : *Actinomyces odontolyticus* ;
- petite colonie creusant la gélose, ou transparente : *Bacteroides ureolyticus* et *Campylobacter gracilis* ;
- aspect en nappe (envahissement de la gélose) : *Clostridium septicum* ;
- pigmentation noire : *Porphyromonas* spp. et certaines *Prevotella* spp..

Chaque type de colonie est repiqué :

- sur gélose anaérobie et incubée sous atmosphère anaérobie ;
- sur gélose MHS incubée sous 10 % de CO<sub>2</sub> pour contrôler le caractère anaérobie strict de la souche.

Puis une coloration de Gram est faite sur chaque type de colonie ce qui permet une première orientation morphologique.

## f) Identification des bactéries anaérobies

L'identification repose sur :

- l'examen microscopique après coloration de Gram ;
- la vérification du caractère anaérobie ;
- la réalisation des tests d'orientation tels que la catalase ou l'oxydase, complétée par des galeries d'identification API<sup>®</sup> 20A et/ou Rapid<sup>®</sup> ID 32A (bioMérieux) ;
- La spectrométrie de masse ou le séquençage de l'ARN 16S, qui peuvent être utiles dans certains cas.

### (1) *Aspect au Gram*

La forme, la taille, la présence de renflements, de ramifications, de vacuoles, de spores, etc. orientent aussi l'identification (24).

### (2) *Test conventionnels*

Les tests conventionnels de référence sont regroupés dans un manuel pratique et de lecture aisée ; cet ouvrage, de Holdeman et Moore (40), n'a malheureusement pas été réactualisé et a vieilli au regard de l'évolution taxonomique. La fabrication des réactifs reste en outre laborieuse et ne se prête que difficilement aux impératifs de la routine.

### (3) *Tests d'orientation*

#### (a) **Odeur**

L'odeur nauséabonde d'un prélèvement suggère parfois la présence d'anaérobies (odeur de beurre rance, par exemple, des pus à *Fusobacterium*, odeur de crottin de cheval si présence de *Clostridium difficile*).

#### (b) **Aérotolérance**

Certaines bactéries, classées parmi les bactéries anaérobies strictes, peuvent pousser (faiblement) dans une atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> : *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Clostridium tertium* (36).

#### (c) **Quelques tests simples**

Catalase, production d'uréase, oxydase, bile (1 mg) et vert brillant (100 mg), nitrates, polyanéthol sulfonate de sodium (1 mg), indole, etc. sont des tests permettant une différenciation au niveau du genre ou de l'espèce selon les cas.

#### (4) Galeries d'identification

Elles sont de deux types, soit biochimique, soit enzymatique. Quelques exemples :

- la galerie API<sup>®</sup> 20A (bioMérieux) nécessite une croissance bactérienne, donc une incubation en anaérobiose de 24 à 48 heures. Elle met notamment en évidence la fermentation des glucides ;
- les galeries Rapid<sup>®</sup> ID 32A (bioMérieux) et Rapid<sup>®</sup> ANA II (AES<sup>®</sup>) révèlent la présence d'enzymes préformés par la bactérie. Elles peuvent être incubées en atmosphère normale et lue au bout de quelques heures.

Les galeries enzymatiques donnent en général des résultats plus précis mais pour certaines espèces, l'étude des fermentations sucrées reste utile : ces deux galeries sont alors complémentaires (24).

La plus ancienne des galeries prêtes à l'emploi (API<sup>®</sup> 20A) comporte 20 micro-cupules contenant des substrats déshydratés qui permettent d'étudier, en 24 à 48 heures, 21 caractères phénotypiques révélés par des changements de couleur (Figure 5).



Figure 5 : Galerie d'identification API<sup>®</sup> 20A.  
(Reproduction photographique – propriété de bioMérieux)

En pratique, cette galerie est ensemencée avec un inoculum à 3 McF (« unités Mac Farland ») puis incubée 24 à 48 heures à 37°C en atmosphère anaérobie. Elle permet d'identifier des germes ayant une croissance suffisamment rapide et un métabolisme des sucres suffisant (36).

La galerie Rapid<sup>®</sup> ID 32A est ensemencée avec un inoculum à 4 McF, puis incubée 4 heures à 37°C en atmosphère aérobie. Elle ne nécessite pas de croissance bactérienne, l'incubation étant réalisée en aérobie. Elle permet d'identifier des germes par détection d'enzymes préformées à l'aide de substrats chromogènes.

L'identification est obtenue par comparaison à des profils enregistrés dans la base de données informatiques du fournisseur. Les résultats doivent être interprétés en fonction des caractères d'orientation. Ainsi le test de la catalase permet-il de différencier *B. uniformis* (catalase positive) de *B. ovatus* (catalase négative).

### (5) Chromatographie en phase gazeuse

Certaines bactéries qui ont un métabolisme réduit, donc peu de caractères biochimiques, sont identifiables grâce à la chromatographie en phase gazeuse (CPG) (37, 41, 42). Pour ce faire, un milieu liquide, type milieu de Schaedler, contenant du glucose, estensemencé avec la souche à étudier. Ce milieu est généralement incubé plusieurs jours afin de permettre à la bactérie de produire des acides gras, volatils ou non, à partir du glucose et des peptones présents dans le milieu.

Ces acides sont ensuite extraits puis identifiés selon leur temps de rétention dans la colonne. Le profil obtenu est comparé à ceux qui ont été répertoriés par Holdeman et Moore du Virginia Polytechnic Institute dans *Anaerobe Laboratory Manual* (43).

La CPG permet d'analyser les produits de fermentation terminaux du glucose, caractéristiques de certains genres (*Propionibacterium*, *Lactobacillus*) ou espèces (essentiellement les bacilles à Gram négatif).

Dans les années 1990, la CPG pouvait présenter un intérêt majeur dans l'identification complémentaire et dans l'identification présomptive des bactéries. Mais avec la nécessité d'un appareillage chromatographique sophistiqué, d'une informatique capable d'interpréter un profil complexe et devant l'émergence de techniques biomoléculaires telle que la PCR (Polymerase Chain Reaction), la CPG n'est aujourd'hui pratiquement plus utilisée pour ce type de travaux

### (6) Identification par PCR universelle

L'identification de certaines bactéries anaérobies et corynébactéries peut nécessiter le recours à des techniques de biologie moléculaire reposant fréquemment sur le séquençage du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal (36).

Le séquençage est une méthode qui consiste à déterminer l'enchaînement des nucléotides sur une molécule d'ADN. La technique utilisée dérive de celle de F. Sanger et repose sur l'utilisation de nucléotides particuliers correspondant à des didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTPs) marqués chacun par un fluorophore différent.

Dans son principe, le séquençage comprend plusieurs étapes :

⌘ extraction du matériel génétique contenu dans la cellule bactérienne : la pureté de la souche est au préalable contrôlée par l'observation de l'homogénéité des colonies et l'examen au microscope après coloration de Gram ;

⌘ amplification du gène cible par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) (44) : le gène le plus fréquemment utilisé pour l'identification d'espèce bactérienne est celui codant l'ARN 16S, correspondant à la sous-unité 30S du ribosome

bactérien. Ce gène est une bonne cible pour l'identification car il est spécifiquement bactérien et est composé de domaines hautement conservés (permettant l'utilisation d'amorces universelles) entourant des domaines variables en fonction des espèces (45) ;

✕ mise en évidence du produit PCR par migration électrophorétique : on vérifie au sein du gel d'agarose si les fragments amplifiés ont la taille attendue ;

✕ purification du produit PCR : cette étape vise à éliminer l'excès d'amorces et de nucléotides qui pourraient interférer avec les réactions suivantes ;

✕ dosage de l'ADN amplifié : concentration et pureté de l'ADN sont évaluées en mesurant la densité optique (DO) à des longueurs d'onde de 260 et 280 nm et en déterminant le rapport  $DO_{260} / DO_{280}$  d'après la loi de Beer-Lambert ;

✕ séquençage des deux brins d'ADN par PCR : le produit PCR purifié est utilisé comme base ; l'amplification des brins s'effectue au cours de deux réactions séparées à l'aide d'un mélange réactionnel comprenant les amorces sens et antisens, la Taq polymérase, des dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) ainsi que les ddNTPs marqués ;

✕ purification des brins d'ADN à séquencer : permet d'éliminer l'excédent d'amorces ainsi que les dNTPs et ddNTPs non incorporés ;

✕ électrophorèse de l'ADN en capillaire dans un séquenceur automatique : à ce niveau, les fragments d'ADN dénaturés sont séparés en fonction de leur taille et les ddNTPs marqués excités par un laser. La séquence du gène peut être reconstituée à partir d'un électrophorégramme ;

✕ analyse et interprétation des séquences obtenues : un logiciel informatique (comme Seqscape® ou Sequencing Analysis® utilisés au Laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Poitiers) aligne les séquences sens et antisens et permet d'obtenir une séquence consensus des deux brins d'ADN, celle-ci pouvant alors être comparée à une banque de données, telle que la banque de séquences BIBI (Bio Informatic Bacterial Identification®).

#### (7) *Les antibiogrammes*

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques repose sur la croissance de la bactérie ou son inhibition au contact de disques ou de comprimés imprégnés d'antibiotiques comme la vancomycine (5 µg), la colistine (10 µg), la kanamycine (1000 µg).

En bactériologie clinique, il est intéressant d'effectuer les antibiogrammes sur les souches provenant d'hémoculture et dans les cas d'infections sévères, comme les ostéites qui nécessitent un traitement antibiotique parfaitement adapté.

(8) *Production d'une  $\beta$ -lactamase*

Même si l'antibiogramme n'est pas réalisé, la production d'une  $\beta$ -lactamase est recherchée en particulier chez les *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* et *Clostridium*. Les *Bacteroides* du groupe *fragilis* sont naturellement producteurs d'une  $\beta$ -lactamase. Le test, encore appelé "test de la céfinase", est effectué à l'aide d'un disque imprégné de nitrocéfine (céphalosporine chromogène). La production d'une pénicillinase se traduit alors par le virage du disque du jaune au rouge lorsque l'on écrase dessus une colonie sécrétrice (46).

# LES CORYNEBACTERIES

## I. Généralités

### A. Caractères morphologiques et bactériologiques

Les corynébactéries appartiennent à un groupe bactérien regroupant de nombreuses espèces de bacilles à Gram positif aérobies et aéro-anaérobies (47).

Ces bactéries se caractérisent sur le plan morphologique comme étant des bacilles irréguliers, immobiles, droits ou légèrement incurvés avec des extrémités renflées (en poire ou en massue).

Elles sont non sporulées, de type respiratoire aérobie ou anaérobie facultatif et sont catalase positive. Outre ces caractéristiques, leur disposition particulière en caractères chinois, en palissade ou encore en paquet d'épingles permet de les évoquer dans certains prélèvements (22, 48).

### B. Habitat

D'une manière générale, les corynébactéries constituent une partie importante de la flore de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux, et peuvent également être trouvées dans l'environnement (49, 50, 51).

Il existe une spécificité de niche en fonction des espèces (peau, oropharynx, tractus génito-urinaire, etc.) :

- *C. glucuronolyticum*, présent dans le tractus génito-urinaire, isolé dans les spermocultures et les prélèvements urinaires ;
- *C. pseudotuberculosis*, présent dans la flore ORL, isolé dans les prélèvements pulmonaires ;
- *C. urealyticum*, présent dans le tractus génito-urinaire, responsable d'infections urinaires ;
- *Arcanobacterium pyogenes* (espèce connue sous les noms de *Corynebacterium pyogenes* ou *Actinomyces pyogenes* avant 1997) est un commensal des amygdales et des muqueuses des voies respiratoires supérieures, des voies génitales et du tube digestif.

La dénomination "corynébactéries" recouvre des bactéries très distinctes que ce soit d'un point de vue taxonomique, écologique ou de la pathologie associée.

Les **espèces anaérobies facultatives** sont fréquemment rencontrées dans des prélèvements humains et appartiennent aux genres *Corynebacterium*, *Dermabacter*, *Turicella* et *Rothia*.

Cependant, quelques espèces du genre *Corynebacterium* (*C. afermentans*, *C. urealyticum* et *C. jeikeium*) sont **aérobies strictes**. D'autres genres apparentés aux corynébactéries et aérobies stricts (*Rhodococcus*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, *Cellulomonas*, *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*) sont essentiellement d'origine environnementale, mais certaines espèces peuvent provoquer des infections opportunistes graves chez l'homme (notamment *Rhodococcus equi*).

Les bactéries apparentées aux corynébactéries, de type respiratoire **anaérobie préférentiel**, appartiennent aux genres *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium* et *Propionibacterium*. Ces bactéries peuvent être isolées chez l'homme et les animaux. Certaines espèces d'*Actinomyces* (*A. israelii*, *A. meyeri*) ont une croissance strictement anaérobie.

## II. Pouvoir pathogène

Les corynébactéries, rarement pathogènes, se comportent globalement comme des pathogènes opportunistes : traumatisme, souillure de plaies superficielles par de la terre ou par des instruments contaminés, sujets âgés, affaiblis, terrain prédisposé (immunodépression, cancer, anomalies anatomiques congénitales, ...), etc.

Certaines d'entre elles présentent une résistance aux antibiotiques, intrinsèque ou du fait d'une localisation inaccessible aux antibiotiques (abcès, tropisme intracellulaire) : *Corynebacterium urealyticum* est, par exemple naturellement résistante à l'ensemble des bêta-lactamines et des aminosides et à l'association sulfamide-triméthoprime (52), et peut être à l'origine d'infections nosocomiales, comme *C. jeikeium*, multirésistante aux antibiotiques.

Nota bene : maladie strictement humaine, sans portage animal ni survie dans l'environnement, la diphtérie, par sa virulence, domine la pathologie associée aux corynébactéries. Cette maladie, causée par *Corynebacterium diphtheriae*, a disparu des pays développés où la vaccination systématique des enfants a été rendue obligatoire, sauf aux USA où la vaccination n'est pas obligatoire (la maladie y est d'ailleurs endémique). La diphtérie est encore très répandue dans les pays du Tiers-Monde, notamment en Afrique, en Asie et Amérique latine.

Le diagnostic bactériologique de la diphtérie est délicat du fait de la présence fréquente dans l'oropharynx et sur la peau de corynébactéries commensales proches de *C. diphtheriae*, parfois appelées "bacilles diphtéroïdes", telles que *Arcanobacterium haemolyticum* et *C. pseudodiphtheriticum* (48).

La diphtérie est une maladie à déclaration obligatoire en France (53).

Les principales infections humaines associées aux corynébactéries figurent dans le tableau suivant :

Espèces	Infections associées
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphthérie (souche toxigène), endocardites, septicémies, pharyngites, plaies
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	Septicémies, endocardites, abcès, infections sur matériel étranger
<i>Corynebacterium aurimucosum</i> ( <i>Corynebacterium nigricans</i> )	Arthrites septiques, infections materno-fœtales
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Septicémies, méningites (neurochirurgie), endocardites, infections sur matériel étranger
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	Erythrasma, infections urinaires
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	Trachéites, abcès pulmonaires, endocardites
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Lymphadénites
<i>Corynebacterium riegelii</i>	Infections urinaires
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> (anciennement <i>C. seminale</i> )	Urétrites, prostatites
<i>Corynebacterium striatum</i>	Pleuropneumonies, abcès pulmonaires, endocardites
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Infections urinaires, cystites à incrustations, endocardites
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	Pharyngites diphtériques, abcès
<i>Actinomyces spp.</i>	Actinomycoses ( <i>A. meyeri</i> , <i>A. israelii</i> , <i>A. viscosus</i> ), abcès cutané ( <i>A. neuii</i> , <i>A. radingae</i> , <i>A. turicensis</i> , <i>A. europaeus</i> ), abcès profonds
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Pharyngites, rash cutané, endocardites
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Abcès, ulcères cutanés
<i>Brevibacterium macbrellneri</i>	Dermatose dite « white piedra »
<i>Propionibacterium acnes</i>	Endocardites, infections ostéo-articulaires
<i>Rhodococcus equi</i>	Abcès pulmonaires, abcès cérébraux, septicémies
<i>Turicella otitidis</i>	Otites moyennes aiguës

Tableau 5 : Infections pour lesquelles les corynébactéries peuvent être incriminées.

D'autres espèces dont la pathogénie est moins reconnue peuvent être évoquées : *Corynebacterium kroppenstedtii* dans les mastites granulomateuses (54, 55), *C. auris* dans des otites ou encore *C. macginleyi* dans des infections oculaires (56).

Notons aussi que *C. pseudotuberculosis* est capable de produire une toxine similaire à celle de *C. diphtheriae*. Cette espèce provoque surtout des infections chez les animaux mais peut être isolée chez l'homme et provoquer des lymphadénites (57), une pharyngite et éventuellement un syndrome diphtérique (58).

### III. Diagnostic bactériologique

#### A. Objectif

En raison de leur appartenance aux flores normales de l'homme, ces bactéries sont fréquemment considérées comme des contaminants des prélèvements.

Leur implication dans les infections peut être suspectée si :

- l'examen microscopique met en évidence la présence de corynébactéries associée à une réaction leucocytaire (polynucléaires) importante ;
- la même espèce est isolée à partir de plusieurs prélèvements ;
- ces bactéries sont isolées à partir de sites normalement stériles ;
- elles sont isolées dans des prélèvements d'urines, associées à une leucocyturie et une concentration (au moins  $10^4$  germes par mL) significatives.

Certaines espèces comme *C. jeikeium*, *C. urealyticum* ou *C. amycolatum* apparaissent très résistantes aux antibiotiques. Ceci justifie de les identifier au niveau de l'espèce, surtout dans les prélèvements provenant d'infections sévères.

Un isolement de *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou d'*Arcanobacterium haemolyticum* doit être pris en considération quel que soit le nombre de colonies ou le site de l'isolement.

#### B. En pratique

Comme pour les bactéries anaérobies, l'**identification présumptive** du genre ou de l'espèce repose sur :

- l'examen microscopique après coloration de Gram ;
- l'aspect des colonies :
  - o la pigmentation : de nombreuses espèces appartenant aux genres *Microbacterium*, *Oerskovia* et *Cellulomonas* présentent des colonies jaunes, ce qui est rarement observé pour les bactéries du genre *Corynebacterium* ;
  - o l'hémolyse (CAMP- test) : *C. pseudotuberculosis* et *C. ulcerans* peuvent être différenciés de *C. diphtheriae* par un Camp test reverse positif. Cette caractéristique est aussi présente chez *Arcanobacterium haemolyticum* ;

Nota bene : le test de Camp s'effectue par ensemencement en strie, sur une gélose au sang de mouton, d'une souche de *Staphylococcus aureus* (ou *Rhodococcus equi*) bêta-hémolytique.

La souche bactérienne à étudier est ensuite ensemencée selon une strie perpendiculaire, sans toucher celle de *S. aureus* :

- un CAMP test **positif** se traduit par un élargissement de la zone d'hémolyse produite par *S. aureus*, au niveau de la jonction des deux stries ;
  - un CAMP test est **négatif** lorsque l'hémolyse de la souche de *S. aureus* est inchangée ;
  - un CAMP test est qualifié de "**reverse positif**" si l'on observe une inhibition de la zone d'hémolyse à la jonction des deux stries.
- la recherche de la mobilité, seulement positive chez quelques espèces de l'environnement ;
  - la production de catalase ;
  - la détermination du type respiratoire ;
  - la détection de la lipophilie : *C. urealyticum* et *C. jeikeium*, par exemples, nécessitent des lipides pour leur croissance (59) ;
  - la recherche de la sensibilité au composé vibriostatique.

Pour les autres bactéries, l'**identification définitive** de l'espèce peut être obtenue par l'étude de caractères biochimiques basée sur l'exploration du métabolisme des glucides (fermentations), des protéines (présence d'une nitrate réductase, hydrolyse de la gélatine et de l'urée, etc.) grâce à des test conventionnels ou des galeries commercialisées.

Enfin, l'identification de certaines espèces peut nécessiter le recours à l'étude de composants de la paroi bactérienne (*C. amycolatum* est par exemple dépourvu d'acide corynomycolique (60)) ou à des techniques de biologie moléculaire reposant principalement sur le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S ou du gène rpoB.

# Carte ANC – VITEK<sup>®</sup> 2 Systems (bioMérieux)

## I. Informations générales du produit

Ces informations accompagnent le guide de présentation et d'utilisation du produit (61).

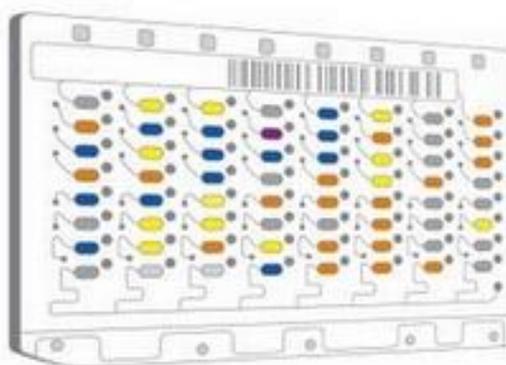


Figure 6 : Schéma d'une carte d'identification à utiliser avec le système VITEK<sup>®</sup> 2.

*(Reproduction photographique – propriété de bioMérieux)*

### A. Applications

La carte ANC, développée par bioMérieux et introduite sur le marché en 2008 (62), est un système automatisé qui permet l'identification de la plupart des germes anaérobies et des espèces de corynébactéries fréquemment rencontrés en microbiologie clinique.

<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
<i>Actinomyces meyeri</i>	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>
<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Corynebacterium striatum</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Corynebacterium ulcerans</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Eggerthella lenta</i>
<i>Bacteroides thetaïotaomicron</i>	<i>Eubacterium limosum</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>Fingoldia magna</i>
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Clostridium baratii</i>	<i>Fusobacterium varium</i>
<i>Clostridium bif fermentans</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Clostridium cadaveris</i>	<i>Microbacterium flavescens</i>
<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Parabacteroides distasonis</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Prevotella bivia</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Prevotella buccae</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Prevotella disiens</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Clostridium subterminale</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
	<i>Propionibacterium propionicus</i>
	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
	<i>Veillonella</i> spp.

Tableau 6 : Liste des genres et espèces bactériens identifiables par la carte ANC.

## B. Description

Dans le cadre de l'identification biochimique des bactéries anaérobies et des corynebactéries, les systèmes commercialisés comportent des substrats d'enzymes préformées produites par ces micro-organismes.

La carte ANC fait appel à 36 tests biochimiques mesurant l'utilisation des sources de carbone et l'activité enzymatique :

- 17 tests enzymatiques (glycosidases et arylamidases) ;
- 13 tests de fermentation (acidification) ;
- 2 tests d'alcalinisation ;
- 4 tests biochimiques divers.

PUITS	TEST	Abréviations	Quantité/Puits
4	D-GALACTOSE	dGAL	0,3 mg
5	Leucine-ARYLAMIDASE	LeuA	0,023 mg
6	ELLMAN	ELLM	0,03 mg
7	Phénylalanine-ARYLAMIDASE	PheA	0,026 mg
8	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA	0,023 mg
10	L-Pyrrolidonyl-ARYLAMIDASE	PyrA	0,018 mg
11	D-CELLOBIOSE	dCEL	0,3 mg
13	Tyrosine-ARYLAMIDASE	TyrA	0,0279 mg
15	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA	0,038 mg
18	D-GLUCOSE	dGLU	0,3 mg
20	D-MANNOSE	dMNE	0,3 mg
22	D-MALTOSE	dMAL	0,3 mg
28	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC	0,3 mg
30	ARBUTINE	ARB	0,1875 mg
33	N-ACETYL-GLUCOSAMINE	NAG	0,3 mg
34	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-bêta-glucoside	BGLUi	0,006 mg
36	UREASE	URE	0,15 mg
37	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-bêta-glucuronide	BGURi	0,006 mg
39	Indoxyl BETA-GALACTOPYRANOSIDASE	BGALi	0,006 mg
41	ALPHA-ARABINOSIDASE	AARA	0,0324 mg
42	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-galactoside	AGALi	0,006 mg
43	BETA-MANNOSIDASE	BMAN	0,036 mg
44	ARGININE GP	ARG	0,15 mg
45	PYRUVATE	PVATE	0,15 mg
51	MALTOTRIOSE	MTE	0,3 mg
53	Hydrolyse ESCULINE	ESC	0,0225 mg
54	BETA-D-FUCOSIDASE	BdFUC	0,0342 mg
55	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-bêta-N-acétyl-glucosamide	BNAGi	0,006 mg
56	5-Bromo—4-chloro-3-indoxyl-alpha-mannoside	AMANi	0,006 mg
57	ALPHA-L-FUCOSIDASE	AIFUC	0,0342 mg
59	PHOSPHATASE	PHOS	0,05 mg
60	L-ARABINOSE	IARA	0,3 mg
61	d-Ribose 2	dRIB2	0,3 mg
62	Phénylphosphonate	OPS	0,024 mg
63	ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE	AARAF	0,015 mg
64	D-XYLOSE	dXYL	0,3 mg

Tableau 7 : Composition des puits de la carte ANC (les puits numérotés de 1 à 64 et non mentionnés dans ce tableau sont vides).

L'aptitude d'un système d'identification biochimique commercialisé à générer des résultats d'identification corrects repose sur la qualité de sa base de données. La mise à jour de la base de données est un processus continu et les extensions de logiciel incorporant des changements taxonomiques majeurs sont fournies par le fabricant au maximum tous les quatre ans (63).

### C. Conditions de conservation et de manipulation

La carte ANC est jetable et à usage unique. Dès réception, elle doit être stockée dans son emballage d'origine entre 2 et 8°C.

## II. Procédure d'utilisation

### A. Etape préalable

Avant de pouvoir utiliser les systèmes automatisés VITEK<sup>®</sup> 2, il est nécessaire de préparer l'inoculum, donc d'intervenir manuellement pour obtenir une culture pure. En effet, puisque l'identification d'un germe par la carte ANC porte sur les données et les connaissances sur le germe ainsi que les réactions concernant le germe en cours d'analyse, il est primordial, avant d'ensemencer le milieu de culture, de réaliser un échantillon de bactéries toutes issues de la même colonie.

Par conséquent, en cas de culture mixte, un ré-isolément doit être effectué ; il est d'ailleurs recommandé d'effectuer un contrôle de pureté pour s'assurer qu'une souche de culture pure a bien été utilisée lors du test (notamment par un repiquage suivi d'une observation du Gram).

Au cours de cette étude, le contrôle de pureté n'a pas été nécessaire puisque nous disposions de souches pures de bactéries isolées chez des patients et congelées à - 80°C.

### B. Echantillon bactérien

Une fois l'aliquot de la souche à tester partiellement décongelé à température ambiante, une petite partie de la suspension bactérienne est prélevée (pipette Pasteur munie d'une poire) et ensemencée sur le milieu de culture approprié (gélose VL ou ANC). Le milieu est ensuite incubé à 37°C, selon les conditions adéquates de durée et d'atmosphère, variables selon les germes.

Nota bene : le guide d'informations sur la carte ANC (bioMérieux) précise que l'on peut sélectionner des colonies isolées sur culture primaire, si les conditions de culture sont évidemment conformes. Néanmoins, cette étude s'étant appuyée sur des souches congelées à - 80°C, il a été nécessaire de repiquer systématiquement une ou plusieurs fois (en fonction de l'espèce bactérienne) les cultures primaires pour obtenir des colonies de taille et d'état exploitables, et donc un inoculum convenable.

L'inoculum est préparé en conformité avec les bonnes pratiques de laboratoire, en utilisant écouvillon stérile et pipette Pasteur et en travaillant près de la flamme d'un bec bunsen. Il en est de même pour la mise en culture et le repiquage.

## 1. Conditions de culture

Le milieu d'isolement est important pour l'expression des caractères biochimiques, de même que les conditions d'incubation et l'âge des cultures bactériennes.

Carte ANC – VITEK® 2	Milieux utilisés	Conditions d'incubation	Age de la culture
Corynebactéries	ANC <sup>1</sup>	35 à 37°C Aérobiose Atmosphère enrichie en CO <sub>2</sub> (10%)	24 heures
Anaérobies	VL <sup>1</sup>	35 à 37°C Anaérobiose	24 à 72 heures

Tableau 8 : Conditions de culture utilisées dans cette étude.

<sup>1</sup>Milieux employés dans cette étude (bioMérieux)

ANC (Acide Nalidixique et Colistine) : milieu sélectif des bactéries à Gram positif

VL (Viande et Levure) : milieu très nutritif et réducteur, permettant d'isoler les bactéries anaérobies strictes ou de rechercher le type respiratoire

L'âge de la culture est à respecter pour démarrer la procédure d'identification, et est variable selon les germes ; par exemple, au cours de cette étude, 24 heures ont été nécessaires pour une culture suffisante des genres *Clostridium* et *Prevotella* (*Prevotella melaninogenica* : 48 heures), 48 pour *Fusobacterium*, 72 pour *Finexgoldia*, 24 pour les corynébactéries.

## 2. Préparation de l'inoculum bactérien

L'inoculum est préparé à l'aide du DensiCheck® (Figure 7), densitomètre mesurant la densité de la suspension bactérienne contenue dans un tube à essai, et de la Station Compacte Satellite® (SCS) (Figure 8).



Figure 7 : Densitomètre.

(Reproduction photographique – propriété de bioMérieux)

L'inoculum bactérien est préparé par mise en suspension de colonies obtenues sur les milieux gélosés préconisés.

Dans le cadre de la préparation d'un inoculum de bactéries anaérobies, la carte ANC nécessite, pour sa lecture et selon le fabricant, une densité comprise entre 2,70 et 3,30 McF.

Pour ce faire, on transfère, en respectant les conditions d'asepsie, 3,0 mL de solution saline stérile aqueuse (à l'aide d'un distributeur à débit réglable) concentrée à 0,45 – 0,50 % de NaCl et de pH 4,5 à 7,0, dans un tube à essai (jetable) en plastique transparent (polystyrène) (dimensions : 12 mm x 75 mm). On transfère ensuite, à l'aide d'un écouvillon stérile, un nombre suffisant de colonies (identiques) dans le tube de solution saline jusqu'à obtenir une suspension bactérienne comprise entre 2,7 et 3,3 McF, celle-ci étant mesurée par le DensiChek® (préalablement étalonné).

#### Remarques :

- du point de vue de l'utilisateur, le plus faible inoculum requis est le meilleur ; il vaut mieux s'approcher de 2,7 que de 3,3 McF pour obtenir une meilleure identification de l'espèce bactérienne en présence ;
- l'inoculum doit être utilisé dans les 30 minutes après sa préparation ;
- l'élaboration de la charge (2,7 - 3,3 McF) préconisée par le fabricant et nécessaire pour l'identification est parfois difficile à obtenir ; lorsque les colonies se dispersent difficilement dans la solution saline, nous avons constaté que nous pouvions y remédier :
  - en augmentant sa concentration par ajout de NaCl (la turbidité a ainsi été obtenue pour *Clostridium sporogenes*) ;
  - en insistant sur l'écrasement à l'écouvillon des colonies au fond du tube suivi d'une étape de Vortex prolongée (*Prevotella melaninogenica*) ;
  - lorsque les colonies forment des "grains" qui précipitent au fond du tube, nous avons constaté que nous pouvions remplacer la solution saline classique par de l'eau déminéralisée (cela a été le cas pour *Corynebacterium amycolatum*, pour laquelle nous avons utilisé une ampoule de 3 mL d'API® Suspension - Medium (API® Coryne)).

La SCS comprend une unité de base (puce de mémoire qui enregistre les informations entrées), d'un écran, d'un lecteur de code-barres, d'un clavier et d'un emplacement destiné à recevoir la cassette (chariot) qui portera la carte ANC et le tube contenant la suspension à inoculer. La SCS permet d'associer le numéro d'échantillon du patient à la carte (par l'intermédiaire du code-barres) et au tube.



Figure 8 : Station Compacte Satellite®.  
(Reproduction photographique – propriété de bioMérieux)

Nota bene : des instructions sur la saisie des données et de chargement de la cassette dans l'instrument sont données dans le manuel d'utilisation de l'analyseur.

Dans la cassette, chaque carte ANC est placée à côté du tube approprié de façon à ce que le tube de transfert de la carte plonge dans la suspension bactérienne.

A ce stade, on doit procéder à l'étape suivante (chargement de la cassette dans le système VITEK® 2) dans les 30 minutes qui suivent la préparation des suspensions bactériennes (selon les recommandations du fabricant).

### C. Incubation et lecture

La carte ANC est ensuite placée dans le système VITEK® 2 qui va réaliser le remplissage, le scellage, l'incubation, la lecture des résultats ainsi que leur interprétation.



Figure 9 : Automate VITEK® 2 Compact.

(Reproductions photographiques – propriété de bioMérieux)



Figure 10 : Automate VITEK® 2.

Dans l'automate, la cassette est déplacée dans une chambre à vide. Le remplissage automatique des cartes est réalisé grâce à un système de vide qui force la suspension bactérienne à migrer depuis le tube de transfert jusque dans les microcapillaires, ce qui permet de remplir tous les puits réactionnels de la carte ANC.

Le tube de transfert est ensuite sectionné et les cartes sont scellées avant d'être incubées à 35,5°C (+/- 1°C). Toujours au sein de l'automate, les cartes sont transférées toutes les 15 minutes vers un système optique pour la lecture des réactions, puis sont de nouveau réintroduites automatiquement dans l'incubateur. Ces aller-et-venues aboutissent à un compte rendu du résultat des tests internes effectués par l'automate sur la carte.

### III. Résultats

L'automate produit un rapport de laboratoire, qui correspond à une estimation sur une identification qui est fonction du résultat de réactions typiques d'espèce pour un ensemble de tests biochimiques discriminants (Annexes 1 à 7).

En complément du rapport, on peut également obtenir un supplément d'informations sur la carte ANC utilisée (Figure 11).

CHU POITIERS Informations sur la carte ID	
Imprimé 19 juin 2011 21:25 CEST	
Nom	Données
ID d'échantillon :	1008171252 - 1
Type de carte :	ANC
Numéro de lot de la carte :	244200410
Date de péremption de la carte :	9 juin 2012 13:00 CEST
Code-barres de la carte :	2442 0041 0134 0975
N° de série de l'instrument :	00004FA85BC
Nom de l'instrument :	CHU POITIERS 2
Date/heure de la lecture initiale :	17 juin 2011 16:22 CEST
Date/heure de l'identification d'analyse finale :	17 juin 2011 22:37 CEST
Date/heure d'éjection de la carte :	17 juin 2011 22:47 CEST
Date/heure de la dernière impression :	19 juin 2011 21:24 CEST
Date/heure du dernier transfert :	
Version du logiciel VITEK 2 Systems installée :	04.02
ID de la cassette :	2i
N° d'emplacement de la cassette :	2
Date/heure de création de la cassette :	17 juin 2011 16:17 CEST

Figure 11 : Informations sur une carte d'identification (ID) utilisée.

#### A. Niveaux de fiabilité

Les niveaux de fiabilité indiqués par le fabricant correspondent à des niveaux de confiance pouvant être accordés à un résultat d'identification par la carte ANC (Tableau 8).

Si le profil biochimique observé n'est pas typique d'une espèce de la base de données, différentes options sont envisageables :

- plusieurs espèces sont proposées ;
- la souche peut être considérée comme appartenant à une espèce absente de la base de données ;
- le rapport propose des tests complémentaires pour aboutir à l'identification.

Niveau de fiabilité de l'identification	Choix (1 ou plusieurs taxons suspectés)	Probabilité d'identification correcte	Commentaires
Excellente	1	96 à 99 %	Un seul taxon proposé
Très bonne	1	93 à 95 %	
Bonne	1	89 à 92 %	
Acceptable	1	85 à 88 %	
Faible discrimination	2 à 3	Low Discrimination Après résolution à un choix par le système, le pourcentage de probabilité indique le nombre associé au choix sélectionné (somme des choix = 100)	2 ou 3 taxons présentent un profil biochimique similaire. Des tests complémentaires sont alors proposés, et doivent être effectués afin de les séparer et d'aboutir à une identification correcte
Non concluant	> 3	N/D	Plus de trois taxons au profil similaire, ou bien profil biochimique atypique
Organisme non identifié	0	Unidentified Organism	Profil atypique ou ne correspondant à aucune espèce de la base de données. Il est alors recommandé de vérifier la coloration de Gram et la pureté

Tableau 9 : Niveaux de confiance possibles attribués à la carte ANC.

## B. Pourcentages de probabilité

Dans le cadre du processus d'identification, le logiciel compare la série de réactions du test à la série de réactions attendue pour chaque germe ou groupe de germes pouvant être identifié par le produit.

Le logiciel calcule le "pourcentage de probabilité", une valeur quantitative qui compare les réactions observées aux réactions typiques de chaque germe. Une correspondance parfaite entre le profil de réaction du test et le profil de réaction unique d'un germe ou groupe de germes donne un pourcentage de probabilité de 99.

Si la correspondance n'est pas parfaite, le profil de réaction peut toutefois être suffisamment proche du profil de réaction attendu pour aboutir à une identification du germe précise. La plage de pourcentage de probabilité pour un taxon unique est de 85 à 99. Les valeurs s'approchant de 99 indiquent une correspondance plus importante par rapport au profil typique du germe.

Lorsqu'un profil de réaction n'est pas suffisant pour distinguer deux ou trois germes entre eux, le pourcentage de probabilité reflète cette ambiguïté. Les valeurs de probabilité rapportées indiquent plus ou moins dans l'ordre les possibilités auxquelles le profil de réaction correspond le plus. Toutefois, cet ordre n'indique pas que la correspondance à l'une des identifications possibles est clairement supérieure à une autre.

La probabilité caractéristique d'une somme totale de 100 est conservée tout au long du processus de calcul. Après résolution à un choix, le système conserve la probabilité caractéristique d'un seul choix.

Remarque : les résultats s'affichent sous la forme +, -, (+) ou (-) ; lorsqu'il n'est pas possible de déterminer un résultat clairement positif ou négatif, le résultat peut apparaître comme négatif faible (-), ce qui indique une réaction légèrement en-dessous du seuil, ou comme positif faible (+), ce qui indique une réaction légèrement au-dessus du seuil. Un résultat de réaction noté ? doit être considéré comme ininterprétable.

### C. Tests complémentaires

La base de données revendique 63 taxons incluant des bactéries anaérobies et des corynébactéries (Tableau 6). Le fabricant indique que les genres *Bifidobacterium* et *Veillonella* sont identifiés au niveau du genre (*Bifidobacterium* spp., *Veillonella* spp.), et que *Actinomyces israelii* représente un complexe de deux espèces étroitement liées, *A. israelii* et *A. gerencseriae* (anciennement connues sous le nom de *A. israelii* sérotype II).

Les tests complémentaires susceptibles d'être proposés par le système peuvent aboutir à l'identification et sont répertoriés dans le tableau 10.

Abréviation	Nom du test	Description	Matériel nécessaire (65)	Temps nécessaire (65)
<b>Branch. flt</b>	FILAMENTS RAMIFIES	Apparence de filaments ramifiés lors d'un examen au microscope (64, 65, 66)	Coloration de Gram, microscope optique	Quelques minutes
<b>CAT</b>	CATALASE	Une colonie placée sur une goutte de peroxyde d'hydrogène produit des bulles de gaz ; les bactéries contenant l'enzyme cytochrome sont catalase positive (65, 66)	Eau oxygénée (15%)	Quelques minutes
<b>ESCULIN</b>	Hydrolyse de l'ESCULINE	L'hydrolyse de l'esculine en esculétine produit un pigment noir en présence de sels de fer (64, 65, 66)	Bouillon	Au moins 24h
<b>GELATIN</b>	Hydrolyse de la gélatine	Fait appel à la gélatinase. Une réaction positive est mise en évidence par la liquéfaction du substrat de la gélatine (65, 66)	Tube de gélatine	Au moins 24h
<b>IND</b>	INDOLE	Capacité de certaines espèces à dissocier l'indole du tryptophane détecté par un colorant révélé par un réactif spécifique (réactifs de Kovacs, d'Ehrlich, N,N-diméthylacétamide) (66)	Milieu indole-nitrate	Au moins 24h

Abréviation	Nom du test	Description	Matériel nécessaire (65)	Temps nécessaire (65)
<b>LECITHIN.</b>	LECITHINASE	Un précipité entourant la colonie sur la gélose au jaune d'œuf indique une activité de la lécithinase de l'alpha-toxine produite par le germe (65)	Gélose au jaune d'œuf	24 à 72h
<b>LIP</b>	LIPASE	Un lustre nacré iridescent à la surface de la colonie sur la gélose au jaune d'œuf indique une activité de lipase (65)	Gélose au jaune d'œuf	48h à 7 jours
<b>NO3</b>	REDUCTION DES NITRATES	Test de capacité de réduction des nitrates en nitrites ou en azote (65, 66)	Bouillon indole-nitrate	Au moins 24h
<b>Point. Ends</b>	EXTREMITES EFFILEES	L'apparence de fins bâtonnets Gram négatif avec des extrémités effilées est une caractéristique pour <i>Fusobacterium nucleatum</i> (65)	Coloration de Gram, microscope optique	Quelques minutes
<b>UREASE</b>	Uréase	L'hydrolyse de l'urée libère de l'ammoniaque entraînant une alcalinisation du milieu, observable avec un indicateur de pH (coloration rouge en présence de rouge de phénol) (64, 65, 66)	Milieu urée-indole (tryptophane)	Au moins 1 heure (4 heures en général)
<b>IARABINOSE, dCELLOB, dFRUCTOSE, ...</b>	Fermentation d'hydrates de carbone*	Acidification d'une source de carbone observée avec un indicateur de pH (rouge de phénol, pourpre bromocrésol, etc.) (64, 65, 66)	Bouillon additionné de 1% d'hydrates de carbone (ou galerie API® 20A)	Au moins 24h

Tableau 10 : Tests complémentaires proposés par la carte VITEK® 2 ANC.

\* L-arabinose, D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, lactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, D-raffinose, L-rhamnose, saccharose/sucrose, salicine, amidon, D-trehalose, xylose, xylane

#### Remarques :

- les tests de l'hydrolyse de l'esculine, de l'uréase et de la fermentation des hydrates de carbone apparaissent également sur la carte ANC, mais le fabricant recommande de les utiliser tout de même comme tests additionnels complémentaires. En effet, les résultats obtenus avec des macrométhodes traditionnelles diffèrent souvent de ceux obtenus avec des microméthodes commerciales rapides ;
- il existe des systèmes commerciaux sous forme de comprimés, tel que le comprimé RD®, développé par la société danoise ROSCO Diagnostica®, qui permet de tester en quelques minutes seulement l'hydrolyse de l'esculine et de l'indole, la réduction des nitrates et l'uréase (67).

## D. Informations complémentaires

Sur le rapport de laboratoire peuvent figurer quelques **informations complémentaires**, telles que :

- « **test complémentaire** » : (voir précédemment) test externe permettant de résoudre un taxon mixte ou une identification non concluante ;
- « **taxon contre-indiqué** » : résultat de test inhabituel pour le taxon identifié ;
- « **remarque associée à certains taxons** » : par exemple « pathogène critique » pour *Corynebacterium diphtheriae*.

On peut aussi retrouver des informations soulignant un défaut de carte ou de profil biochimique :

- « **ERREUR DE CARTE – Données manquantes** » : lorsque l'intervalle entre deux lectures dépasse 40 minutes ;
- « **Profil biochimique aux réactions '+' insuffisantes – vérifier la fiabilité** » : lorsqu'il y a un profil négatif ;
- « **Profil biochimique non réactif** » : lorsqu'un profil biochimique est calculé pour un germe inconnu complètement négatif ou comprenant à la fois des tests négatifs et des tests incertains (les espèces non-réactives *Clostridium clostridioforme*, *Fusobacterium nucleatum* et *F. mortiferum* peuvent aboutir à ce profil si un test est atypique ou incertain).

## E. Tests autonomes ANC

En plus des tests internes inclus sur la carte, trois tests autonomes sont requis dans l'algorithme de l'identification ANC : coloration de Gram, morphologie et aérotolérance. Les résultats de ces trois caractères doivent être entrés dans l'ordinateur de l'automate d'incubation et de lecture afin d'aboutir à un rapport de laboratoire définitif ; il est possible de le faire à la fin de l'analyse.

Nom du test	Test/caractère	Résultat (à entrer informatiquement)	Définition
AERO	Aérotolérance	-	Anaérobie
		+	Aérobie
		?	Facultatif
GRAM	Résultats de la coloration de Gram	-	Gram négatif
		+	Gram positif
		?	Gram variable
MORPH	Morphologie	-	Bacilles
		+	Cocci
		?	Pasteurelles

Tableau 11 : Tests autonomes requis pour l'identification par la carte VITEK® 2 ANC.

# Evaluation de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC : Travail expérimental

L'implication des bactéries anaérobies dans de nombreux et sévères cas d'infections a été reportée (68, 69). Des exemples de sensibilité antimicrobienne (70, 71) et de développement de résistances des bactéries anaérobies aux antibiotiques ont été documentés (71).

La nécessité d'une méthode d'identification rapide et précise est évidente si l'on veut pouvoir mettre en place un traitement rapide et approprié.

## I. Objectif

Avant la mise sur le marché de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC par la société bioMérieux, l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries était peu automatisée et s'appuyait notamment sur différents systèmes enzymatiques encore utilisés aujourd'hui (72, 73, 74, 75, 76, 77, 78), tels que :

- pour les anaérobies : les galeries API<sup>®</sup> 20A (bioMérieux), Rapid<sup>®</sup> ID 32A (bioMérieux), RapID<sup>®</sup> ANA II (Remel<sup>®</sup>), API<sup>®</sup> ZYM (bioMérieux), les systèmes Biolog AN Microplate<sup>®</sup> (Biolog<sup>®</sup>), BD Crystal<sup>®</sup> ANR ID (Becton Dickinson<sup>®</sup>) et MicroScan Rapid Anaerobe<sup>®</sup> (Siemens<sup>®</sup>) ;
- pour les corynébactéries : les galeries API<sup>®</sup> Coryne (bioMérieux), RapID<sup>®</sup> CB Plus (Remel<sup>®</sup>), Phoenix PID<sup>®</sup> (Becton Dickinson<sup>®</sup>), les systèmes BD Crystal<sup>®</sup> GP (Becton Dickinson<sup>®</sup>), Biolog<sup>®</sup> GP2 Microplate (Biolog<sup>®</sup>) et BD Crystal<sup>®</sup> RGP (Becton Dickinson<sup>®</sup>).

La carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC est conçue pour fournir une identification rapide et précise des bactéries anaérobies et des corynébactéries retrouvées en infectiologie.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les performances de cette carte, en la testant sur des souches bactériennes isolées au sein du C.H.U. de Poitiers et en comparant les résultats à ceux obtenus par les techniciens du laboratoire à l'aide des galeries API<sup>®</sup> et/ou du séquençage.

## II. Matériel et méthodes

### A. Souches bactériennes étudiées

Un total de 66 souches cliniques ont été incluses dans cette étude, comprenant 55 souches de bactéries anaérobies et 11 souches de corynébactéries appartenant respectivement à 35 et 5 taxons d'intérêt médical, inclus dans la base de données de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC.

Ces souches ont été sélectionnées parmi des souches qui avaient été collectées sur des patients pris en charge au sein du C.H.U. de Poitiers. L'origine de leur prélèvement figure dans le tableau 12.

Origine des prélèvements	Nombre de souches
Hémoculture	36
Ostéoarticulaire	10
Tissu mou	8
ORL	3
Selle	3
Génitale	2
Pleuropulmonaire	2
Intra-abdominale	1
Autres	1

Tableau 12 : Origine de prélèvement des 66 souches cliniques étudiées.

Ces souches avaient été identifiées au moyen de galeries API<sup>®</sup> ou par séquençage et étaient conservées au laboratoire par congélation à - 80°C.

Chacune est contenue dans un tube qui comporte un numéro d'identifiant (GLIMS) ainsi que le nom de la souche (pure) qu'il renferme. Ces souches ont été sélectionnées de façon aléatoire. Les souches non congelées (sept au total) ont été isolées au cours de l'étude et provenaient de différents prélèvements.

Quatre souches appartenant à l'American Type Culture Collection ont été testées. Ces souches de référence sont pures et portent le nom « ATCC » suivi d'un numéro d'identifiant.

Une souche non revendiquée par la base de données de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC (0812-231360 *Clostridium limosum*) a été testée.

Parmi des souches dont l'identification par galerie API<sup>®</sup> avait posé problème et entraîné une identification par séquençage, 8 ont été sélectionnées (Tableau 15). Ces souches ont été testées par le système VITEK<sup>®</sup> et sont les suivantes : 0902-181144 *Actinomyces naeslundii*, 1007-200484 *Actinomyces naeslundii*, 0904-080253 *Corynebacterium jeikeium*, 1005-281319 *Corynebacterium striatum*, 0910-020570 *Clostridium ramosum*, 0908-131100 *Clostridium subterminale*, 1002-190259 *Clostridium sporogenes*, 1002-190426 *Clostridium butyricum*.

## B. Mode opératoire

### 1. **Utilisation des systèmes VITEK<sup>®</sup> 2**

La souche à tester est d'abord décongelée puis repiquée deux fois sur gélose ANC ou milieu VL selon qu'il s'agisse respectivement d'une corynébactérie ou d'une bactérie anaérobie. Lorsque la bactérie est isolée au cours de l'étude, donc quand elle provient d'un prélèvement de paille et qu'aucune congélation n'a été faite, un repiquage suffit. Le milieu est alors incubé à 35-37°C selon les conditions de culture décrites dans le Tableau 8, de 24 à 72 heures en fonction du caractère rapide ou lent de la croissance bactérienne.

Une fois les souches repiquées, les tubes sont directement recongelés afin d'être conservés.

A ce niveau de la procédure, une vérification de la pureté des souches est effectuée :

- par l'observation de l'homogénéité des colonies sur les milieux gélosés (taille, couleur, aspect, etc.) ;
- par l'observation systématique des bactéries au microscope après coloration de Gram.

Une suspension bactérienne est ensuite réalisée à partir de la culture dans la solution saline stérile et selon les conditions précisées précédemment (pages 37 et 38). La densité de l'inoculum est ajustée, grâce au DensiCheck<sup>®</sup>, de sorte qu'on se rapproche davantage du point 2,7 de l'échelle de MacFarland que du point 3,3. Le code-barres de la carte utilisée peut alors être scanné et les tubes correspondants identifiés au moyen de la Station Compacte Satellite<sup>®</sup>. Les cassettes, qui portent les cartes, sont introduites dans le VITEK<sup>®</sup> 2 et ce dans les 30 minutes qui suivent la préparation de la suspension bactérienne.

Pour s'assurer que la cassette et son chargement aient été correctement reconnus par l'automate VITEK<sup>®</sup> 2, il est préférable d'attendre quelques minutes jusqu'à ce que se déclenche un signal sonore.

Le résultat d'identification est disponible au bout de six heures. On peut alors renseigner dans l'ordinateur le caractère des trois tests autonomes (coloration de Gram, morphologie et aérotolérance) afin d'aboutir au rapport de laboratoire définitif.

Les tests complémentaires proposés par le système dans le cas d'une faible discrimination sont relevés et si possible, effectués. Par exemple, concernant la souche de *Corynebacterium jeikeium* (0904-080253) dont le niveau d'identification a été de faible discrimination (Annexe 1), le système propose de tester la présence de l'uréase pour différencier *C. jeikeium* de *C. urealyticum* : un résultat négatif du test, en faveur de *C. jeikeium*, a donc permis de clore l'identification.

## 2. Contrôle qualité

La qualité des cartes ANC a pu être déterminée par l'utilisation d'une souche de contrôle (ATCC-29303 *Prevotella bivia*) ainsi que d'une bactérie apparentée aux corynébactéries isolée d'un prélèvement de gorge au cours de l'étude (0607-178601 *Arcanobacterium haemolyticum*) (Annexes 2 et 3).

## 3. Séquençage

Un séquençage a été effectué sur 13 souches appartenant aux espèces revendiquées par la base de données du système VITEK<sup>®</sup> et dont les résultats d'identification obtenus par la carte ANC et le système API<sup>®</sup> étaient discordants.

### a) Extraction

Le matériel génétique d'une souche est extrait par déchargement d'une grosse ou de deux moyennes colonies dans 500 µL de tampon de lyse type Boiling (tris-EDTA). La lyse des bactéries s'effectue après dix minutes au bain-marie (conservation possible de la suspension obtenue à -20°C).

Le mélange réactionnel obtenu est ensuite dilué au 1/10<sup>ème</sup> (10 µL dans 90 µL d'eau stérile aliquotée) afin de correspondre à la **PCR-TR** (PCR-Temps Réel) **qualitative** effectuée ultérieurement.

### b) Préparation de la solution "MIX"

La solution MIX contient les éléments nécessaires au bon déroulement de la PCR. Les différents volumes sont calculés en fonction du nombre de souches à amplifier et introduits dans cet ordre dans un tube numéroté :

- Solution "**Master Mix**" ou "**Premix**" qui contient des enzymes de restriction, des dNTP, du MgCl<sub>2</sub> (chlorure de magnésium), etc. ;
- **Eau stérile** aliquotée ;
- "**Syber Green**" : un agent fluorescent (vert) et intercalant, qui s'intercale entre les deux brins d'ADN de façon non-spécifique ;
- **Amorces 27F** (Forward) et **685R3** (Reverse) : l'utilisation de ces amorces universelles sens et antisens permet d'identifier la grande majorité des bactéries car elles s'intéressent aux domaines hautement conservés du gène (environ 1550 pb) qui code l'ARN<sub>r</sub> 16S de la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien. Les domaines hautement conservés entourent des domaines variables en fonction des espèces.  
Ces amorces (680 pb environ) sont centrifugées avant d'être pipettées, et sont utilisables (car de taille suffisante) pour la PCR universelle / PCR-TR.

c) Amplification de la séquence (double brin) par PCR-TR

La solution contenant l'ADN bactérien à amplifier (5 µL) est ajoutée au MIX (20 µL). Un témoin négatif (20 µL de MIX et 5 µL d'eau stérile) est préparé en parallèle : sa négativité en fin de PCR permet de valider la manipulation.

Cette première PCR est automatisée : on utilise le SmartCycler<sup>®</sup>, un thermocycleur qui, relié à un programme informatique, va effectuer l'amplification de chaque brin d'ADN aux différentes températures de dénaturation, d'hybridation et d'élongation.

Après une étape d'activation de 20 secondes à 95°C, il accomplit 40 cycles successifs comprenant trois phases :

- 10 secondes à 95°C ;
- 20 secondes à 57°C ;
- 40 secondes à 72°C.

d) Purification du produit de PCR

A l'issue de cette étape, on aura préparé des monobrins. Pour y parvenir, on procède dans cet ordre :

- utilisation du tampon de dénaturation (PB, 125 µL) que l'on additionne au produit PCR (25 µL) ;
- transfert de l'échantillon sur une colonne QIAmp (QIAGEN<sup>®</sup>) posée sur un tube collecteur de 2 mL ;
- centrifugation (10000 G) pendant 60 secondes à température ambiante, au terme de laquelle on jette le liquide du tube collecteur avant de remettre la colonne sur le même tube ;
- ajout du tampon de lavage (PE, 750 µL) sur la colonne ;
- centrifugation (10000 G) pendant 60 secondes à température ambiante. Après avoir jeté le liquide du tube collecteur et remis la colonne sur le même tube, on centrifuge de nouveau (10000 G) pour ôter tout le tampon de lavage ;
- récupération de la colonne et ajout du tampon d'éluat (EB, 30 µL), puis incubation à température ambiante pendant une minute ;
- centrifugation (10000 G) à température ambiante pendant 60 secondes.

On récupère enfin l'éluat qui renferme le produit d'amplification purifié (conservation possible à - 30°C).

e) Deuxième amplification (PCR de séquençage)

Deux MIX sont préparés, chacun correspondant à une série de monobrin à amplifier. Chaque série correspond à une amorce du couple 27F / 685R3.

Les solutions MIX renferment de l'eau stérile (12,5 µL), une des deux amorces (0,5 µL), du tampon "Buffer Big Dye" (3 µL), une préparation rose "Big Dye" renfermant des fluorochromes (2 µL) et les éléments nécessaires à l'amplification (dNTP, MgCl<sub>2</sub>, etc.).

Les MIX (18 µL) sont ensuite déposés dans des tubes destinés au thermocycleur, auxquels on ajoute le produit PCR purifié (2 µL). L'appareil va alors réaliser 25 cycles d'amplification, en deux heures environ, chacun comprenant quatre phases :

- 60 secondes à 96°C ;
- 10 secondes à 96°C ;
- 5 secondes à 50°C (température d'hybridation) ;
- 180 secondes à 60°C.

A l'issue de ces cycles successifs, le thermocycleur plonge les tubes à 4°C pendant un temps indéterminé.

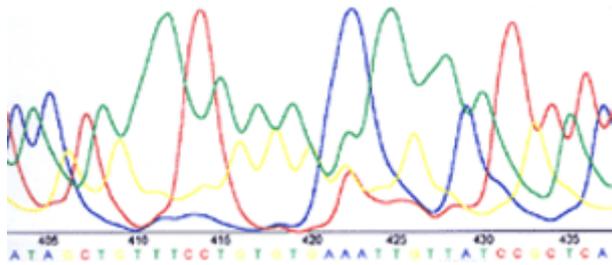
f) Purification des produits de séquençage

A l'issue de cette deuxième purification, on aura obtenu des produits de séquençage monobrin. Pour ce faire, on utilise là encore une colonne QIAmp sur laquelle on dépose, sans toucher la pente, le mélange tampon PB et produit PCR. Après une centrifugation (750 G) de 3 minutes à température ambiante, on utilise les tampons PE et EB de la même manière qu'au cours de la première purification.

Les produits de séquençage purifiés obtenus sont alors déposés dans des microtubes (200 µL) fermés d'un bouchon de caoutchouc (SEPTA) et spécifiques pour le séquenceur utilisé par la suite.

g) Séquençage

Le séquenceur est un appareil automatique qui procède au séquençage d'un brin d'ADN, ce qui correspond à l'élaboration de la succession de nucléotides le composant. Il est capable de lire un grand nombre d'échantillons marqués (fluorochromes), en réalisant la séparation des brins et la lecture des "pics". Un pic correspond à la détection d'un nucléotide dans la séquence. En effet, grâce à un laser qui excite les marqueurs fluorescents, une caméra qui récupère les rayonnements émis et des colonnes de chromatographie qui évitent une étape d'électrophorèse longue et coûteuse (tout ceci étant intégré dans l'appareil utilisé au Laboratoire du C.H.U. de Poitiers), le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes, repère alors les fragments d'ADN et leur taille précise, puis présente un résultat sous forme de courbes (Figure 12).



Dans cet exemple, la séquence obtenue est :  
 .....ATACTTTTCCTTTAAATTTT  
 ATCCCTCA.....

Figure 12 : Exemple de séquence automatique avec une couleur différente pour les quatre différents nucléotides.

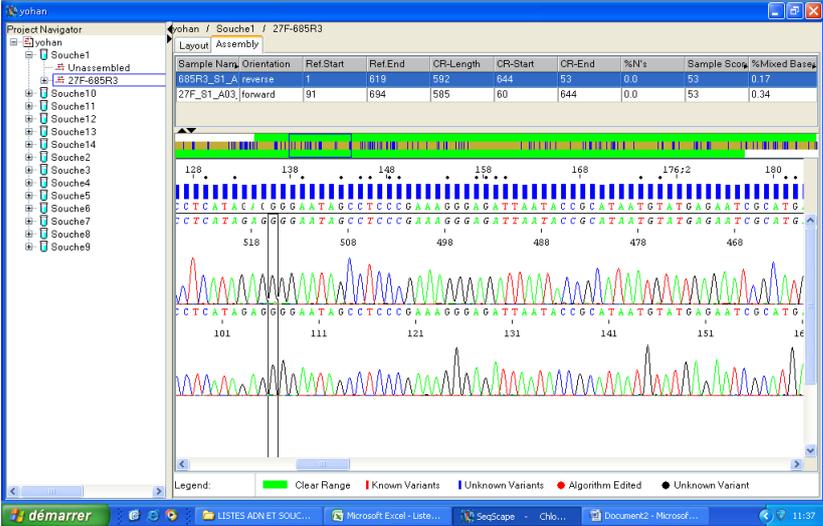


Figure 13 : Aperçu Seqscape®.

L’alignement des séquences est réalisé grâce à des logiciels informatiques. Seqscape® (Figure 13) ou encore Sequencing Analysis® version 5.1.1. permettent de confondre la séquence consensus obtenue avec une séquence aléatoire. Enfin, l’identification de la séquence s’effectue par comparaison après insertion de celle-ci dans un logiciel de banque de données (BIBI).

Ces logiciels produisent alors un rapport qui contient un arbre génotypique (“Query” correspond à l’inconnu, donc la souche à identifier) et propose une identification au niveau du genre et de l’espèce (Annexes 8 et 9).

### III. Résultats

#### A. Résultats généraux

Nous avons choisi de désigner les résultats généraux comme correspondant au résultat de l'ensemble des rapports de laboratoire qu'a produit le système VITEK® à l'issue de l'identification des souches de notre panel, **avant d'avoir eu recours à d'éventuels tests complémentaires ou autres interprétations** (Tableau 13).

Nous avons aussi décidé de qualifier de « **correcte** » ou d'« **incorrecte** » une identification obtenue par VITEK® dans le cas où elle est « **concordante** » ou « **non concordante** » avec l'identité obtenue initialement par galerie API® ou par séquençage.

Trois des quatre **souches de référence ATCC** ont été correctement identifiées par VITEK® lors d'un seul contrôle, avec un niveau de confiance « excellent ». La quatrième (0303-332693 *Prevotella oralis*) a été correctement identifiée au niveau du genre mais non au niveau de l'espèce ; elle a fait l'objet d'un séquençage qui a confirmé que l'identité de cette souche correspondait bien à celle mentionnée par l'ATCC et non au résultat donné par VITEK®.

La **souche non revendiquée par la base de données** de la carte VITEK® 2 ANC (0812-231360 *Clostridium limosum*) a été, à deux reprises, correctement identifiée au niveau du genre et incorrectement au niveau de l'espèce, et ce avec un niveau de confiance « excellent » et une probabilité d'identification correcte de 99 % (Annexe 4).

La carte ANC a permis l'identification correcte, parmi **66 souches appartenant à des taxons inclus dans la base de données et sans recours aux tests additionnels** recommandés par le fabricant, de 60 parmi 66 (90,9 %) souches testées au niveau du genre et, au niveau de l'espèce, de 43 parmi 64 (67,2 %) souches testées (puisque *Veillonella* et *Bifidobacterium* ne sont revendiqués par VITEK® qu'au niveau du genre) (Tableau 13). Les cinq souches (7,6 %) qui ont été identifiées avec une faible discrimination figurent toutes dans la liste de choix (genre et espèce correctes) que propose VITEK® dans le rapport de laboratoire. Parmi les 17 souches (25,8 %) qui ont été identifiées incorrectement, 5 ne l'ont pas été au niveau du genre et ont pourtant abouti, comme les 12 autres souches, à un niveau d'identification allant d' « acceptable » à « excellent » (Tableau 14).

Concernant les 27 souches de **bacilles anaérobies à Gram négatif** testées, 25 (92,6 %) ont été correctement identifiées au niveau du genre et 18 (66,7 %) correctement identifiées au niveau de l'espèce. Une souche de *Bacteroides fragilis* a été identifiée avec une faible discrimination (Annexe 6) : le système recommande dans ce cas un test complémentaire (IRHAMNOSE) pour départager les deux différentes espèces (*B. fragilis* et *B. ovatus*) proposées dans le rapport de laboratoire.

Parmi les 8 souches (29,6 %) qui ont été incorrectement identifiées, aucune ne l'a été au niveau de l'espèce et 6 ont été correctement identifiées au niveau du genre avec une fiabilité d'identification allant de « bonne » à « excellente » (Tableau 14). Les 2 souches qui n'ont pas bénéficié d'une identification correcte au niveau du genre (*Fusobacterium necrophorum* et *Prevotella buccae*) ont été identifiées *Clostridium clostridioforme* par VITEK®.

L'unique souche de **cocci anaérobies à Gram négatif** testée (*Veillonella* spp.) a été correctement identifiée au niveau du genre (Annexe 5).

Concernant les 22 souches de **bacilles anaérobies à Gram positif** testées, 20 (90,9 %) ont été correctement identifiées au niveau du genre dont 15 (68,2 %) au niveau de l'espèce. Deux souches pour lesquelles a été obtenue une faible discrimination appartiennent au genre *Clostridium* : *C. clostridioforme* et *C. ramosum*. Elles figurent dans la liste des espèces que propose le système dans le rapport de laboratoire. Dans ce même genre, quatre souches de *Clostridium* (*C. difficile*, *C. sporogenes*, *C. butyricum* et *C. subterminale*) ont été incorrectement identifiées et trois d'entre elles ont donné lieu à un séquençage. Une souche de *Bifidobacterium* spp. a donné lieu à une identification incorrecte au niveau du genre et de l'espèce (niveau de fiabilité « bon »). Par ailleurs, quatre souches de *Eggerthella lenta* et deux souches de *Propionibacterium acnes* ont été testées et correctement identifiées.

Parmi les 5 souches de **cocci anaérobies à Gram positif** testées, 3 (60 %) ont été correctement identifiées au niveau du genre et de l'espèce. Une souche de *Peptostreptococcus anaerobius* a été identifiée comme appartenant à l'espèce *Peptoniphilus asaccharolyticus* (fiabilité « excellente »). Une souche de *Peptoniphilus asaccharolyticus* a été identifiée avec une faible discrimination et est proposée dans le rapport de laboratoire.

Concernant les **corynébactéries et le genre *Arcanobacterium***, les 11 (100%) souches testées ont été correctement identifiées au niveau du genre et 7 (63,6%) d'entre elles l'ont été au niveau de l'espèce. L'espèce *C. jeikeium* a été identifiée avec une faible discrimination et figure dans la liste de choix. Trois souches de *Corynebacterium* ont été incorrectement identifiées : deux souches de *C. amycolatum* ont été identifiées *C. minutissimum* et *C. jeikeium*, une souche de *C. striatum* a abouti à *C. minutissimum*, et ce avec des niveaux de fiabilité allant de « bons » à « excellents ».

Enfin, concernant les **8 souches identifiées par séquençage suite à une identification défailante par le système API®** (Tableau 15), 3 ont bénéficié d'une identification par VITEK® correcte au niveau de l'espèce et 7 ont été correctement identifiées au niveau du genre. Une identification avec faible discrimination a été obtenue pour 2 souches (qui ont figuré parmi les espèces proposées dans le rapport de laboratoire) et 3 souches de *Clostridium* ont été incorrectement identifiées.

Organisme étudié (nombre de souches testées) dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une :			
	Identification correcte (/concordante)		Identification avec faible discrimination	Identification incorrecte (/non concordante)
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce		
<b>Bacilles anaérobies Gram négatif (27)</b>	<b>25 (92,6)</b>	<b>18 (66,7)</b>	<b>1 (3,7)</b>	<b>8 (29,6)</b>
<i>Bacteroides</i> spp. (13)	13 (100)	9 (69,2)	1 (7,7)	3 (23,1)
<i>Bacteroides ovatus</i> (1)	1	1	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i> (4)	4	3	1	0
<i>Bacteroides stercoris</i> (1)	1	1	0	0
<i>Parabacteroides distasonis</i> (1)	1	1	0	0
<i>Bacteroides uniformis</i> (1)	1	1	0	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i> (1)	1	1	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	1	1	0	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (2)	2	0	0	2
<i>Bacteroides caccae</i> (1)	1	0	0	1
<i>Fusobacterium</i> spp. (6)	5 (83,3)	3 (50)	0	3 (50)
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (3)	2	2	0	1
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	2	1	0	1
<i>Fusobacterium varium</i> (1)	1	0	0	1
<i>Prevotella</i> spp. (8)	7 (87,5)	6 (75)	0	2 (25)
<i>Prevotella buccae</i> (2)	1	1	0	1
<i>Prevotella intermedia</i> (1)	1	1	0	0
<i>Prevotella bivia</i> (2)	2	2	0	0
<i>Prevotella disiens</i> (1)	1	1	0	0
<i>Prevotella melaninogenica</i> (1)	1	1	0	0
<i>Prevotella oralis</i> (1)	1	0	0	1
<b>Cocci anaérobies Gram négatif (1)</b>	<b>1 (100)</b>	-	<b>0</b>	<b>0</b>
<i>Veillonella</i> spp. (1)	1 (100)	-	0	0

Organisme étudié (nombre de souches testées) dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une :			
	Identification correcte (/concordante)		Identification avec faible discrimination	Identification incorrecte (/non concordante)
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce		
<b>Bacilles anaérobies Gram positif (22)</b>	<b>20 (90,9)</b>	<b>15 (68,2)</b>	<b>2 (9,1)</b>	<b>5 (22,7)</b>
<i>Actinomyces</i> spp. (2)	2 (100)	2 (100)	0	0
<i>Actinomyces naeslundii</i> (2)	2	2	0	0
<i>Bifidobacterium</i> spp. (1)	0	-	0	1 (100)
<i>Clostridium</i> spp. (13)	12 (92,1)	7 (53,9)	2 (15,4)	4 (30,8)
<i>Clostridium septicum</i> (1)	1	1	0	0
<i>Clostridium clostridioforme</i> (2)	2	1	1	0
<i>Clostridium perfringens</i> (2)	2	2	0	0
<i>Clostridium difficile</i> (3)	3	2	0	1
<i>Clostridium sporogenes</i> (2)	1	1	0	1
<i>Clostridium ramosum</i> (1)	1	0	1	0
<i>Clostridium butyricum</i> (1)	1	0	0	1
<i>Clostridium subterminale</i> (1)	1	0	0	1
<i>Eggerthella</i> spp. (4)	4 (100)	4 (100)	0	0
<i>Eggerthella lenta</i> (4)	4	4	0	0
<i>Propionibacterium</i> spp. (2)	2 (100)	2 (100)	0	0
<i>Propionibacterium acnes</i> (2)	2	2	0	0
<b>Cocci anaérobies Gram positif (5)</b>	<b>3 (60)</b>	<b>3 (60)</b>	<b>1 (20)</b>	<b>1 (20)</b>
<i>Fingoldia magna</i> (1)	1 (100)	1 (100)	0	0
<i>Peptoniphilus</i> spp. (1)	0	0	1 (100)	0
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> (1)	0	0	1	0
<i>Peptostreptococcus</i> spp. (3)	2 (66,7)	2 (66,7)	0	1 (33,3)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	0	0	0	1
<i>Parvimonas micra</i> (2)	2	2	0	0

Organisme étudié (nombre de souches testées) dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une :			
	Identification correcte (/concordante)		Identification avec faible discrimination	Identification incorrecte (/non concordante)
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce		
<b>Corynébactéries et <i>Arcanobacterium</i> spp. (11)</b>	<b>11 (100)</b>	<b>7 (63,6)</b>	<b>1 (9,1)</b>	<b>3 (27,3)</b>
<i>Corynebacterium</i> spp. (10)	10 (100)	6 (60)	1 (10)	3 (30)
<i>Corynebacterium jeikeium</i> (1)	1	0	1	0
<i>Corynebacterium amycolatum</i> (2)	2	0	0	2
<i>Corynebacterium striatum</i> (4)	4	3	0	1
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> (3)	3	3	0	0
<i>Arcanobacterium</i> spp. (1)	1 (100)	1 (100)	0	0
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (1)	1	1	0	0
<b>TOTAL (66)</b>	<b>60 (90,9)</b>	<b>43 (67,2)</b>	<b>5 (7,6)</b>	<b>17 (25,8)</b>

Tableau 13: Identification des 66 souches cliniques de bactéries anaérobies et corynébactéries par la carte ANC, sans application des tests complémentaires.

Organisme étudié dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Identification par VITEK® 2 - ANC	Identification concordante		Fiabilité de l'identification			
		Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce	AC	B	TB	Ex
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	X	-				X
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	X	-		X		
<i>Bacteroides caccae</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	X	-		X		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>	-	-			X	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	X	-		X		
<i>Fusobacterium varium</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	X	-			X	
<i>Prevotella buccae</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>	-	-			X	
<i>Prevotella oralis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	X	-				X
<i>Bifido spp.</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	-	-		X		
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>	X	-				X
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Eubacterium limosum</i>	-	-		X		
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>	X	-	X			
<i>Clostridium subterminale</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	X	-				X
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	-	-				X
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	X	-		X		
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	X	-				X
<i>Corynebacterium striatum</i>	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	X	-				X
<b>TOTAL (17)</b>		<b>12</b>	<b>-</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>7</b>

Tableau 14 : Souches incorrectement identifiées par la carte VITEK® 2 ANC, sans application des tests complémentaires.

AC : acceptable

B : bonne

TB : très bonne

Ex : excellente

Organisme étudié dont l'identité a été initialement déterminée par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une :			
	Identification concordante		Identification avec faible discrimination	Identification non concordante
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce		
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	1	0	0
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	1	0	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	0	1	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	1	0	0
<i>Clostridium ramosum</i>	1	0	1	0
<i>Clostridium subterminale</i>	1	0	0	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	0	0	0	1
<i>Clostridium butyricum</i>	1	0	0	1
<b>TOTAL (8)</b>	<b>7 (87,5)</b>	<b>3 (37,5)</b>	<b>2 (25)</b>	<b>3 (37,5)</b>

Tableau 15: Identification par la carte ANC (sans application de tests complémentaires) des souches dont l'identification n'avait pas été concluante par API®.

## B. Tests complémentaires, séquençages et observations

Le Tableau 16 rassemble les résultats du séquençage effectué dans cette étude sur les souches dont l'identification par VITEK® 2 ANC a été incorrecte par rapport à leur identité initiale (déterminée par API® ou séquençage).

Organisme étudié dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Souches incorrectement identifiées par VITEK®	Identification par séquençage
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 1012-101408	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 1101-010697	<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bacteroides vulgatus</i>
<i>Bacteroides caccae</i> 1009-171639	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides dorei</i>
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 1008-171252	<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Prevotella buccae</i> 1002-231231	<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Prevotella buccae</i>
<i>Prevotella oralis</i> ATCC-332693	<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>Clostridium sporogenes</i> 1002-190259	<i>Eubacterium limosum</i>	<i>Clostridium subterminale</i>
<i>Clostridium butyricum</i> 1002-190426	<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Anaerospobacter mobilis</i>
<i>Clostridium subterminale</i> 0908-131100	<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Clostridium subterminale</i>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 0912-281897	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1003-031928	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	<i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1101-192049	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>
<i>Corynebacterium striatum</i> 0408-290258	<i>Corynebacterium minutissimum</i>	<i>Corynebacterium singulare</i>

Tableau 16: Résultat des séquençages obtenus sur les souches incorrectement identifiées par VITEK®.

Les observations qui suivent accompagnent les résultats présentés dans les tableaux 13, 14, 15 et 16.

## 1. Genre *Bacteroides*

Sans l'application de tests complémentaires, toutes les souches testées ont été correctement identifiées au niveau du genre (Tableau 13). Quatre souches n'ont pas été correctement identifiées au niveau de l'espèce.

Pour confondre la souche de *B. fragilis* (1011-120227), identifiée avec faible discrimination et en concurrence avec *B. ovatus*, le fabricant préconise de tester la fermentation du rhamnose (Annexe 6). Dans cette étude, une simple coloration de Gram en faveur de *B. fragilis* (bacilles de grande taille et réguliers) nous a permis de clore l'identification. Si ce test avait été proposé par le fabricant, le système aurait d'emblée permis l'identification correcte de cette souche au niveau de l'espèce.

Les deux souches de *B. thetaiotaomicron* (1012-101408 et 1101-010697) testées ont été identifiées par VITEK<sup>®</sup> comme étant *B. ovatus* avec des niveaux d'identification « bon » et « excellent ». Or, le séquençage (Annexes 8 et 9) réalisé par la suite démontre que l'identification par Vitek<sup>®</sup> est incorrecte dans les deux cas (Tableau 16). Précisons que la galerie d'identification API<sup>®</sup> 20A ne peut différencier *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus*.

Il en est de même pour la souche de *B. caccae* (1009-171639), identifiée par VITEK<sup>®</sup> comme correspondant à *B. thetaiotaomicron* et dont le séquençage a incriminé *B. dorei* ; mais puisque cette souche n'appartient pas à la base de données VITEK<sup>®</sup>, on ne peut imputer ce résultat à la performance du système. Cela montre néanmoins comment ce dernier se comporte vis-à-vis d'une souche qui ne fait pas partie de sa base de données.

Notons que *B. dorei* est absente également de la base de données du système API<sup>®</sup>.

## 2. Genre *Fusobacterium*

Sans avoir eu recours à des tests complémentaires, la majorité des souches de ce genre ont été correctement identifiées par VITEK<sup>®</sup>.

Plusieurs souches testées au sein de ce genre n'ont pas bénéficié d'une identification correcte au niveau de l'espèce.

La souche de *F. nucleatum* (1011-301803), non identifiée par VITEK<sup>®</sup> au cours d'un premier essai, a ensuite été incorrectement identifiée au niveau de l'espèce, à deux reprises et avec des niveaux de fiabilité « bons », sans que le système ne propose de tests discriminants allant à l'encontre de *F. mortiferum*. Or la coloration de Gram, qui faisait apparaître des bacilles Gram négatif sous forme de grands filaments fusiformes, tendait vers *F. nucleatum*. Nous avons ainsi testé la production d'indole ainsi que la sensibilité de cette souche à la bile : la positivité de ces deux tests nous a permis de conclure que l'espèce recherchée était bien *F. nucleatum*.

Même si ces deux tests n'ont pas été recommandés par le fabricant, le système a tout de même orienté l'investigation et ainsi rendu correcte l'identification au niveau de l'espèce.

Nota bene : le test de l'indole nécessite l'ajout d'un réactif de révélation et ne peut donc pas être intégré dans la carte VITEK® 2 ANC.

De la même façon, VITEK® a conclu à l'identification de *F. varium* (1005-281900) comme correspondant à *F. nucleatum*, à deux reprises et avec des fiabilités d'identification « bonne » puis « très bonne ». Le test de la production d'indole ne pouvant différencier ces deux espèces, la résistance à la bile ainsi que la morphologie observée après coloration de Gram (petits bacilles à Gram négatif) ont permis de clore l'identification en incriminant *F. varium*.

Une souche de *F. necrophorum* (1008-171252) n'a pas été correctement identifiée au niveau du genre (*Clostridium clostridioforme*). Un Gram non révélateur n'ayant pu différencier les deux genres bactériens, le séquençage effectué montre que l'identification par VITEK® est incorrecte. Notons que la galerie API® 20A ne peut différencier *F. nucleatum* et *F. necrophorum*.

### 3. Genre *Prevotella*

Le système VITEK® a permis une identification performante de ce genre bactérien.

Sept des huit souches testées ont été correctement identifiées au niveau du genre et six ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce.

L'analyse VITEK® de la souche de *Prevotella oralis* (ATCC-332693) a rendu *Prevotella melaninogenica* sans aucun test biochimique à l'encontre. Le séquençage a confirmé ultérieurement l'identité ATCC et donc l'erreur d'identification commise par VITEK®. Notons que la galerie API® 20A ne peut différencier *P. oralis* et *P. melaninogenica*.

Une souche de *P. buccae* (1002-231231) n'a pas été correctement identifiée au niveau du genre, VITEK® ayant clos l'identification de cette souche comme correspondant à *Clostridium clostridioforme*. Nous avons mis en culture cette souche en présence de vancomycine : l'absence de culture autour du disque, et donc la sensibilité à l'antibiotique, allait en faveur du *Clostridium*. Un séquençage a finalement tranché en faveur de *P. buccae*. Si l'on compare les résultats de l'identification par VITEK® obtenue sur les souches 0912-160485 *C. clostridioforme* et 1012-190625 *P. buccae*, corrects au niveau du genre et de l'espèce, on constate que ces deux souches ont des profils biochimiques différents. Ainsi on peut suspecter une erreur de manipulation qui aurait pu conduire à une analyse incorrecte par VITEK® de la souche 1002-231231 *P. buccae*. Notons que *P. buccae* est absente de la base de données de la galerie API® 20A.

Nota bene : en ayant renseigné "Gram négatif" dans les tests autonomes nécessaires à l'identification de 1002-231231 *P. buccae* ou même de 1008-171252 *Fusobacterium necrophorum*, le système a quand même conclu à l'identification de *C. clostridioforme*. La banque de données VITEK<sup>®</sup> prévoit-elle un résultat intermédiaire au Gram (+/-) pour *Clostridium clostridioforme*? Il est vrai qu'en pratique la coloration au Gram apparaît variable pour cette espèce.

#### **4. Genre Veillonella**

L'identification de la souche 1003-161618 testée a été concluante avec une fiabilité « excellente ».

Ce genre bactérien possède un profil biochimique VITEK<sup>®</sup> dont les caractères sont tous négatifs : le système suspecte alors un profil peu réactif et conseille de vérifier la viabilité du germe (Annexe 5).

#### **5. Genre Actinomyces**

L'identification, à la suite d'une seconde tentative, des deux souches d'*A. naeslundii* (1007-200484 et 0902-181144) testées a été correcte au niveau du genre et de l'espèce.

#### **6. Genre Bifidobacterium**

Au cours de cette étude, nous avons eu l'occasion d'isoler deux souches de *Bifidobacterium* et avons alors remarqué le caractère lent de leur croissance. De plus, lorsqu'il semblait qu'une quantité suffisante de colonies avait poussé et pouvait fournir assez de bactéries pour réaliser l'inoculum, nous nous sommes heurtés à un matériel difficile à mettre en suspension donnant ainsi une densité bien inférieure à 2,7 McFarland.

La première souche de *Bifidobacterium* a atteint une densité si faible que l'identification n'a pu aboutir à aucun résultat. La souche testée (1103-120931), avec une charge bactérienne de 1,83, a été incorrectement identifiée par VITEK<sup>®</sup> qui a proposé *Actinomyces naeslundii* avec un niveau de fiabilité « bon » et cinq tests à l'encontre. Puisqu'ici toutes les prérogatives du fabricant n'ont pas été respectées, ce résultat ne peut jouer en la défaveur de VITEK<sup>®</sup>.

#### **7. Genre Clostridium**

L'identification de ce groupe bactérien a été efficace au niveau du genre mais s'est révélée moins satisfaisante, avant l'application des tests complémentaires, au niveau de l'espèce.

Une souche de *Clostridium limosum* (0812-231360) (Annexe 4), absente de la base de données VITEK<sup>®</sup> et non comptabilisée dans le panel, a été soumise à son analyse pour une identification sur des cultures de 24 puis 72 heures : le système a rendu comme résultat *C. sporogenes* à deux reprises avec un niveau de confiance « excellent ». VITEK<sup>®</sup> ne laisse aucun doute sur l'identification. Néanmoins, on connaît l'espèce de façon certaine puisque cette souche, qui n'est que difficilement identifiable par API<sup>®</sup> 20A (tests complémentaires requis) et absent de la base de données de la galerie Rapid ID<sup>®</sup> 32A, avait été identifiée par séquençage.

La souche incorrectement identifiée au niveau du genre et de l'espèce correspond à *C. sporogenes* (1002-190259), identifiée à deux reprises par VITEK<sup>®</sup> comme étant *Eubacterium limosum* (avec des tests à l'encontre différents dans les deux cas) puis identifiée par séquençage comme étant *C. subterminale*. Cette souche fait partie du groupe dont l'identification par API<sup>®</sup> n'avait pas été concluante (Tableau 15) et avait ainsi bénéficié d'un séquençage dont le résultat avait été *C. sporogenes*. En conséquence, on ne peut interpréter davantage et imputer ce résultat à VITEK<sup>®</sup>.

Notons que la galerie API<sup>®</sup> 20A ne peut différencier *C. sporogenes* et *C. botulinum*.

Cinq souches de *Clostridium* n'ont pas été correctement identifiées au niveau de l'espèce.

Une souche de *C. clostridioforme* (1105-061052) a été identifiée par VITEK<sup>®</sup> avec une faible discrimination entre cette espèce et *C. septicum*. Si l'on se réfère à ce que conclut le système, ces deux espèces ont des profils biochimiques proches qui divergent au niveau des caractères biochimiques AGALi et OPS, et le test de la gélatinase proposé permettrait de les différencier. Nous nous sommes fiés au Gram pour conclure à l'identification de *C. clostridioforme* (qui apparaît généralement comme un bacille à Gram négatif en forme de cigare).

Une des trois souches de *C. difficile* (1204-050293) testées n'a pas été correctement identifiée par VITEK<sup>®</sup> (*C. sporogenes*, fiabilité « excellente »). En comparant le profil biochimique de celle-ci avec ceux de 1011-042165 *C. sporogenes* et 1204-070363 *C. difficile*, on constate que cette souche diffère de la première au niveau de ELLM puis de la seconde au niveau de LeuA et PyrA. Nous avons pu cependant conclure à l'identification de *C. difficile* par la positivité de la souche à un CD Test Kit<sup>®</sup> ainsi que par l'observation des colonies (aspect d'une flore variée sur la gélose) et l'émanation d'une odeur caractéristique (crottin de cheval).

La souche de *C. ramosum* testée (0910-020570) a été identifiée par VITEK<sup>®</sup> avec une faible discrimination. Pour différencier cette espèce du *C. clostridioforme* proposé, le fabricant recommande de tester la réduction des nitrates ; or, selon le fabricant lui-même, 10 % des souches de *C. clostridioforme* ne produit pas de nitrate réductase. Par conséquent, en présence d'un résultat négatif de cette réaction, il demeure impossible de conclure.

Ainsi, par l'observation de petits bacilles Gram positif au Gram, nous avons exclu *C. clostridioforme* et conclu à l'identification de *C. ramosum*.

La souche de *C. butyricum* testée (1002-190426) n'a abouti à aucune identification au terme d'un premier VITEK<sup>®</sup> pour ensuite être identifiée au cours d'une deuxième tentative comme un *C. clostridioforme* (fiabilité « acceptable »). Sachant que *C. butyricum* se présente sous la forme d'un bacille à Gram positif formant des spores subterminales, nous avons observé la coloration de Gram et avons admis que son résultat allait en faveur de cette espèce. L'erreur d'identification de VITEK<sup>®</sup> a ensuite été appuyée par le séquençage de cette souche qui a identifié *Anaerospobacter mobilis* (cette bactérie anaérobie stricte Gram positif présente des endospores terminales et, selon l'étude de H. Jeong et coll. (79), s'apparente d'un point de vue phylogénétique aux *Clostridiaceae*). Etant donné que *A. mobilis* n'existe pas dans la base de données VITEK<sup>®</sup>, le résultat de cette analyse ne peut lui être imputable. De plus, il faut noter que les galeries API<sup>®</sup> 20A et Rapid<sup>®</sup> ID 32A ne peuvent identifier *C. butyricum* sans recourir à des tests complémentaires.

La souche de *C. subterminale* testée (0908-131100) a été incorrectement identifiée par VITEK<sup>®</sup> (*C. histolyticum*, fiabilité « excellente ») et son identité a été confirmée par séquençage. Rappelons que l'identification de cette souche n'avait pas été concluante par API<sup>®</sup> (souche absente de la base de données API<sup>®</sup> 20A) et qu'un séquençage avait été nécessaire.

## **8. Genre *Eggerthella***

Les quatre souches de *E. lenta* (0604-052702, 0906-140541, 1003-290196 et 1009-011818) testées ont toutes été correctement identifiées par VITEK<sup>®</sup> (fiabilité « excellente »). Le profil biochimique obtenu est identique et ne présente qu'un caractère positif (ARG).

## **9. Genre *Propionibacterium***

Au sein de ce genre, deux souches de *P. acnes* (1005-281900 et 1009-071316) ont été testées et correctement identifiées par VITEK<sup>®</sup> (fiabilité « très bonne »).

## **10. Genre *Fingoldia***

L'unique souche de *F. magna* (1102-110285) testée a été correctement identifiée par VITEK<sup>®</sup> (fiabilité « excellente ») tandis que cette espèce ne peut être identifiée par API<sup>®</sup> 20A sans des tests complémentaires.

## **11. Genre *Peptoniphilus***

La souche de *Peptoniphilus asaccharolyticus* (1902-142020) testée a été identifiée par VITEK<sup>®</sup> avec une faible discrimination.

Pour confondre cette espèce, nous avons effectué, comme recommandé par le fabricant, le test de l'indole : un résultat positif incriminait *P. asaccharolyticus*. Toutefois, un résultat négatif ne pouvait correspondre avec certitude à l'identification de *Fingoldia magna* puisque, d'après le fabricant, 10 % des souches de *P. asaccharolyticus* ne peuvent dissocier l'indole du tryptophane et aboutissent à un résultat négatif à ce test. Mais dans ce cas présent, le test effectué sur une culture jeune s'est révélé positif. L'identification par VITEK<sup>®</sup> a donc été concluante.

## 12. Genre *Peptostreptococcus*

Parmi trois souches testées et représentatives de ce genre bactérien, une n'a pas abouti à une identification correcte.

Deux souches (1010-062034 et 0606-116102) de *Parvimonas micra* (dit anciennement *Peptostreptococcus / Micromonas micros*) ont été testées et correctement identifiées par VITEK<sup>®</sup> (fiabilité « très bonne » et « excellente »).

La souche de *P. anaerobius* (0912-281897) testée a été, à deux reprises, incorrectement identifiée par VITEK<sup>®</sup> comme correspondant à *Peptoniphilus asaccharolyticus* (fiabilité « très bonne » puis « excellente »). Le profil biochimique proposé diffère cependant de celui obtenu pour la souche 1902-142020 et ce au niveau des caractères PheA, TyrA et LeuA. De plus, l'espèce recherchée (*P. anaerobius*) donnant un résultat positif au test de l'indole, et puisque cela a été le cas dans cet exemple, il était impossible de conclure. Nous avons donc réalisé le séquençage de cette souche qui a confirmé que l'identification faite par VITEK<sup>®</sup> est incorrecte.

## 13. Genre *Corynebacterium*

Les dix souches de *Corynebacterium* testées ont toutes été correctement identifiées au niveau du genre. Quelques difficultés ont été observées concernant l'identification au niveau de l'espèce, et ce avant l'application des tests complémentaires.

La souche de *C. jeikeium* (0904-080253) testée a été identifiée par VITEK<sup>®</sup> avec une faible discrimination (Annexe 1). Cette espèce et *C. urealyticum* diffèrent au niveau de leur profil biochimique par URE, LeuA et ELLM. La différenciation de ces deux espèces se fait facilement grâce au test complémentaire de l'uréase proposé par le système, au terme duquel on aboutit à une identification correcte.

Les deux souches de *C. amycolatum* (1003-031928 et 1101-192049) testées n'ont pas été correctement identifiées par VITEK<sup>®</sup> au niveau de l'espèce et ce avec des fiabilités « bonne » et « excellente ». Un séquençage réalisé sur la première (1003-031928) incrimine *Clostridium sporogenes* ; ici, l'analyse de cette souche par VITEK<sup>®</sup> ne pouvait d'emblée être satisfaisante puisque l'on a renseigné dès le départ le caractère "positif" de l'aérotolérance au sein des tests autonomes demandés. On ne peut donc imputer cette identification incorrecte à VITEK<sup>®</sup>.

En revanche, le séquençage de la seconde souche (1101-192049) identifie *C. amycolatum* et confirme l'erreur d'identification faite par VITEK®.

Notons que *C. amycolatum* ne peut être identifiée par la galerie API® Coryne sans tests complémentaires.

Une souche de *C. striatum* (0408-290258) a été identifiée par VITEK® comme correspondant à *C. minutissimum* (fiabilité « excellente »). Le séquençage réalisé par la suite donne un résultat qui incrimine *C. singulare*, une espèce très proche de *C. minutissimum* d'un point de vue phylogénétique. L'espèce *C. singulare* n'étant pas incluse dans la base de données du système, on peut conclure que l'identité de cette souche va en faveur de l'identification proposée par VITEK®.

Précisons aussi que *C. minutissimum* n'existant pas dans la base de données du système API® (API® 20A, Rapid® ID 32A, API® Coryne), la souche ne pouvait être identifiée comme telle par ce système qui a cependant incorrectement incriminé *C. striatum*.

#### 14. Genre *Arcanobacterium*

Un germe isolé d'un prélèvement de gorge, donnant des colonies légèrement hémolytiques sur gélose ANC, des bacilles corynéformes au Gram (positif) et faisant suspecter une souche de *Arcanobacterium haemolyticum* a été identifié comme tel par VITEK® (fiabilité « très bonne ») (Annexe 3).

#### C. Résultats finaux

En tenant compte des observations et des interprétations décrites précédemment, on obtient des résultats qui renseignent de la capacité réelle d'identification de la carte VITEK® 2 ANC, évaluée non pas sur 66 mais sur 59 souches, et qui sont rassemblés dans les tableaux 17, 18 et 19.

Les taux finaux d'identification correcte deviennent alors (Tableau 17) :

- au niveau du genre : **96,6 %** (57/59) au lieu de 90,9 % (60/66) ;
- au niveau de l'espèce : **87,9 %** (51/58) au lieu de 67,2 % (43/64).

Ces interprétations rendent compte d'une manière plus juste de la capacité de la carte ANC à identifier les souches cliniques incluses dans cette étude.

La réalisation des tests additionnels demandés par VITEK® permet une identification correcte aux niveaux du genre et de l'espèce dans de nombreux cas. Ainsi, grâce à ces tests, les résultats obtenus sont respectivement pour le genre et l'espèce de 95,8 % (23/24) et 83,3 % (20/24) pour les souches de **bacilles à Gram négatif**, 100 % (19/19) et 94,7 % (18/19) pour les souches de **bacilles à Gram positif**, 80 % (4/5) et 80 % (4/5) pour les souches de **cocci à Gram positif**, 100 % (10/10) et 90 % (9/10) pour les souches du groupe des **corynébactéries** et ***Arcanobacterium* spp.**

De fait, le nombre de souches incorrectement identifiées par VITEK® diminue de 17 (Tableau 14) à 7 (Tableau 18) après réalisation des tests additionnels.

Au sujet des souches dont l'identification initiale par système API® n'avait pas abouti (Tableau 15), le système VITEK® s'est montré efficace puisque ces souches, après considérations des tests additionnels, ont toutes été identifiées de façon satisfaisante (Tableau 19) hormis la souche 0908-131100 *Clostridium subterminale* qui n'a pas été correctement identifiée au niveau de l'espèce.

Organisme étudié (nombre de souches testées) dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une identification concordante :	
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce
<b>Bacilles anaérobies Gram négatif (24)</b>	<b>23 (95,8)</b>	<b>20 (83,3)</b>
<i>Bacteroides</i> spp. (12)	12 (100)	10 (83,3)
<i>Bacteroides ovatus</i> (1)	1	1
<i>Bacteroides fragilis</i> (4)	4	4
<i>Bacteroides stercoris</i> (1)	1	1
<i>Parabacteroides distasonis</i> (1)	1	1
<i>Bacteroides uniformis</i> (1)	1	1
<i>Bacteroides ureolyticus</i> (1)	1	1
<i>Bacteroides vulgatus</i> (1)	1	1
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> (2)	2	0
<i>Fusobacterium</i> spp. (6)	5 (83,3)	5 (83,3)
<i>Fusobacterium necrophorum</i> (3)	2	2
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	2	2
<i>Fusobacterium varium</i> (1)	1	1
<i>Prevotella</i> spp. (6)	6 (100)	5 (83,3)
<i>Prevotella intermedia</i> (1)	1	1
<i>Prevotella bivia</i> (2)	2	2
<i>Prevotella disiens</i> (1)	1	1
<i>Prevotella melaninogenica</i> (1)	1	1
<i>Prevotella oralis</i> (1)	1	0
<b>Cocci anaérobies Gram négatif (1)</b>	<b>1 (100)</b>	-
<i>Veillonella</i> spp. (1)	1 (100)	-

Organisme étudié (nombre de souches testées) dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une identification concordante :	
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce
<b>Bacilles anaérobies Gram positif (19)</b>	<b>19 (100)</b>	<b>18 (94,7)</b>
<i>Actinomyces</i> spp. (2)	2 (100)	2 (100)
<i>Actinomyces naeslundii</i> (2)	2	2
<i>Clostridium</i> spp. (11)	11 (100)	10 (90,9)
<i>Clostridium septicum</i> (1)	1	1
<i>Clostridium clostridioforme</i> (2)	2	2
<i>Clostridium perfringens</i> (2)	2	2
<i>Clostridium difficile</i> (3)	3	3
<i>Clostridium sporogenes</i> (1)	1	1
<i>Clostridium ramosum</i> (1)	1	1
<i>Clostridium subterminale</i> (1)	1	0
<i>Eggerthella</i> spp. (4)	4 (100)	4 (100)
<i>Eggerthella lenta</i> (4)	4	4
<i>Propionibacterium</i> spp. (2)	2 (100)	2 (100)
<i>Propionibacterium acnes</i> (2)	2	2
<b>Cocci anaérobies Gram positif (5)</b>	<b>4 (80)</b>	<b>4 (80)</b>
<i>Fingoldia magna</i> (1)	1 (100)	1 (100)
<i>Peptoniphilus</i> spp. (1)	1 (100)	1 (100)
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> (1)	1	1
<i>Peptostreptococcus</i> spp. (3)	2 (66,7)	2 (66,7)
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> (1)	0	0
<i>Parvimonas micra</i> (2)	2	2

Organisme étudié (nombre de souches testées) dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une identification concordante :	
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce
<b>Corynébactéries et <i>Arcanobacterium</i> spp. (10)</b>	<b>10 (100)</b>	<b>9 (90)</b>
<i>Corynebacterium</i> spp. (9)	9 (100)	8 (88,9)
<i>Corynebacterium jeikeium</i> (1)	1	1
<i>Corynebacterium amycolatum</i> (1)	1	0
<i>Corynebacterium striatum</i> (4)	4	4
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i> (3)	3	3
<i>Arcanobacterium</i> spp. (1)	1 (100)	1 (100)
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i> (1)	1	1
<b>TOTAL (59)</b>	<b>57 (96,6)</b>	<b>51 (87,9)</b>

Tableau 17 : Identification, après intégration des tests additionnels, des 59 souches cliniques de bactéries anaérobies et corynébactéries par la carte ANC.

X : Données résultantes des **tests additionnels** comprenant les tests complémentaires ainsi que les observations et les interprétations décrites précédemment

Organisme étudié dont l'identité a été initialement déterminée par API® ou par séquençage	Identification par VITEK® 2 - ANC	Identification concordante		Fiabilité de l'identification			
		Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce	AC	B	TB	Ex
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	X	-				X
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides ovatus</i>	X	-		X		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Clostridium clostridioforme</i>	-	-			X	
<i>Prevotella oralis</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>	X	-				X
<i>Clostridium subterminale</i>	<i>Clostridium histolyticum</i>	X	-				X
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	-	-				X
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	X	-				X
<b>TOTAL (7)</b>		<b>5</b>	<b>-</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>5</b>

Tableau 18 : Souches incorrectement identifiées par la carte VITEK® 2 ANC, après considération des tests additionnels.

AC : acceptable ; B : bonne ; TB : très bonne ; Ex : excellente

Organisme étudié dont l'identité a été initialement déterminée par séquençage	Nombre de souches (%) pour lesquelles a été obtenue, par VITEK®, une :		
	Identification concordante		Identification non concordante
	Au niveau du genre	Au niveau de l'espèce	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	1	0
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	1	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	1	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	1	0
<i>Clostridium ramosum</i>	1	1	0
<i>Clostridium subterminale</i>	1	0	1
<i>Clostridium sporogenes</i>	Retirée des résultats		
<i>Clostridium butyricum</i>	Retirée des résultats		
<b>TOTAL (6)</b>	<b>6 (100)</b>	<b>5 (83,3)</b>	<b>1 (16,7)</b>

Tableau 19 : Identification par la carte ANC, après considération des tests additionnels, des souches dont l'identification par API® n'avait pas été concluante.

## IV. Discussion

Précisons que dans cette étude, les performances de la carte Vitek® 2 ANC ont été évaluées sur la base d'un panel de 40 taxons (Tableau 13) et non 63 comme le prévoit la base de données du système (Tableau 6). Sa capacité d'identification a donc été appréciée à 63,5 % de ses possibilités. Et en tenant compte des tests additionnels décrits précédemment, le nombre de taxons testés revient alors au nombre de 36 (Tableau 17) ce qui donne une évaluation des capacités du système ramenée à 57 % de ses possibilités.

Groupe bactérien	Nombre de souches testées		Pourcentage d'identification correcte (/concordante) avant et après tests additionnels			
			Au niveau du genre		Au niveau de l'espèce	
<b>ANAEROBIES</b>	<b>55</b>	<b>49</b>	<b>89,1</b>	<b>95,9</b>	<b>67,9</b>	<b>87,5</b>
<b>BGN</b>	27	24	92,6	95,8	66,7	83,3
<i>dont ATCC</i>	4	4	100	100	75	75
<b>CGN</b>	1	1	100	100	-	-
<b>BGP</b>	22	19	90,9	100	68,2	94,7
<b>CGP</b>	5	5	60	80	60	80
<i>Corynebacterium</i>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>60</b>	<b>88,9</b>
<i>Arcanobacterium spp.</i>	<b>1</b>	<b>(1)</b>	<b>100</b>	<b>(100)</b>	<b>100</b>	<b>(100)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>59</b>	<b>90,9</b>	<b>96,6</b>	<b>67,2</b>	<b>87,9</b>
<b>Souches non référencées par VITEK®</b>	2	(2)	100	(100)	0	(0)

Tableau 20 : Performances de la carte VITEK® 2 ANC avant et après l'application des tests additionnels.

 Taux d'identification correcte ≥ 90 %

 Taux d'identification correcte ≥ 95%

BGN : bacilles à Gram négatif ; CGN : cocci à Gram négatif ; BGP : bacilles à Gram positif ; CGP : cocci à Gram positif

**x** : Données résultantes des **tests additionnels** effectués

Il a été établi qu'un système d'identification devrait être capable d'identifier les micro-organismes isolés dans un laboratoire de biologie médicale avec un pourcentage d'identification correcte d'au moins 90 % et d'au moins 95 % pour les micro-organismes isolés couramment (comparativement aux méthodes conventionnelles) (**80**).

Ce seuil a été atteint, dans notre étude, pour l'identification **au niveau du genre** (avec et sans recours aux tests additionnels) pour tous les groupes bactériens testés sauf pour celui des CGP (Tableau 20). Néanmoins, ce groupe n'étant représenté que par cinq souches (Tableau 17), le seuil ne peut être atteint que si VITEK® les identifie toutes correctement, ce qui n'a pas été le cas pour une d'entre elles.

Concernant l'étude de Lee et coll. et celle de Mory et coll. (81), avec un nombre de CGP beaucoup plus conséquent (55 et 24 souches) et donc plus révélateur de la performance du système sur ce groupe bactérien, le seuil a été atteint (98,2 % et 100 %) pour l'identification au niveau du genre comme de l'espèce.

La carte VITEK® 2 ANC a permis, après considération des tests additionnels, une identification correcte **au niveau de l'espèce** de 87,9 % des souches testées. Même si ce taux est inférieur au seuil souhaité, nous avons noté un pourcentage d'identification correcte élevé pour tous les groupes bactériens testés avec une identification correcte des souches appartenant :

- **aux *Bacteroides* du groupe *fragilis***, qui correspondent aux bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées (Tableau 1). Toutes les souches de *B. fragilis*, *B. distasonis*, *B. vulgatus*, *B. ovatus* et *B. uniformis* ont été correctement identifiées.

En revanche, les deux souches de *B. thetaiotaomicron* testées n'ont pas été pleinement identifiées. Mais si l'on se réfère aux deux autres études portant sur la carte ANC et citées précédemment, le système est apte à identifier correctement cette espèce pour 14 des 16 souches testées soit 87,5 % (82) et pour 13 des 14 souches testées soit 92,9 % (81). Notons aussi que la base de données du système API® 20A ne peut différencier *B. thetaiotaomicron* et *B. ovatus* ;

- **à l'espèce *Bacteroides ureolyticus***, également fréquemment isolée ;
- **aux genres *Corynebacterium* et *Arcanobacterium***, pour lesquels l'identification au niveau de l'espèce n'a été incorrecte que pour une souche de *C. amycolatum*, à l'instar de l'étude de Mory et coll. dont les cinq souches testées ont été correctement identifiées ;
- **aux bacilles à Gram positif non sporulés** (*Actinomyces naeslundii*, *Eggerthella lenta* et *Propionibacterium acnes*), en précisant qu'une seconde analyse VITEK® des deux souches d'*Actinomyces naeslundii* a été nécessaire pour obtenir leur identification correcte.

En effet, le premier essai a abouti dans les deux cas à un profil biochimique composé en grande majorité de tests négatifs ainsi qu'à une faible discrimination (seuls des *Clostridium* ont figuré dans la liste de choix) (Annexe 7). Il est donc important de prêter une attention particulière au résultat d'identification apporté par le système en cas de profil biochimique peu réactif. Si l'on s'était légitimement fié à ce que proposait VITEK® et si l'on avait réalisé les tests complémentaires suggérés (indole, lécithinase, lipase), on aurait abouti à l'identification d'un *Clostridium* et non d'*A. naeslundii*, et cela dans un délai incompatible avec l'instauration d'une thérapeutique rapide puisque les tests de la lécithinase et de la lipase peuvent nécessiter respectivement 72 heures et 7 jours d'incubation (Tableau 10) ;

- **aux bacilles à Gram positif sporulés**, hormis une souche, VITEK® n'ayant pu identifier la souche de *Clostridium subterminale*. Par ailleurs, cette espèce n'ayant pas été analysée par Lee et coll. ni par Mory et coll., il est difficile de conclure quant à la capacité de VITEK® à identifier cette espèce ;
- **au genre *Fusobacterium***, en notant qu'au sujet de la souche de *F. necrophorum* (1008-171252) qui n'a pas été correctement identifiée, le système a conclu à l'identification d'un *Clostridium clostridioforme* dont le profil biochimique VITEK® "idéal" ne semble présenter que deux caractères positifs (ELLM et BGURi). Ce profil est très proche de celui obtenu avec la souche de *F. necrophorum* (1010-310678) qui ne présente également que deux caractères positifs (ELLM et PHOS). Seul l'aspect du Gram, non révélateur dans notre étude, aurait pu différencier ces deux espèces. Ainsi, lorsque VITEK® conclut à l'identification d'un *C. clostridioforme*, ce qui est en outre possible que l'on renseigne "Gram positif" ou "Gram négatif" dans les tests autonomes, il est préférable d'observer l'aspect des bactéries au Gram encore plus minutieusement ;
- **au genre *Prevotella***, au sein duquel la souche de *P. oralis* n'a pas été correctement identifiée au niveau de l'espèce. En revanche, les six souches de cette espèce testées par Mory et coll. ont été correctement identifiées. Précisons que la base de données actuelle de la galerie API® 20 A ne permet pas de différencier *P. oralis* et *P. melaninogenica* ;
- **aux cocci à Gram positif** car VITEK® est capable d'identifier ce groupe bactérien avec une fiabilité très performante. D'après les résultats qu'ont collectés Lee et coll. et Mory et coll. concernant la souche de *Peptostreptococcus anaerobius* (incorrectement identifiée dans notre étude), la totalité des représentants de cette espèce ont été correctement identifiés. De surcroît, la performance de la carte ANC vis-à-vis des cocci Gram positif anaérobies est d'autant plus utile que le système API® 20 A ne les identifie pas au niveau de l'espèce, sauf pour *Peptoniphilus asaccharolyticus*.

Les souches *Bacteroides dorei* (1009-171639) et *Clostridium limosum* (0812-231360), non référencées par VITEK®, n'ont pas été incluses dans les résultats de cette étude pour ne pas porter préjudice à la fiabilité du système. L'étude de ces souches a en effet pointé l'incapacité de VITEK® à identifier les espèces non admises dans la base de données. Cette particularité importante a été largement observée à l'issue de l'étude de Lee et coll. (82) qui a mis à l'épreuve les performances du système sur un panel de 301 souches cliniques anaérobies dont 100 ne faisaient pas partie de la base de données du système. Cette étude établit, comme observé dans notre étude, que l'identification de ces 100 bactéries joue en défaveur du système puisque les résultats proposés aboutissent en grande majorité à l'identification d'une espèce autre que celle recherchée, ce qui peut alors induire en erreur l'utilisateur et être délétère pour trouver une thérapeutique adaptée.

Quand on utilise un système automatisé d'identification de bactéries, on doit savoir que son aptitude à générer des résultats d'identification correcte est directement corrélée à la qualité de sa base de données. Il est donc important de porter une attention particulière à la version de la base de données présente et ce qu'elle inclue. La première version est généralement moins performante que les versions suivantes, ce qui peut rendre la comparaison des résultats obtenus avec un même système difficile.

Depuis Juin 2013, le C.H.U. de Poitiers utilise la spectrométrie de masse. Avant cela, le protocole d'identification d'une bactérie anaérobie passait par l'ensemencement systématique d'une galerie Rapid<sup>®</sup> ID 32A voire d'une galerie API<sup>®</sup> 20A. La première présente l'avantage d'une incubation en aérobiose en 4 à 6 heures seulement contre 24 à 48 h en anaérobiose pour la seconde.

Concernant l'identification des corynébactéries, une galerie API<sup>®</sup> Coryne pouvait être utilisée. Si ce système nécessite une durée d'incubation longue de 18 à 48 heures, elle permet néanmoins l'identification d'un large panel de corynébactéries (26 espèces) et autres genres bactériens (*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Gardnerella*, *Listeria*, *Rhodococcus*, etc. (Tableau 21)).

Afin de comparer les résultats obtenus par VITEK<sup>®</sup> à ceux initialement acquis par API<sup>®</sup> ou par séquençage, il est intéressant de considérer les bases de données de chaque système ayant été utilisé au C.H.U. de Poitiers pour identifier les souches que l'on a testées (Tableau 21) (62).

On s'aperçoit d'emblée que la base de données de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC rassemble des bactéries qui ne sont pas toutes identifiables par les autres systèmes, quantitativement ou qualitativement :

- avec 36 tests biochimiques intégrés dans la carte ANC, la spécificité des résultats tend à être supérieure avec VITEK<sup>®</sup> qu'avec API<sup>®</sup> 20A (20 tests), Rapid<sup>®</sup> ID 32A (29) ou API<sup>®</sup> Coryne (20) ;
- la base de données VITEK<sup>®</sup> 2 ANC comprend 52 taxons de bactéries anaérobies, à égalité avec celle d'API<sup>®</sup> 20A mais bien inférieure à celle de Rapid<sup>®</sup> ID 32A (80 taxons). Concernant les bactéries des genres *Corynebacterium* et *Arcanobacterium*, la base de données API<sup>®</sup> Coryne s'étend à 29 taxons contre 10 seulement pour VITEK<sup>®</sup> 2 ANC ;
- les espèces *Lactobacillus gasseri*, *Microbacterium flavescens* et *Staphylococcus saccharolyticus* ne sont potentiellement identifiables que par la carte ANC ;
- les genres *Corynebacterium* et *Arcanobacterium* ne sont pas identifiables par les galeries API<sup>®</sup> 20A et Rapid<sup>®</sup> ID 32A mais sont présents dans la base de données API<sup>®</sup> Coryne. Les espèces *C. amycolatum*, *C. minutissimum* et *C. striatum* ne sont cependant identifiables par API<sup>®</sup> Coryne qu'avec des tests complémentaires ;

- les espèces *Clostridium butyricum* et *Peptostreptococcus anaerobius* ne sont identifiables par API® 20A et Rapid® ID 32A qu'avec des tests complémentaires.

Par rapport à la galerie API® 20A, le système VITEK® apporte une automatisation quasi-complète de l'identification (inoculation, incubation et lecture), dans de meilleures conditions d'incubation (6 heures en aérobiose contre 24 à 48 heures en anaérobiose) et sans nécessité d'ajout de réactifs avant la lecture des réactions.

La galerie API® 20 A effectue une identification biochimique des bactéries qui repose sur une lecture visuelle des réactions, procédure simple et reproductible mais subjective en pratique. En effet, le changement de couleur de l'indicateur coloré n'est pas toujours évident à apprécier ce qui peut rendre l'interprétation des tests difficile (83). Par ailleurs, le recours à des tests complémentaires est souvent nécessaire (Tableau 21). La plupart des espèces non glucidolytiques et les espèces de culture difficile (*Prevotella* spp. ou certaines espèces de *Fusobacterium* par exemple) ne peuvent pas être identifiées par ce système.

De plus, sa base de données actuelle ne permet pas de différencier certaines espèces appartenant au même genre bactérien :

- *Actinomyces meyeri*\* et *A. odontolyticus* ;
- *Bacteroides* : *B. ovatus*\* et *B. thetaiotaomicron*\*, *B. stercoris*\* et *B. eggerthii* ;
- *Fusobacterium necrophorum*\* et *F. nucleatum*\* ;
- *Prevotella* : *P. intermedia*\* et *P. disiens*\*, *P. melaninogenica*\* et *P. oralis*\* ;
- *Clostridium* : *C. beijerinckii* et *C. butyricum*\*, *C. botulinum* et *C. sporogenes*\* ;
- *Lactobacillus acidophilus*\* et *L. jensenii* ;
- *Propionibacterium propionicum*\* et *P. avidum* ;
- aucune espèce de cocci Gram positif anaérobies, sauf *Peptoniphilus asaccharolyticus*.

\* espèces présentes dans la base de données VITEK®2 ANC

La galerie Rapid® ID 32A explore le profil enzymatique des bactéries en détectant des enzymes préformées, et de ce fait nécessite une incubation d'environ 4 heures seulement. Elle apporte plusieurs autres améliorations par rapport à l'API® 20A notamment une incubation en aérobiose, un plus grand nombre de taxons intégrés dans sa base de données, une fréquence moindre de recours à des tests complémentaires, une lecture visuelle des réactions colorées globalement plus confortable (coloration très marquée pour la production d'indole ou pour bon nombre de tests explorant les glycosidases) (84), et même une automatisation possible de l'étape de lecture si le laboratoire dispose des semi-automates ATB-Expression® ou Mini-API®.

En revanche, par rapport à la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC, la galerie Rapid<sup>®</sup> ID 32A n'accepte l'utilisation que d'un seul type de milieu d'isolement – la gélose Columbia au sang supplémentée en vitamine K (85) – ainsi que d'un inoculum de 4 sur l'échelle de Mc Farland. De plus, la nécessité d'ajouter des réactifs avant lecture et la possible automatisation d'une seule étape de l'identification (et seulement si le laboratoire dispose d'un semi-automate) jouent en défaveur de ce système par rapport au système VITEK<sup>®</sup>. En l'absence d'automate, la lecture visuelle des réactions peut s'avérer difficile (notamment pour les tests détectant les arylamidases (84)).

La galerie Rapid<sup>®</sup> ID 32A n'oblige pas, pour l'interprétation, de prendre en compte la morphologie bactérienne, l'aspect après coloration de Gram, la présence de spores, le test de la catalase ou le type respiratoire. Ceci semble constituer un avantage mais est en réalité préjudiciable car, compte tenu de ce que l'on a pu observer au cours de cette étude, les tests autonomes requis dans l'algorithme de l'identification ANC – morphologie, Gram et type respiratoire – ont été très profitables pour interpréter les identifications et ne doivent pas être écartés. Enfin, ce système ne peut identifier les genres *Arcanobacterium* et *Corynebacterium* mais intègre cependant dans sa base de données un nombre de bactéries anaérobies supérieur à celle de VITEK<sup>®</sup>.

Au vu de la part que consacre la base de données VITEK<sup>®</sup> 2 ANC aux corynébactéries (dix différents taxons), il est évident que ce système n'est pas destiné à être d'une grande spécificité quant à l'identification de ce groupe bactérien. En comparaison, la galerie API<sup>®</sup> Coryne, qui a été le premier système d'identification commercialisé dédié spécifiquement aux bactéries corynéformes (62), rassemble 29 taxons (*Corynebacterium* et *Arcanobacterium*) dans sa base de données. Des bactéries absentes de la base de données VITEK<sup>®</sup> et importantes sur le plan clinique sont incluses dans la base de données API<sup>®</sup> Coryne. Il s'agit notamment des différents biotypes (*belfanti*, *gravis*, *intermedius* et *mitis*) de *Corynebacterium diphtheriae*, de *Dermabacter* spp., de *Rothia* spp. et de *Turicella otitidis* qui sont fréquemment rencontrés dans des prélèvements humains, ou encore de *Corynebacterium glucuronolyticum*, de *C. pseudotuberculosis*, de *C. auris* et de *C. macginleyi* dont l'identification au niveau de l'espèce par VITEK<sup>®</sup> permettrait de préciser la pathogénicité (voir Partie 3).

Néanmoins, cette galerie présente de nombreux inconvénients : aucune étape automatisée, un temps d'incubation long (24 à 48 heures), une densité de l'inoculum requise supérieure à 6 Mc Farland qui nécessite une culture riche impliquant souvent le recours à l'ensemencement de plusieurs milieux gélosés (86), l'addition de réactifs avant lecture, la difficulté de lecture de certaines réactions enzymatiques (87) ou encore le recours fréquent à des tests complémentaires.

La carte ANC permet tout de même l'identification des corynébactéries importantes lorsque sont pris en compte l'impact clinique (telles que *C. diphtheriae*, *C. ulcerans* ou *Arcanobacterium haemolyticum*), la fréquence d'isolement ou encore la résistance aux antibiotiques (telles que *C. jeikeium*, *C. urealyticum* ou *C. amycolatum* qui, de par leur grande résistance, nécessitent d'être identifiées au niveau de l'espèce).

Dans notre étude, les disparités que l'on a pu observer entre les résultats obtenus par VITEK<sup>®</sup> et ceux initialement définis par API<sup>®</sup> ont été rassemblés dans le Tableau 22, en incluant toutefois les souches de notre panel pour lesquelles l'identification par API<sup>®</sup> 20A est d'emblée annoncée par le fabricant comme nécessitant des tests complémentaires.

Ce tableau met en avant l'efficacité de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC qui a correctement identifié douze souches pour lesquelles le système API<sup>®</sup> ne s'est pas révélé satisfaisant. Inversement, API<sup>®</sup> a été plus performant que VITEK<sup>®</sup> dans l'identification de trois souches.

Les souches de bactéries anaérobies qui ne sont pas identifiables par le système API<sup>®</sup> 20 A sans un recours à des tests complémentaires ont été, en grande majorité, correctement identifiées par VITEK<sup>®</sup> sans recours à des tests additionnels. Cet avantage qu'apporte VITEK<sup>®</sup> peut être toutefois nuancé si l'on considère que ces souches ont été initialement identifiées par le système Rapid<sup>®</sup> ID 32A, puisque toutes les bactéries de ce panel incluses dans sa base de données sont, d'après le fabricant, identifiables par cette galerie sans avoir recours à des tests complémentaires. Il n'en reste pas moins que VITEK<sup>®</sup>, en plus d'apporter une automatisation et globalement une plus grande maniabilité, a pu amener à identifier sept souches pour lesquelles API<sup>®</sup> n'a pu aboutir.

Si l'on envisage qu'une galerie API<sup>®</sup> Coryne a été utilisée pour l'identification initiale des souches de corynébactéries présentes dans notre étude, alors VITEK<sup>®</sup> a été performant pour identifier correctement ce panel, avec une meilleure maniabilité et une identification plus efficace de cinq souches (Tableau 23).

Organisme	VITEK®	API® 20A	Rapid® ID 32A	API® Coryne
<i>Actinomyces israelii</i>	+	+	+	
<i>Actinomyces meyeri</i>	+	+/-	+	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>		+/-	+	
<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	+	+	
<i>Actinomyces neuii</i> ssp <i>anitratu</i> s				+
<i>Actinomyces neuii</i> ssp <i>neuii</i>				+
<i>Actinomyces radingae</i>				+
<i>Actinomyces turicensis</i>				+
<i>Actinomyces viscosus</i>		+	+	
<i>Anaerococcus prevotii</i> (anciennement <i>Peptostreptococcus prevotii</i> )		+/-	+	
<i>Arcanobacterium bernardiae</i>				+
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	+			+
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+			+
<i>Arthrobacter</i> spp.				+
<i>Bacteroides caccae</i>	+	+	+	
<i>Bacteroides capillosus</i>			+	
<i>Bacteroides distasonis</i>	+	+	+	
<i>Bacteroides eggerthii</i>		+/-	+	
<i>Bacteroides fragilis</i>	+	+	+	
<i>Bacteroides merdae</i>			+	
<i>Bacteroides ovatus</i>	+	+/-	+	
<i>Bacteroides stercoris</i>	+	+/-	+	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	+	+/-	+	
<i>Bacteroides uniformis</i>	+	+	+	
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	+	+	+	
<i>Bacteroides vulgatus</i>	+	+	+	
<i>Bifidobacterium</i> spp.	+	+	+	
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		+/-	+	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		+/-	+/-	
<i>Bifidobacterium breve</i>		+/-	+/-	
<i>Bifidobacterium dentium</i>		+/-		
<i>Bifidobacterium longum</i>			+/-	
<i>Brevibacterium casei</i>				+/-
<i>Brevibacterium epidermidis</i>				+/-
<i>Capnocytophaga</i> spp.			+	
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>			+/-	
<i>Capnocytophaga ochracea</i>			+/-	
<i>Capnocytophaga sputigena</i>			+/-	
<i>Cellulosimicrobium cellulans</i> (anciennement <i>Oerskovia xanthineolytica</i> )				+
<i>Clostridium baratii</i> (anciennement <i>C. barati</i> )	+	+	+	
<i>Clostridium beijerinckii</i>		+/-	+/-	
<i>Clostridium bifermentans</i>	+	+	+	
<i>Clostridium botulinum</i>		+/-	+	
<i>Clostridium butyricum</i>	+	+/-	+/-	
<i>Clostridium cadaveris</i>	+	+	+	
<i>Clostridium clostridioforme</i> (anciennement <i>C. clostridiiforme</i> )	+	+	+	
<i>Clostridium difficile</i>	+	+	+	
<i>Clostridium fallax</i>			+	
<i>Clostridium glycolycum</i>			+	
<i>Clostridium histolyticum</i>	+	+	+	
<i>Clostridium innocuum</i>		+	+	

Organisme	VITEK®	API® 20A	Rapid® ID 32A	API® Coryne
<i>Clostridium limosum</i>		+/-		
<i>Clostridium paraputrificum</i>	+	+	+	
<i>Clostridium perfringens</i>	+	+	+	
<i>Clostridium ramosum</i>	+	+	+	
<i>Clostridium septicum</i>	+	+	+	
<i>Clostridium sordellii</i>	+	+	+	
<i>Clostridium sporogenes</i>	+	+/-	+	
<i>Clostridium subterminale</i>	+	+/-	+	
<i>Clostridium tertium</i>	+	+	+	
<i>Clostridium tetani</i>		+/-	+	
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>			+	
<i>Collinsella aerofaciens</i> (anciennement <i>Eubacterium aerofaciens</i> )	+	+		
<i>Corynebacterium accolens</i>				+
<i>Corynebacterium afermentans</i>				+/-
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	+			+/-
<i>Corynebacterium argenteratense</i>				+
<i>Corynebacterium auris</i>				+/-
<i>Corynebacterium bovis</i>				+
<i>Corynebacterium coyleae</i>				+/-
<i>Corynebacterium cystitidis</i>				+/-
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	+			+
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> (anciennement <i>C. seminale</i> )				+
<i>Corynebacterium</i> groupe F-1				+
<i>Corynebacterium</i> groupe G				+
<i>Corynebacterium</i> groupe renale				+
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	+			+
<i>Corynebacterium kutscheri</i>				+
<i>Corynebacterium macginleyi</i>				+
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	+			+/-
<i>Corynebacterium pilosum</i>				+/-
<i>Corynebacterium propinquum</i>				+
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	+			+
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>				+
<i>Corynebacterium renale</i>				+/-
<i>Corynebacterium seminale</i>				+/-
<i>Corynebacterium striatum</i>	+			+/-
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	+			+
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	+			+
<i>Dermabacter hominis</i>				+
<i>Dietzia</i> spp.				+/-
<i>Eggerthella lenta</i> (anciennement <i>Eubacterium lentum</i> )	+	+	+	
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>				+ <sup>b</sup>
<i>Eubacterium limosum</i>	+	+	+	
<i>Fingoldia magna</i> (anciennement <i>Peptostreptococcus magnus</i> )	+	+/-	+	
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	+	+	+	
<i>Fusobacterium necrogenes</i>			+	
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	+	+/-	+	
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	+	+/-	+	
<i>Fusobacterium varium</i>	+	+	+	
<i>Gardnerella vaginalis</i>				+ <sup>a, b</sup>

Organisme	VITEK®	API® 20A	Rapid® ID 32A	API® Coryne
<i>Gemella morbillorum</i>		+	+	
<i>Gordonia</i> spp.				+/-
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	+/-	+	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+			
<i>Lactobacillus jensenii</i>		+/-		
<i>Leifsonia aquatica</i> (anciennement <i>Corynebacterium aquaticum</i> )				+/-
<i>Leptotrichia buccalis</i>			+	
<i>Listeria</i> spp.				+ <sup>a, b</sup>
<i>Listeria grayi</i>				+ <sup>b, c</sup>
<i>Listeria innocua</i>				+/- <sup>a, b, c</sup>
<i>Listeria ivanovii</i>				+/- <sup>a, b, c</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>				+/- <sup>a, b, c</sup>
<i>Listeria seeligeri</i>				+/- <sup>a, b, c</sup>
<i>Listeria welshimeri</i>				+/- <sup>a, b, c</sup>
<i>Microbacterium flavescens</i>	+			
<i>Nocardia</i> spp.				+/-
<i>Oerskovia turbata</i> (anciennement <i>Cellulomonas turbata</i> )				+/-
<i>Parvimonas micra</i> (anciennement <i>Micromonas micros</i> , anciennement <i>Peptostreptococcus micros</i> )	+	+/-	+	
<i>Peptococcus niger</i>		+/-		
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i> (anciennement <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> )	+	+	+	
<i>Peptoniphilus indolicus</i> (anciennement <i>Peptostreptococcus indolicus</i> )		+/-	+	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	+/-	+/-	
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>		+	+	
<i>Porphyromonas endodontalis</i>			+	
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			+	
<i>Prevotella bivia</i>	+	+	+	
<i>Prevotella buccae</i>	+		+	
<i>Prevotella buccalis</i>			+	
<i>Prevotella denticola</i>			+	
<i>Prevotella disiens</i>	+	+/-	+	
<i>Prevotella intermedia</i>	+	+/-	+	
<i>Prevotella loescheii</i>			+	
<i>Prevotella melaninogenica</i>	+	+/-	+	
<i>Prevotella oralis</i>	+	+/-	+	
<i>Propionibacterium acnes</i>	+	+	+	+
<i>Propionibacterium avidum</i>		+/-		+
<i>Propionibacterium granulosum</i>	+	+	+	
<i>Propionibacterium propionicus</i> (anciennement <i>P. propionicum</i> )	+	+/-	+	
<i>Rhodococcus equi</i>				+/-
<i>Rothia dentocariosa</i>				+
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	+			
<i>Streptococcus constellatus</i>		+ <sup>a, b</sup>		
<i>Streptococcus intermedius</i>		+ <sup>a</sup>		
<i>Streptococcus saccharolyticus</i>		+		
<i>Turicella otitidis</i>				+/-
<i>Veillonella</i> spp.	+		+	
<i>Veillonella parvula</i>		+		

Tableau 21 : Espèces identifiables par différents systèmes d'identification (62).

 Base de données VITEK® 2 ANC

+ : espèce présente dans la base de données

+/- : espèce identifiable avec tests complémentaires

<sup>a</sup> : espèce présente dans la base de données de API® 20 Strep

<sup>b</sup> : espèce présente dans la base de données de Rapid® ID 32 Strep

<sup>c</sup> : espèce présente dans la base de données de API® Listeria

Organisme	API® 20A / Rapid® ID 32A		Vitek® 2 ANC	
	Identification	Commentaire	Identification	Commentaire
<i>Bacteroides ovatus</i> 1010-141775	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Bacteroides stercoris</i> 1011-221504	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 1012-101408	+/- +	TC nécessaires	-	<i>B. thetaiotaomicron</i> par séquençage
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> 1101-010697	-	TA nécessaires	-	<i>B. vulgatus</i> par séquençage
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 1104-030216	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 1010-310678	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Fusobacterium necrophorum</i> 1008-171252	+/- +	TC nécessaires	-	<i>F. necrophorum</i> par séquençage
<i>Fusobacterium nucleatum</i> 1011-301803	+/- +	TC nécessaires	+	TA effectués
<i>Fusobacterium nucleatum</i> 0904-190515	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Prevotella intermedia</i> 1002-231935	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Prevotella disiens</i> ATCC-294263	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Prevotella melaninogenica</i> ATCC-258453	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Prevotella oralis</i> ATCC-332693	+/- +	TC nécessaires	-	<i>P. oralis</i> par séquençage
<i>Actinomyces naeslundii</i> 1007-200484	-	Identifié par séquençage	+	
<i>Actinomyces naeslundii</i> 0902-181144	-	Identifié par séquençage	+	

Organisme	API® 20A / Rapid® ID 32A		Vitek® 2 ANC	
	Identification	Commentaire	Identification	Commentaire
<i>Clostridium sporogenes</i> 1011-042165	+/- +	TC nécessaires	+	
<i>Clostridium ramosum</i> 0910-020570	-	Identifié par séquençage	+	TA effectués
<i>Clostridium subterminale</i> 0908-131100	-	Identifié par séquençage, absent de la BDO	-	Identifié par séquençage
<i>Fingoldia magna</i> 1102-110285	+/- +	Absent de la BDO	+	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> 0912-281897	+/- +	Absent de la BDO	-	<i>P. anaerobius</i> par séquençage
<i>Parvimonas micra</i> 1010-062034	+/- +	Absent de la BDO	+	
<i>Parvimonas micra</i> 0606-116102	+/- +	Absent de la BDO	+	

Tableau 22 : Disparités des identifications des souches de bactéries anaérobies obtenues avec la carte ANC et le système API®.

 Souche correctement identifiée par VITEK® et incorrectement par API®

 Souche correctement identifiée par API® et incorrectement par VITEK®

+ : identification concluante

+/- : identification obtenue avec tests complémentaires

- : identification non concluante

BDO : Base de Données Opérantes

TC : Tests Complémentaires

TA : Tests additionnels

Organisme	API® Coryne		VITEK® 2 ANC	
	Identification	Commentaire	Identification	Commentaire
<i>Corynebacterium jeikeium</i> 0904-080253	-	Identifié par séquençage Identifiable sans TC	+	TC effectués
<i>Corynebacterium amycolatum</i> 1104-192049	+/-	Absent de la BDO	-	<i>C. amycolatum</i> par séquençage
<i>Corynebacterium striatum</i> 1005-281319	-	Identifié par séquençage	+	
<i>Corynebacterium striatum</i> 0408-290258	-	<i>C. singulare</i> par séquençage, absent de la BDO	+	<i>C. singulare</i> par séquençage, absent de la BDO mais proche de <i>C. minutissimum</i>
<i>Corynebacterium striatum</i> 0407-170229	+/-	TC nécessaires	+	
<i>Corynebacterium striatum</i> 0407-172207	+/-	TC nécessaires	+	

Tableau 23 : Disparités des identifications des souches de corynébactéries obtenues avec la carte ANC et le système API®.

 Souche correctement identifiée par VITEK® et incorrectement par API®

 Souche correctement identifiée par API® et incorrectement par VITEK®

+ : identification concluante

+/- : identification obtenue avec tests complémentaires

- : identification non concluante

BDO : Base de Données Opérantes

TC : Tests Complémentaires

# CONCLUSION

La carte ANC et l'automate VITEK<sup>®</sup> 2 constituent un système d'utilisation simple qui donne des résultats satisfaisants pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries fréquemment rencontrées en microbiologie clinique. L'obtention rapide du résultat et l'automatisation quasi-complète de l'identification apportent des avantages majeurs, notamment par rapport aux galeries d'identification phénotypique conventionnelles.

Dans notre étude, nous avons constaté que lorsque le germe recherché est inclus dans la base de données du système, l'espèce identifiée tend à être la bonne.

Si un doute subsiste quant à l'identité du germe, le(s) test(s) complémentaire(s) proposé(s) par le système complète(nt) l'analyse pour aboutir à un résultat définitif.

Le système est néanmoins inapproprié lorsque l'identification porte sur un germe absent de sa base de données : nous avons noté qu'un résultat erroné pouvait être apporté sans que le système n'émette de doute. En conséquence, le biologiste doit conserver un esprit critique, et pour chaque résultat donné, doit prendre en compte des tests simples tels que la coloration de Gram, l'aspect des colonies, leur odeur, le type respiratoire, etc.

Aussi, les performances du système Vitek<sup>®</sup> 2 seraient-elles augmentées grâce à une extension de la base de données (intégration d'autres espèces de bactéries anaérobies et de corynébactéries susceptibles d'être rencontrées en pathologie humaine) et grâce à l'incorporation d'autres réactifs au sein de la carte ANC.

De plus, l'adjonction de certains tests complémentaires diminuerait la propension du système à incorrectement identifier une espèce donnée.

Cependant, la réalisation de chacun de ces tests nécessite que le laboratoire dispose des outils correspondants et cela repousse dans tous les cas le délai d'obtention du résultat d'identification.

Enfin, avec l'arrivée de la spectrométrie de masse au laboratoire du C.H.U. de Poitiers en Juin 2013 et compte tenu des avantages qu'elle apporte (rapidité de l'identification, faible inoculum requis, faible coût par analyse, etc.), il est peu probable que le système Vitek<sup>®</sup> 2 ANC soit adopté par le laboratoire pour identifier les bactéries anaérobies et les corynébactéries en routine. Néanmoins, le coût élevé du spectromètre ainsi que de son entretien annuel nécessitent des moyens dont tous les laboratoires ne disposent pas.

# SOURCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Coproweb, Anaérobies strictes, <http://coproweb.free.fr/bactsyst/anastric.htm>.
- (2) Dublanchet A, Breuil J. *Bacteroides fragilis* entérotoxigène. *Med Mal Infect.* (1996), 26(5) : 192-5.
- (3) Engelkirk PG, Duben-Engel kirk J, Dowel VR. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology. Belmont. *Star Publishing Compagny.* (1992), 1-462.
- (4) Dubreuil L, Behra-Miellet J. Considérations sur la taxonomie : une évolution indispensable et attendue. *Med Mal Infect.* Elsevier SAS (2000), 30 (suppl2) : 77-84.
- (5) Holdeman CV, Coyo EP, Moore WEC. Anaerobe laboratory Manual. 4<sup>th</sup> ed. Blacksburg, *Virginia Institute and State University.*
- (6) Bronz I, Olsen I. Multivariate analyses of cellular fatty acids in *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Wolinella*, *Campylobacter* spp. *J Clin Microbiol.* (1991), 29 : 183-9.
- (7) Combe ML, Pons JL. Genetic relationships within the genus *Prevotella* analysed by multilocus enzyme electrophoresis and DNA-DNA hybridization. *Syst Appl Microbiol.* (2000).
- (8) Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol.* (1998), 38 : 128-31.
- (9) Shah HN, Collins MD. Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. *Int J Syst Bacteriol.* (1989), 39 : 85-7.
- (10) Duerden BI, Magee JT, Hindmarch JM, Goodwin L. Classification of black-pigmented anaerobes by pyrolysis mass spectrometry. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (1993), 6 : 121-4.
- (11) Jousimies-Somer HR, Summanen PH, Wexler H, Finegold SM, Gharbia SE, Shah HN. *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* and other anaerobic Gram-negative bacteria. Murray PR, editor. *Manual of clinical microbiology.* Washington : ASM Pres. (2003), 880-901.
- (12) Sedallian A, Dubreuil L. Généralités sur les bactéries anaérobies. In : Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C, editors. *Précis de bactériologie clinique.* Paris : Eska. (2000), 1543-58.
- (13) Vandamme P, Daneshvar MI, Dewhirst FE, Paster BJ, Kersters K, Goosens H, et al. Chemotaxonomic analyses of *Bacteroides gracilis* and *Bacteroides ureolyticus* and reclassification of *B. gracilis* as *Campylobacter gracilis* comb nov. *Int J Syst Bacteriol.* (1995), 45 : 145-52.
- (14) Sakamoto M, Suzuki M, Limeda M, Ishikawa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig. gen nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2002), 52 : 841-9.
- (15) Kageyama A, Benno Y, Nakase T. Phylogenetic and phenotypic evidence for the transfert of *Eubacterium aerofaciens* to the genus *Collinsella* as *Collinsella aerofaciens* gen. nov., comb, nov. *Int J Syst Bacteriol.* (1999), 49 : 557-65.
- (16) Wade WG, Downes J, Dymock D, Hiom SJ, Weightman AJ, Dewhirst FE, et al. The family *Coriobacteriaceae* : reclassification of *Eubacterium exiguum* (Poco et al 1996) and *Peptostreptococcus heliotrinireducens* (Lanigan 1976) as *Slackia exigua* gen. nov., comb. nov.

- and *Slackia heliotrinireducens* gen. nov., comb. nov., and *Eubacterium lentum* (Prevot 1938) as *Eggerthella lenta* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* (1999), 49 : 595-600.
- (17) Nakazawa F, Sato M, Poco SE, Hashimura T, Ikeda T, Kalfas S, et al. Description of *Mogibacterium pumilum* gen. nov., sp. nov., and *Mogibacterium vescum* gen. nov., sp. nov., and reclassification of *Eubacterium timidum* (Holdeman et al 1980) as *Mogibacterium timidum* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2000), 50 : 679-88.
- (18) Ezaki T, Kawamura Y, Li N, Li ZY, Zhao L, Shu S. Proposal of the genera *Aerococcus* gen. nov., *Peptoniphilus* gen. nov. and *Gallicola* gen. nov. for members of the genus *Peptostreptococcus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2001), 51 : 1521-8.
- (19) Murdoch DA, Shah HN. Reclassification of *Peptostreptococcus magnus* (Prevot 1933) (Holdeman and Moore 1972) as *Finegoldia magna* comb. Nov. and *Peptostreptococcus micros* (Prevot 1933) (Smith 1957) as *Micromonas micros* comb. Nov. *Anaerobe.* (1999), 5 : 555-9.
- (20) Moncla BJ, Hillier SL. *Peptostreptococcus, Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces* and other non-spore-forming anaerobic Gram-positive bacteria. In : Murray PR. *Manual of clinical Microbiology.* Washington, ASM Press. (2003), 857-78.
- (21) Duerden BI, Drasar BS. Anaerobes in Human disease. Arnold, London. (1991).
- (22) Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. Manuel de poche de Microbiologie médicale. Médecine-Sciences, Flammarion (2005).
- (23) Hentges DJ. The anaerobic microflora of the human body. *Clin Infect Dis.* (1993), 16 (suppl4) : S175-S180.
- (24) Grollier G, Le Moal G, Robert R. Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (*Clostridium difficile* et *Actinomyces* exclus). 8-030-A-10. Hôpital Jean Bernard, C.H.U. de Poitiers, France. (2005) Elsevier SAS, p. 1-3.
- (25) Edmiston CE, Krepel CJ, Seabrook GR, Jochimsen WG. Anaerobic infections in the surgical patient : microbial etiology and therapy. *Clin Infect Dis.* (2002), 35 (suppl1) : S112-S118.
- (26) Finegold SM, Baron EJ, Wexler HM. A clinical guide to anaerobic infections. Wadsworth Anaerobes laboratory. *Star publishing Co.*, Belmont, California, 1992.
- (27) Hillier SL, Krohn MA, Robe LR, Klebanoff SJ, Eschenbach DA. The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women. *Clin Inf Dis.* (1993), 16 : S273-S281.
- (28) Brook I. Microbiology of polymicrobial abscesses and implications for therapy. *J Antimicrob Chemother.* (2002), 50 : 805-810.
- (29) Gibson FC, Onderdonk AB, Kasper DL, Tzianabos AO. Cellular mechanism of intraabdominal abcess formation by *Bacteroides fragilis*. *J Immunol.* (1998), 160 : 5000-6.
- (30) Kasper DL, Onderdonk AB, Polk BF, Bartlett JG. Surface antigens as virulence factors in infection with *Bacteroides fragilis*. *Rev Infect Dis.* (1979), 1 : 278-90.
- (31) Myers LL, Firehammer BD, Shoop DS, Border MM. *Bacteroides fragilis* : a possible cause of acute diarrheal disease in new-born lambs. *Infect immune.* (1984), 44 : 241-4.
- (32) Sebald M. Determinants de la pathogénicité de *Bacteroides fragilis*. *Med Mal Infect.* (1996), 26 (suppl) : 182-91.
- (33) Sedallian A, Bland S. Epidémiologie et facteurs de risque. *Med Mal Infect.* (2000), 30 (suppl2) : 85-90.

- (34) Felten A, Desplaces N, Nizard R, Sedel L, Lagrange P. *Peptostreptococcus magnus* osteoarticular infections after orthopedic surgery ; 14 cases and pathogenesis factors. *Pathol Biol.* (1998), 46 : 442-8.
- (35) Krepel CJ, Gohr CM, Edmison CE, Farmer SG. Anaerobic pathogenesis : collagenase production by *Peptostreptococcus magnus* and its relationship to site of infection. *J Infect Dis.* (1991), 163 : 1148-50.
- (36) Pôle de Biologie médicale, Laboratoire de Bactériologie, C.H.U. de Poitiers. Recherche de bactéries anaérobies. *BACT-ANA-MO-033*, version n°01. Janvier 2010.
- (37) Summanen P, Baron EJ, Citron DM, Strong C, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth anaerobic bacteriology manual. Belmont, *Star Publishing Co.* (1993), 1-230.
- (38) Nadaud M. Utilisation du milieu au phényléthylalcool (PEA) pour l'isolement des bactéries anaérobies strictes. *Feuillets de Biologie.* (1982), 125 : 44-46.
- (39) Fiche technique du produit AnaeroGen™, distribuée par OXOID©.
- (40) Holdeman LV, Cato EP, Moore WE. Anaerobe Laboratory Manual, 4<sup>TH</sup> ed. (1977 et mises à jour de 1987, 1991 et 1994). *Virginia Polytechnic Institute and State University*, Blacksburg, VA, USA.
- (41) Legakis NJ et al. Direct quantitative determination of acidic end products in clinical specimens for presumptive diagnosis of anaerobic infections. *Ann Microbiol.* (Inst. Pasteur) (1982), 133B : 281-290.
- (42) Sebald M et al. Méthodes de laboratoire, Bactéries anaérobies et leur identification. *Inst. Pasteur.* (1994).
- (43) Holdeman LV, Cato EP, Moore WE. Anaerobe Laboratory Manual, 4<sup>TH</sup> ed. (1977 et mises à jour de 1987, 1991 et 1994). *Virginia Polytechnic Institute and State University*, Blacksburg, VA, USA. (1977), 1-52.
- (44) Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe.* (2005), 11, 1-2 : 79-91.
- (45) Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* (2004), 17 (4) : 840-862.
- (46) Sow AI, Fall MI, Boye CS, Gaye-Diallo A, Diop D, Cisse MF, MBoup S, Samb A. Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* isolées en situation pathogène au C.H.U. de Dakar : sécrétion de pénicillinase, résistance hétérogène. *Médecine d'Afrique Noire.* (1993), 40 (6).
- (47) Larousse médical, <http://www.larousse.fr/encyclopedia/medical/corynebacteries>.
- (48) *Corynebacterium*, <http://www.microbe-edu.org/etudiant/corynebacterium.html>.
- (49) Riegel P. Les corynébactéries, aspects bactériologiques et cliniques. *Annales de Biologie clinique.* (Mai-Juin 1998), volume 56, Numéro 3, 285-296, Mai-Juin 1998.
- (50) Yeruham I, Elad D, Van-Ham M, Shpigel NY, Pers S. *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in Israeli cattle : clinical and epidemiological studies. *Vet. Rec.* (1997), 140 : 423-427.
- (51) Bimet F, Riegel P, Patey O. Actualités sur les corynébactéries. *Bull. Soc. Fr., Microbiol.* (1995), 19-23.
- (52) Fosse T, Carles D, Laffont C, Lefebvre JC, Bocquet JP. Infections urinaires à *Corynebacterium* du groupe D2. Epidémie hospitalière et sensibilité aux antibiotiques, *Path. Biol.* (1998), 36 : 742-745.
- (53) Bulletin épidémiologique hebdomadaire n°23 (9 Juin 1988), <http://www.invs.sante.fr/beh/1998/9823/index.html>.

- (54) Taylor GB, Paviour SD, Musaad S, Jones WO, Holland DJ. A clinicopathological review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an association between corynebacteria infection and granulomatous mastitis. *Pathology*. (2003), 35(2) : 109-119.
- (55) Mathelin C, Riegel P, Chenard MP, Tomasetto C, Brettes JP. Granulomatous mastitis and corynebacteria : clinical and pathologic correlations. *Breast J*. (2005), 11(5) : 357.
- (56) Funke G, Pagano-Niederer M, Bernauer W. *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *J Clin Microbiol*. (1998), 36(12) : 3670-3673.
- (57) Peel MM, Palmer GG, Stacpoole AM, Kerr TG. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis* : report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis*. (1997), 24(2) : 185-191.
- (58) Coyle MB, Lipsky BA. Coryneform bacteria in infectious diseases : clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev*. (1990), 3(3) : 227-246.
- (59) Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C. Précis de bactériologie clinique. Ed. Eska, Paris. (2000), 993-1019.
- (60) Collins MD, Burton RA, Jones D. *Corynebacterium amycolatum* sp. Nov., a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol. Lett*. (1998), 49 : 349-352.
- (61) Guide d'informations sur les produits de VITEK® 2 Systems – *Informations produits ANC - 069046-2FR1*. pp. 1-19.
- (62) D'après <http://www.biomérieux-diagnostics>.
- (63) Carroll KC, Weinstein MP. Manual and automated systems for microbial identification of microorganisms. *Manual of clinical Microbiology*, Washington D.C., American Society for Microbiology Press. (2007).
- (64) Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9<sup>TH</sup> ed. (1994), Williams and Wilkins, Baltimore.
- (65) Jousimies-Somer H, Summanen P, Citron DM, Baron EJ, Wexler HM, Finegold SM. Wadsworth – KTL Anaerobic Bacteriology Manual, 6<sup>TH</sup> ed. (2002), *Star Publishing Co*. Belmont, California.
- (66) Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of clinical Microbiology*, 8<sup>TH</sup> ed. (2003), *American Society for Microbiology*, Washington D.C..
- (67) Rosco Diagnostica, <http://www.rosco.dk/>.
- (68) Brook I. Recovery of anaerobic bacteria from clinical specimens in 12 years at two military hospitals. *J. Clin. Microbiol*. (1998), 28 : 495-503.
- (69) Lassmann B, Gustafson DR, Wood CM, Rosenblatt JE. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin. Infect. Dis*. (2007), 44 : 895-900.
- (70) Glupczynski Y, Berhin C, Nizet H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. (2009), 28 : 261-267.
- (71) Nagy E, et al. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe : 20 years of experience. *Clin. Microbiol. Infect*. 17 : 371-379.
- (72) Cavallaro JJ, Wiggs LS, Miller JM. Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe identification system. *J. Clin. Microbiol*. (1997), 35 : 3186-3191.
- (73) Celig DM, Schreckenberger PC. Clinical evaluation of the Rapid-ANA II panel for identification of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol*. (1991), 29 : 457-462.
- (74) Downes J, King A, Hardie J, Philips I. Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clin. Microbiol. Infect*. (1999), 5 : 319-326.

- (75) Hanson CW, Cassorla R, Martin WJ. API and Minitek systems in identification of clinical isolates of anaerobic Gram-negative bacilli and *Clostridium* species. *J. Clin. Microbiol.* (1979), 10 : 14-18.
- (76) Marler LM et al. Evaluation of the new RapID-ANA II system for the identification of clinical anaerobic isolates. *J. Clin. Microbiol.* (1991), 29 : 457-462.
- (77) Schreckenberger PC, Celig DM, Janda WM. Clinical evaluation of the Vitek ANC card for identification of anaerobic bacteria. *J. Clin. Microbiol.* (1988), 26 : 255-230.
- (78) Summanen P, Jousimies-Somer H. Comparative evaluation of RapID ANA and API 20A for identification of anaerobic bacteria. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7 : 771-775.
- (79) Jeong H, Woon Lim Y, Yi H, Sekiguchi Y, Kamagata Y, Chun J. *Anaerosporebacter mobilis* gen. nov., sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* (2007), 57 : 1784-1787.
- (80) Carroll KC, Weinstein MP. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. Manual of Clinical Microbiology. Washington D.C., *American Society for Microbiology Press.* (2007).
- (81) Mory F, Alauzet C, Matuszewski C, Riegel P, Lozniewski A. Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of medically relevant anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* (2009), 47(6) : 1923-1926.
- (82) Lee EHL, Degener JE, Welling GW, Veloo ACM. Evaluation of the Vitek<sup>®</sup> 2 ANC Card for Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology.* (2011), 1745-1749.
- (83) Murray PR, Weber CJ, Niles AC. Comparative evaluation of three identification systems for anaerobes. *J Clin Microbiol.* (1985), 22(1) : 52-55.
- (84) Downes J, King A, Hardie J, Phillips J. Evaluation of the Rapid ID 32 A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. *Clin Microbiol infect.* (1999), 5(6) : 319-326.
- (85) Looney WJ, Gallusser AJ, Modde HK. Evaluation of the ATB 32 A system for identification of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* (1990), 28(7) : 1519-1524.
- (86) Gavin SE, Leonard RB, Briselden AM, Coyle MB. Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *J Clin Microbiol.* (1992), 30(7) : 1692-1695.
- (87) Funke G, Renaud FNR, Freney J, Riegel P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne Database 2.0. *J Clin Microbiol.* (1997), 35(12) : 3122-3126.

# ANNEXES

# Annexe 1 : Rapport VITEK® - *Corynebacterium jeikeium* (0904-080253)

CHU POTIERS  
Rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux : 05005      Imprimé 17 févr. 2011 09:49 CET  
 Référence du système :      Imprimé par : p3

Nom du patient : 0904-080253      id du 14/02      ID du patient :  
 Groupe d'isolats : 0902161101

Profil biochimique : 0300000000005  
 Germe sélectionné : *Corynebacterium jeikeium*

Coryn. jeikeium

---

**Informations sur l'identification**

Carte :	ANC	N° de lot :	244192110	Préemption :	18 mars 2012 12:00 CET
Terminée le :	14 févr. 2011 20:28 CET	État :	Final	Heure de l'analyse :	6,00 heures

**Germe sélectionné**

88% de probabilité  
 Profil biochimique : *Corynebacterium jeikeium*  
 Fiabilité : Faible discrimination

**Germe SRF**

03000000000005

**Germes identifiés et tests discriminants :**  
*Corynebacterium jeikeium* UREASE(10),  
*Corynebacterium urealyticum* UREASE(90),  
 Low Discrimination Organism

**Commentaire sur l'ident :**

**Tests à l'encontre**  
*Corynebacterium jeikeium* LeuA(99),ELLM(93),ProA(3),PVATE(89),  
*Corynebacterium urealyticum* URE(98),ProA(5),PVATE(99),

**Détails biochimiques**

4	dGAL	-	5	LeuA	-	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	-	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	-	20	dMNE	-	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
GRAM	+		MORPH	-		AERO	+										

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.02  
 Norme d'interprétation des CMI :  
 Nom du jeu de paramètres AES :  
 Politique d'interprétation thérapeutique :  
 Dernière modification du paramètre AES :  
 Page 1 / 1

# Annexe 2 : Rapport VITEK® - *Prevotella bivia* (ATCC-29303)

CHU POTIERS  
Rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux : 05005      Imprimé 4 mars 2011 16:19 CET  
 Référence du système :      Imprimé par : p4

Nom du patient : AVE en culture Pl 02103- (culture de 24h)      ID du patient :  
 Groupe d'isolats : 0303293033-1      ATCC

Profil biochimique : 0040001004100  
 Germe sélectionné : *Prevotella bivia*

---

**Informations sur l'identification**

Carte :	ANC	N° de lot :	244192110	Préemption :	18 mars 2012 12:00 CET
Terminée le :	3 mars 2011 17:18 CET	État :	Final	Heure de l'analyse :	6,25 heures

**Germe sélectionné**

99% de probabilité  
 Profil biochimique : *Prevotella bivia*  
 Fiabilité : Excellente identification

**Germe SRF**

0040001004100

**Germes identifiés et tests discriminants :**

**Commentaire sur l'ident :**

**Tests à l'encontre**

**Détails biochimiques**

4	dGAL	-	5	LeuA	-	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	-	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyrA	-	15	APPA	-	18	dGLU	-	20	dMNE	-	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
GRAM	-		MORPH	-		AERO	-										

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.02  
 Norme d'interprétation des CMI :  
 Nom du jeu de paramètres AES :  
 Politique d'interprétation thérapeutique :  
 Dernière modification du paramètre AES :  
 Page 1 / 1

### Annexe 3 : Rapport VITEK® - Arcanobacterium haemolyticum (0607-178601)

*b + - Ne l'avez pas vu.*  
*N.B. sur ANC, de cette souche il y a 5 ou 6 autres isolats.*

CHU POITIERS  
**Rapport du laboratoire**  
 Imprimé le 9 juin 2011 14:50 CEST  
 Imprimé par : p4

N° Client bioMérieux : 05005  
 Référence du système :  
 Nom du patient :  
 Groupe d'isolats : 607178601-1  
 ID du patient :  
 Profil biochimique : 2763100042001  
 Germe sélectionné : Arcanobacterium haemolyticum  
*Controle qualité, juin 2011 (10% de l'analyse)*

Carte : ANC  
 N° de lot : 244200410  
 Réception : 9 juin 2012 13:00 CEST  
 Terminée le : 8 juin 2011 23:10 CEST  
 État : Final  
 Heure de l'analyse : 6.25 heures  
 95% de probabilité  
 Profil biochimique : Arcanobacterium haemolyticum  
 Fiabilité : Très bonne identification

Informations sur l'identification

Germe sélectionné

Germe SRF

Germe identifiés et tests discriminants

Commentaire sur l'ident. :

Tests à l'encontre  
 Arcanobacterium haemolyticum  
 dRIB2(80),SAC(3).

Détails biochimiques

4	dGAL	-	5	LeuA	+	6	ELLM	-	7	PheA	+	8	ProA	+	10	PyrA	+
11	dCEL	-	13	TyA	+	15	APPA	+	18	dGLU	+	20	dMNE	+	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	(-)	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	+	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-		?							

*Sp. commun forme  
 présente en type ORC -  
 Cat. 2  
 Autre nom = Coryneb. haemolyticum (obscure pour Arc. de Longue)  
 (10 cat. 2)*

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.02  
 Norme d'interprétation des CMI :  
 Nom du jeu de paramètres AES :  
 Politique d'interprétation thérapeutique :  
 Dernière modification du paramètre AES :  
 Page 1 / 1

### Annexe 4 : Rapport VITEK® - Clostridium limosum (0812-231360)

CHU POITIERS  
**Rapport du laboratoire**  
 Imprimé le 17 févr. 2011 09:01 CET  
 Imprimé par : p3

N° Client bioMérieux : 05005  
 Référence du système :  
 Nom du patient :  
 Groupe d'isolats : 0812231360-3  
 ID du patient :  
 Profil biochimique : 4600000000001  
 Germe sélectionné : Clostridium sporogenes  
*Cl. Limosum dans le sac de Jean-Louis de VITEK*

Carte : ANC  
 N° de lot : 244192110  
 Réception : 18 mars 2012 12:00 CET  
 Terminée le : 15 févr. 2011 22:15 CET  
 État : Final  
 Heure de l'analyse : 6.00 heures  
 99% de probabilité  
 Profil biochimique : Clostridium sporogenes  
 Fiabilité : Excellente identification

Informations sur l'identification

Germe sélectionné

Germe SRF

Germe identifiés et tests discriminants

Commentaire sur l'ident. :

Tests à l'encontre

Détails biochimiques

4	dGAL	-	5	LeuA	-	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	+	10	PyrA	+
11	dCEL	-	13	TyA	-	15	APPA	-	18	dGLU	-	20	dMNE	-	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	-	57	AIFUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

*Sporogenes = 2 tests +  
 ProA  
 PyrA*

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.02  
 Norme d'interprétation des CMI :  
 Nom du jeu de paramètres AES :  
 Politique d'interprétation thérapeutique :  
 Dernière modification du paramètre AES :  
 Page 1 / 1

Rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux : 05005  
 Imprimé le 15 févr. 2011 09:03 CET  
 Référence du système :  
 Imprimé par : p1

ID du patient :

id de 14/02

Nom du patient :

Profil biochimique : 0600000000001

Germes sélectionnés : Clostridium sporogenes

89 - Clostridium  
 → p. dans B base  
 de VITEK

Commentaires :

<b>Informations sur l'identification</b>	Carte : ANC	N° de lot : 244192110	Préemption : 18 mars 2012 12:00 CET
	Terminée le : 14 févr. 2011 20:29 CET	État : Final	Heure de l'analyse : 6:00 heures
<b>Germes sélectionnés</b>	99% de probabilité Profil biochimique : Clostridium sporogenes		
<b>Germes SRF</b>	Profil biochimique : 0600000000001		
<b>Germes identifiés et tests discriminants :</b>			
Fiabilité : Excellente identification			
<b>Commentaire sur l'ident. :</b>			
<b>Tests à l'encontre</b>			

Détails biochimiques

4 dGAL -	5 LeuA -	6 ELLM -	7 PheA -	8 ProA -	10 PyrA -
11 dCEL -	13 TyrA -	15 APPA -	18 dGLU -	20 dMNE -	22 dMAL -
28 SAC -	30 ARB -	33 NAG -	34 BGLU -	36 URE -	37 BGURI -
39 BGALI -	41 AARA -	42 AGALI -	43 BMAN -	44 ARG -	45 PIVATE -
51 IMTE -	53 ESC -	54 BbFUC -	55 BNAGI -	56 AMANI -	57 AIFUC -
59 PHOS -	60 IARA -	61 gRIB2 -	62 OPS -	63 AARAF -	64 dXYL -
GRAM +	MORPH +	AERO -			

89 - Clostridium  
 → p. dans B base  
 de VITEK

Annexe 5 : Rapport VITEK® - Veillonella spp. (1003-161618)

Rapport du laboratoire

N° Client bioMérieux : 05005  
 Imprimé le 27 avr. 2011 20:27 CEST  
 Référence du système :  
 Imprimé par : p3

ID du patient :

Nom du patient :

Profil biochimique : 1003161618-1

Germes sélectionnés : Veillonella spp

62 - Veillonella spp

Commentaires :

<b>Informations sur l'identification</b>	Carte : ANC	N° de lot : 244200410	Préemption : 9 juin 2012 13:00 CEST
	Terminée le : 27 avr. 2011 01:57 CEST	État : Final	Heure de l'analyse : 6:25 heures
<b>Germes sélectionnés</b>	99% de probabilité Profil biochimique : Veillonella spp		
<b>Germes SRF</b>	Profil biochimique : 0000000000002		
<b>Germes identifiés et tests discriminants :</b>			
Fiabilité : Excellente identification			
<b>Commentaire sur l'ident. :</b>			
Germes avec profil peu réactif - Vérifier la viabilité.			
<b>Tests à l'encontre</b>			

Détails biochimiques

4 dGAL -	5 LeuA -	6 ELLM -	7 PheA -	8 ProA -	10 PyrA -
11 dCEL -	13 TyrA -	15 APPA -	18 dGLU -	20 dMNE -	22 dMAL -
28 SAC -	30 ARB -	33 NAG -	34 BGLU -	36 URE -	37 BGURI -
39 BGALI -	41 AARA -	42 AGALI -	43 BMAN -	44 ARG -	45 PIVATE -
51 IMTE -	53 ESC -	54 BbFUC -	55 BNAGI -	56 AMANI -	57 AIFUC -
59 PHOS -	60 IARA -	61 gRIB2 -	62 OPS -	63 AARAF -	64 dXYL -
GRAM +	MORPH +	AERO -			



CHU POITIERS  
 Rapport du laboratoire  
 N° Client biomérieux : 05005  
 Référence du système :  
 Nom du patient : M/02  
 Groupe d'isolats : 100720048401-1  
 Profil biochimique : 0200000000001  
 Germe sélectionné : Low Discrimination  
 Imprimé 15 févr. 2011 15:13 CET  
 Imprimé par : P7  
 ID du patient :  
*Actin myoflavin*

Commentaires :

Informations sur l'identification	Carte : ANC	N° de lot : 244192110	Préemption : 18 mars 2012 12:00 CET
Germe sélectionné	Terminée le : 14 févr. 2011 20:42 CET	État : Final	Heure de l'analyse : 6.25 heures
Germe SRF	Profil biochimique : 0200000000001	Low Discrimination	
Fiabilité :		Faible discrimination	

Germe SRF  
 Germes identifiés et tests discriminants :  
 IND(100),LIP(0),  
 Clostridium bifementians  
 Clostridium difficile  
 Clostridium sporogenes  
 IND(0),LIP(100),  
 Low Discrimination Organism  
 Commentaire sur l'ident. :  
 Tests à l'encontre :  
*Je n'ai pas fait tout les tests*

4	dGAL	-	5	LeuA	-	6	ELLM	-	7	PheA	-	8	ProA	-	10	PyrA	-
11	dCEL	-	13	TyRA	-	15	APPA	-	18	dGLU	-	20	dMANE	-	22	dMAL	-
28	SAC	-	30	ARB	-	33	NAG	-	34	BGLUI	-	36	URE	-	37	BGURI	-
39	BGALI	-	41	AARA	-	42	AGALI	-	43	BMAN	-	44	ARG	-	45	PIVATE	-
51	MTE	-	53	ESC	-	54	BdFUC	-	55	BNAGI	-	56	AMANI	-	57	AI FUC	-
59	PHOS	-	60	IARA	-	61	dRIB2	-	62	OPS	-	63	AARAF	-	64	dXYL	-
	GRAM	+		MORPH	-		AERO	-									

Version de VITEK 2 Systems installée : 04.02  
 Norme d'interprétation des CMI :  
 Nom du jeu de paramètres AES :  
 Politique d'interprétation thérapeutique :  
 Dernière modification du paramètre AES :  
 Page 1 / 1

Annexe 8 : Rapport Seqscape® - *Bacteroides thetaiotaomicron* (1012-101408)





# SERMENT DE GALIEN

En présence de mes maîtres et de mes condisciples, **je jure** :

**D'honorer** ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

**D'exercer**, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

**De ne jamais oublier** ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**En aucun cas**, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

**Que les hommes m'accordent** leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé** de mes confrères si je manque à mes engagements.

# RESUME

Les bactéries anaérobies et les corynébactéries font partie, chez l'homme et les animaux, de la flore endogène présente naturellement au niveau de la peau et des muqueuses. Dans des contextes particuliers, ces bactéries peuvent devenir des pathogènes opportunistes dont la morbidité et la mortalité peuvent être élevées.

L'incapacité des bactéries anaérobies à cultiver en présence d'oxygène rend leur isolement complexe. Les corynébactéries, quant à elles, sont rarement impliquées dans des processus pathogènes et sont donc peu recherchées.

Les méthodes d'identification phénotypiques classiques de ces bactéries s'avèrent souvent fastidieuses, coûteuses et consommatrices de temps.

Les automates, communs pour l'identification rapide et automatisée des bactéries aérobies, sont peu nombreux pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries.

La société bioMérieux a développé et introduit sur le marché en 2008 une carte d'identification colorimétrique, la carte ANC couplée au système VITEK<sup>®</sup> 2, destinée à permettre une identification rapide et automatisée de 63 taxons de bactéries anaérobies et corynébactéries pouvant être rencontrées en pathologie humaine.

Notre étude, réalisée au Laboratoire de Bactériologie du C.H.U. de Poitiers entre Janvier 2011 et Septembre 2012, s'intéresse aux performances de ce système. Les travaux ont porté sur 66 souches cliniques (55 souches de bactéries anaérobies et 11 souches de corynébactéries) incluses dans la base de données de la carte VITEK<sup>®</sup> 2 ANC.

Le but de cette étude a été de mesurer l'intérêt et l'efficacité de ce système en routine dans un laboratoire de bactériologie médicale.

Les résultats ont montré que la carte ANC est performante pour identifier les bactéries anaérobies et corynébactéries susceptibles d'être rencontrées en pathologie humaine et présente comme principaux avantages une obtention rapide du résultat ainsi que l'automatisation quasi-complète du processus d'identification.

Les limites de la carte ANC ont également pu être observées, spécialement si le germe recherché est absent de la base de données du système (l'utilisateur n'est pas alerté et peut même être induit en erreur) et si l'on doit avoir recours à des tests additionnels qui allongent le délai d'obtention du résultat d'identification.

**Mots clés :** bactéries anaérobies, corynébactéries, VITEK<sup>®</sup> 2 ANC, bioMérieux, laboratoire de microbiologie, bactériologie, infectiologie, identification