



HAL
open science

Evaluation de la carte Vitek® 2 ANC pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries d'intérêt médical

Céline Matuszewski

► **To cite this version:**

Céline Matuszewski. Evaluation de la carte Vitek® 2 ANC pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries d'intérêt médical. Sciences pharmaceutiques. 2009. hal-01738876

HAL Id: hal-01738876

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01738876>

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I
2009

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional
le 30 septembre 2009

par Céline MATUSZEWSKI
née le 29/03/1981 à Saint-Avold

Conformément aux dispositions de l'arrêté
du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

**Evaluation de la carte Vitek[®] 2 ANC pour
l'identification des bactéries anaérobies et des
corynébactéries d'intérêt médical**

Président : M. C. GANTZER Professeur

Juges : M. A. LOZNIEWSKI Professeur
 Mme F. MORY Maître de Conférences
 M. P. RIEGEL Maître de Conférences

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales

Janine SCHWARTZBROD

Responsable de la Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la Commission Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH :

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Marie-Catherine BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU.....	Biochimie clinique
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR.....	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD.....	Pharmacologie
Pierre LEROY.....	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT.....	Pharmacie galénique
Alain MARSURA.....	Chimie thérapeutique
Patrick MENU.....	Physiologie et physiopathologie humaine
Jean-Louis MERLIN.....	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS.....	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS.....	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN.....	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON.....	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON.....	Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT.....	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS.....	Parasitologie
Mariette BEAUD.....	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT.....	Communication et Santé
Michel BOISBRUN.....	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX.....	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX.....	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA.....	Physiologie
Gérald CATAU.....	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN.....	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT.....	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB.....	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON.....	Biochimie
Sébastien DADE.....	Bio-informatique
Dominique DECOLIN.....	Chimie analytique
Béatrice DEMORE.....	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU.....	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY.....	Chimie thérapeutique
François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie

Adel FAIZ.....	Biophysique-accoustique
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Maxime MOURER.....	Pharmacochimie supramoléculaire
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Noëlle VAULTIER.....	Biodiversité végétale et fongique
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER..... Sémiologie

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD..... Anglais

ASSISTANT

Annie PAVIS..... Bactériologie

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITE (SCD)

Anne-Pascale PARRET..... Directeur

Jeannine GOLEC..... Responsable de la section Pharmacie-Odontologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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 et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; 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 j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI
IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Christophe GANTZER

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Je vous en suis profondément reconnaissante. Je vous remercie également pour l'enseignement que vous nous avez dispensé lors des séances de travaux pratiques à la faculté, dont je garde un très bon souvenir.

A NOS JUGES

Madame le Docteur Francine MORY

Je vous remercie infiniment pour votre disponibilité et votre gentillesse. Vous m'avez suivie tout au long de ce travail, et, grâce à votre énergie et votre bonne humeur, avez instauré une ambiance très agréable. A mon sens, je n'aurais pu trouver meilleure directrice de thèse. Nos rendez-vous réguliers vont me manquer...

Monsieur le Professeur Alain LOZNIIEWSKI

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Je vous remercie de vos conseils et vous exprime ma profonde gratitude. Votre savoir et votre réflexion m'ont beaucoup appris.

Monsieur le Docteur Philippe RIEGEL

Je suis très honorée de vous compter parmi mes juges. Vos remarques ont été très constructives. Qu'il me soit possible d'exprimer ici ma gratitude et mon profond respect.

A toutes les personnes qui m'ont aidées à réaliser ce travail :

Aux techniciens du secteur des Anaérobies : **Monique CHAON, Céline GUICHOU, Laurence GENET, Sophie CONTANT, Catherine LEHER** et **Jean-Pierre ROUILLEAUX**, merci pour votre investissement et votre sympathie.

Au **Docteur Corentine ALAUZET** et aux techniciennes du secteur de Biologie Moléculaire : **Isabelle SCHOLTUS** et **Elise PERNOT**. Je ne saurais vous dire combien votre aide m'a été précieuse, concernant un domaine tel que la biologie moléculaire qui ne m'était pas familier. Merci pour votre gentillesse.

A ma mère,

Merci pour ton soutien, ta confiance et l'amour que tu nous portes. C'est grâce à toi que je suis arrivée là, car tu as toujours su orienter notre éducation vers la connaissance et le savoir. N'oublie jamais que je t'aime très fort.

A mon père,

Disparu trop tôt, tu n'as pu me voir grandir, mais tu restes toujours dans mon coeur. J'espère que là où tu es, tu es fier de moi.

A ma soeur Laurène,

J'admire ta profondeur et ton intelligence et je suis fière d'avoir une soeur comme toi. Sache que tu tiens une grande place dans mon coeur et que je t'aime très fort.

Aux autres membres de ma famille,

Merci pour les bons moments passés ensemble et pour tous ceux à venir. Je vous embrasse.

A Audrey C.

Ma meilleure amie, tes qualités sont rares et précieuses. Pendant toutes ces années, j'ai pu compter sur toi. Je t'en remercie, et je compte encore partager de nombreux moments avec toi et ta famille.

A ma petite bande de la fac, Aude, Sébastien G., Mélanie, Sébastien T., Sébastien S. Virginie, la grande Céline,

Merci pour ces bons moments vécus sur les bancs de la fac. Je n'oublierai jamais les fous rires, les soirées, les moments de stress avant les examens (n'est-ce pas Aude), les petits mots sur les feuilles de cours (n'est-ce pas Seb), les surnoms un peu loufoques, les pincés monseigneur et les badauds, fortuitement... J'espère que ces dix ans ne seront qu'un début et que l'on vivra encore beaucoup de moments ensemble.

A tous mes amis

A Fabien

A tes côtés l'on ne peut que s'enrichir, en termes intellectuel, culturel, et surtout en qualités de coeur. Tu es une personne vraiment unique et très charismatique. Merci pour ces belles années passées en ta compagnie et qui m'ont grandie.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES FIGURES.....	13
INTRODUCTION.....	15
BACTERIES ANAEROBIES, CORYNEBACTERIES : IDENTIFICATION DES PRINCIPALES ESPECES IMPLIQUEES EN PATHOLOGIE HUMAINE	17
1. GENERALITES SUR LES BACTERIES ANAEROBIES ET LES CORYNEBACTERIES.....	18
1.1. Les bactéries anaérobies.....	18
1.1.1. Définition	18
1.1.2. Habitat	18
1.1.3. Pouvoir pathogène.....	19
1.1.4. Quand faut-il rechercher les bactéries anaérobies ?.....	19
1.1.5. Pourquoi identifier les bactéries anaérobies ?.....	21
1.1.6. Faut-il identifier les bactéries anaérobies au niveau de l'espèce ou une identification au niveau du genre ou du groupe est-elle suffisante ?	21
1.1.7. Comment identifier les bactéries anaérobies ?.....	22
1.2. Les corynébactéries	23
1.2.1. Définition	23
1.2.2. Habitat	23
1.2.3. Pouvoir pathogène.....	24
1.2.4. Quand identifier les corynébactéries ?	24
1.2.5. Comment identifier les corynébactéries ?.....	26
2. PRINCIPES DE L'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DES BACTERIES ANAEROBIES ET DES CORYNEBACTERIES PAR LES SYSTEMES COMMERCIALISES	27
2.1. Les étapes de l'identification biochimique bactérienne par les systèmes commercialisés.....	29
2.1.1. La préparation de l'inoculum bactérien	29
2.1.2. La distribution de l'inoculum.....	30
2.1.3. L'incubation	30
2.1.4. La lecture et l'interprétation des résultats	30
2.2. La base de données.....	30
2.3. Evaluation d'un système d'identification bactérienne	31
2.4. Les systèmes d'identification biochimique des bactéries anaérobies	32
2.4.1. Systèmes nécessitant une croissance bactérienne	32
2.4.1.1. API 20 A [®] (bioMérieux)	32

2.4.1.2.	Biolog AN Microplate® (Biolog)	34
2.4.2.	Systèmes explorant le profil enzymatique (dits « rapides »)	35
2.4.2.1.	Rapid ID 32 A® (bioMérieux).....	35
2.4.2.2.	RapID ANA II® (Remel).....	37
2.4.2.3.	BD Crystal® ANR ID (Becton Dickinson).....	38
2.4.2.4.	MicroScan Rapid Anaerobe® (Siemens)	39
2.4.2.5.	API ZYM® (bioMérieux)	41
2.4.2.6.	Carte Vitek® 2 ANC (bioMérieux)	42
2.5.	Systèmes d'identification biochimique des corynébactéries.....	45
2.5.1.	Systèmes nécessitant une croissance bactérienne	45
2.5.1.1.	API Coryne® (bioMérieux)	45
2.5.1.2.	BD Crystal® GP (Becton Dickinson)	45
2.5.1.3.	Biolog® GP2 Microplate (Biolog)	46
2.5.2.	Systèmes explorant le profil enzymatique (« dits rapides »)	46
2.5.2.1.	RapID CB Plus® (Remel).....	46
2.5.2.2.	BD Crystal® RGP (Becton Dickinson)	47
2.5.2.3.	Phoenix PID® (Becton Dickinson).....	47
2.5.2.4.	Carte Vitek® 2 ANC.....	48
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....		51
1.	OBJECTIFS	52
2.	MATERIEL ET METHODES	52
2.1.	Souches étudiées	52
2.2.	Identification phénotypique.....	55
2.2.1.	Bactéries anaérobies	55
2.2.2.	Corynébactéries	56
2.3.	Identification au moyen de la carte Vitek® 2 ANC.....	56
2.4.	Identification bactérienne par séquençage de l'ADN	57
2.4.1.	Principe du séquençage	57
2.4.2.	Méthode de séquençage utilisée.....	61
3.	RESULTATS	64
4.	DISCUSSION	74
CONCLUSION.....		88
BIBLIOGRAPHIE		90
ANNEXES		100

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Différentes infections dans lesquelles les bactéries anaérobies sont impliquées.....	20
Tableau II. Principales espèces de corynébactéries dont le pouvoir pathogène est reconnu chez l'homme	25
Tableau III. Systèmes d'identification commercialisés disponibles en 2009 pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries	28
Tableau IV. Niveaux de confiance pouvant être associés à un résultat d'identification avec la carte Vitek® 2 ANC.....	44
Tableau V. Caractéristiques des systèmes commercialisés d'identification biochimique des bactéries anaérobies.....	49
Tableau VI. Caractéristiques des systèmes commercialisés d'identification biochimique des corynébactéries.....	50
Tableau VII. Distribution des souches cliniques de bactéries anaérobies selon l'origine des prélèvements.....	52
Tableau VIII. Couples d'amorces utilisées pour les PCR d'amplification du gène codant l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i>	62
Tableau IX. Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les PCR d'amplification du gène codant l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i>	62
Tableau X. Programmations du thermocycleur utilisées pour les PCR d'amplification du gène codant l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i>	62
Tableau XI. Couples d'amorces utilisées pour les PCR de séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i>	63
Tableau XII. Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les PCR de séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i>	63
Tableau XIII. Programmations du thermocycleur utilisées pour les PCR de séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène <i>rpoB</i>	64
Tableau XIV. Identification des 261 souches cliniques de bactéries anaérobies avec la carte Vitek® 2 ANC	67
Tableau XV. Identification des 54 souches cliniques de corynébactéries avec la carte Vitek® 2 ANC	69
Tableau XVI : Performances de la carte Vitek® 2 ANC.....	70

Tableau XVII: Souches identifiées avec une faible discrimination par le système Vitek [®] 2 ANC	71
Tableau XVIII. Souches incorrectement identifiées par le système Vitek 2 [®] ANC	72
Tableau XIX. Identification des souches appartenant à des espèces non revendiquées par la base de données de la carte Vitek [®] 2 ANC	73

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Corynébactéries, coloration de Gram	23
Figure 2 : API 20 A [®]	33
Figure 3 : API 20 A [®] : test de l'hydrolyse de l'esculine négatif (fluorescence sous UV)	33
Figure 4 : Plaque d'identification du système Biolog [®]	34
Figure 5 : Système MicroStation ID [®]	35
Figure 6 : Rapid ID 32A [®]	36
Figure 7 : Semi-automate ATB-Expression [®]	36
Figure 8 : Semi-automate mini API [®]	36
Figure 9 : RapID ANA II [®]	37
Figure 10 : Lecteur BD Crystal [®]	38
Figure 11 : Visionneuse BD Crystal [®]	38
Figure 12 : Système d'inoculation Prompt [®]	39
Figure 13 : MicroScan : système d'inoculation RENOK [®]	39
Figure 14 : Automate Microscan WalkAway [®]	40
Figure 15 : Semi-automate AutoScan-4 [®]	40
Figure 16 : Galerie API ZYM [®]	41
Figure 17 : Echelle de lecture aidant à l'interprétation de la galerie API ZYM [®]	41
Figure 18 : Schéma d'une carte du système Vitek [®]	42
Figure 19 : Automate Vitek [®] 2	43
Figure 20 : Vitek [®] 2 Compact	43
Figure 21 : Chargement d'une cassette dans le Vitek [®] 2	43
Figure 22 : Station Compacte Satellite [®]	43
Figure 23 : Automate OmniLog [®]	46

Figure 24 : RapID CB Plus®	47
Figure 25 : Automate Phoenix®	48
Figure 26 : Schéma général de l'expérience	54
Figure 27 : Souche productrice de lécithinase après culture sur gélose enrichie au jaune d'oeuf	55
Figure 28 : Etapes du séquençage de l'ADN bactérien.....	60
Figure 29 : Photographie d'un gel d'agarose où ont migré les fragments amplifiés du gène <i>rpoB</i> de neuf souches	61
Figure 30 : <i>Fusobacterium nucleatum</i> . Coloration de Gram	76
Figure 31 : Colonies de <i>P. melaninogenica</i> sur gélose au sang	77
Figure 32 : Coloration de Gram de <i>C. ramosum</i>	78
Figure 33 : Colonies de <i>C. difficile</i> sur gélose au sang	80
Figure 34 : Colonies de <i>C. difficile</i> sur milieu CCFA au jaune d'oeuf.....	80
Figure 35 : Coloration de Gram de <i>Capnocytophaga</i> sp.....	81
Figure 36 : Coloration de Gram de <i>Leptotrichia</i> sp.	81
Figure 37 : Colonies de <i>Porphyromonas</i> sp. et <i>Prevotella</i> sp. pigmentées.....	82
Figure 38 : Colonies de <i>C. renale</i> sur gélose au sang	84
Figure 39 : Colonies de <i>C. auricomucosum</i> sur gélose au sang après 96 heures d'incubation.....	84
Figure 40 : Coloration de Gram de <i>Listeria monocytogenes</i>	85
Figure 41 : Coloration de Gram d' <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	85

INTRODUCTION

L'identification de nombreuses espèces bactériennes est aujourd'hui possible grâce à des automates performants dont la fréquence d'utilisation augmente dans les laboratoires de biologie médicale. Ces automates sont capables de réaliser l'identification rapide (et pour la plupart d'entre eux l'antibiogramme) d'une grande partie des bactéries aérobies isolées en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Cependant, rares sont les automates qui permettent l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries.

Il est pourtant bien établi que les bactéries anaérobies peuvent être impliquées dans de nombreuses infections dont certaines peuvent être sévères comme les bactériémies, les infections nécrosantes de la peau et des tissus mous et les infections suppuratives profondes. Comme les bactéries anaérobies, les corynébactéries autres que *Corynebacterium diphtheriae*, se comportent le plus souvent comme des pathogènes opportunistes. Ces bactéries peuvent néanmoins causer des infections sévères voire fatales, en particulier chez les personnes immunodéprimées.

Les méthodes d'identification phénotypiques conventionnelles des bactéries anaérobies et des corynébactéries sont souvent fastidieuses, coûteuses et consommatrices de temps. Les méthodes de biologie moléculaire, comme le séquençage du gène codant l'ARNr 16S ou de gènes domestiques (gène *rpoB* par exemple), permettent une identification fiable et rapide des bactéries anaérobies et des corynébactéries, mais elles ne sont pas utilisées en pratique courante et sont encore réservées à des laboratoires spécialisés.

La société bioMérieux[®] a récemment développé une nouvelle carte d'identification colorimétrique, la carte Vitek[®] 2 ANC, destinée à identifier 63 taxons de bactéries anaérobies et corynébactéries pouvant être rencontrées dans les laboratoires de biologie médicale. L'objet de la présente étude a été d'évaluer les performances de cette carte dans le but d'une utilisation en routine dans un laboratoire de bactériologie médicale.

**BACTERIES ANAEROBIES,
CORYNEBACTERIES :
IDENTIFICATION DES
PRINCIPALES ESPECES
IMPLIQUEES EN PATHOLOGIE
HUMAINE**

1. GENERALITES SUR LES BACTERIES ANAEROBIES ET LES CORYNEBACTERIES

1.1. Les bactéries anaérobies

1.1.1. Définition

Les bactéries anaérobies sont des bactéries incapables de se développer au contact de l'oxygène présent à la pression atmosphérique car il est toxique pour elles. Ces bactéries, qualifiées d'anoxybiontiques, produisent leur énergie (respiration, fermentation) et effectuent leurs biosynthèses sans avoir recours à l'oxygène moléculaire.

La tolérance vis-à-vis de l'oxygène est cependant variable selon les espèces. On distingue les espèces (1) :

- **extrêmement sensibles à l'oxygène** qui ne survivent que quelques secondes après une exposition à l'atmosphère ambiante (ex : *Treponema* spp.)
- **anaérobies strictes** incapables de se développer à une concentration d'oxygène supérieure à 0,5 % et après une exposition à l'air de 60 minutes (ex : *Fusobacterium nucleatum*)
- **anaérobies modérées** capables de survivre à une exposition de 80 minutes à l'air, mais incapables de s'y multiplier (ex : *Bacteroides* du groupe *fragilis*)
- **aérotolérantes** (ex : *Clostridium tertium*, *Propionibacterium acnes*).

1.1.2. Habitat

Les bactéries anaérobies font partie :

- de la flore **endogène** de l'homme et des animaux, présente au niveau de la peau et des muqueuses, où elles se trouvent en situation commensale, voire exercent un effet bénéfique pour leur hôte (ex : effet de barrière en s'opposant à l'implantation de bactéries pathogènes au niveau intestinal).
- de la flore **exogène** : il s'agit en particulier des bactéries appartenant au genre *Clostridium*, que l'on trouve dans l'environnement sous forme sporulée. Certaines espèces de clostridia peuvent néanmoins être présentes dans l'intestin des hommes et des animaux (ex : *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*)

1.1.3. Pouvoir pathogène

Dans certaines circonstances impliquant une diminution du potentiel d'oxydo-réduction des tissus (ischémie, diabète, présence de corps étrangers, acte chirurgical, traumatisme, ...) les **bactéries de la flore endogène** peuvent coloniser des sites normalement stériles situés à proximité des muqueuses et engendrer des infections putrides voire des bactériémies avec possibilité de métastases. Ces bactéries commensales se comportent alors comme des bactéries pathogènes opportunistes. La fréquence de ces infections est plus importante chez les patients dont le terrain est fragilisé par une immunodépression ou la présence d'une néoplasie (2, 3-8).

Les **bactéries anaérobies de l'environnement** peuvent également infecter l'homme, par l'intermédiaire d'une blessure par exemple (*Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*...).

Les principaux types d'infections dans lesquelles les bactéries anaérobies sont impliquées figurent dans le tableau I.

1.1.4. Quand faut-il rechercher les bactéries anaérobies ?

La recherche systématique de ces bactéries dans les hémocultures est encore débattue (9) en raison, pour certains auteurs, de la faible fréquence des bactériémies à bactéries anaérobies (2 à 4 % des hémocultures positives) (10-13). Cependant, pour d'autres auteurs, la fréquence de ces bactériémies est en augmentation. En effet, d'après l'étude de Lassman et coll. (14), cette fréquence est passée de 5,4 % en 1993 à 10,4 % en 2004.

Cette fréquence peut être sous-estimée en raison des contraintes microbiologiques de l'isolement des bactéries anaérobies (15). Par ailleurs, le fait que ces bactériémies soient associées à un taux de mortalité élevé [13 % (2), 38 % (12), 34 % (16), 44 % (17) et 55 % en l'absence de traitement efficace (18)] justifie cette recherche.

Les bactéries anaérobies doivent être recherchées dans les suppurations fermées, mais aussi dans les suppurations superficielles consécutives à des morsures, des injections ou des traumatismes.

Cette recherche doit être systématique dans les situations suivantes :

- présence de gaz dans les tissus,
- odeur fétide de l'échantillon,
- présence de grains au sein du prélèvement
- lorsque l'examen microscopique est évocateur de la présence de bactéries anaérobies (*Fusobacterium* spp., *Clostridium* spp. par exemple) (19).

La recherche des bactéries anaérobies ne doit pas être effectuée à partir des prélèvements provenant des sites normalement colonisés par une flore en partie anaérobie [prélèvements oraux ou nasopharyngés, expectorations et autres prélèvements respiratoires non protégés, prélèvements vaginaux, urines recueillies par voie naturelle, effluents digestifs et selles sauf contexte particulier (suspicion d'infection à *C. difficile* et de toxi-infection alimentaire à *C. perfringens*)] (19).

Tableau I. Différentes infections dans lesquelles les bactéries anaérobies sont impliquées
[d'après (19)]

Infections	Genres bactériens les plus fréquemment impliqués
Oculaires Cellulites orbitaires, endophtalmies, kératites Canaliculites	CGPA, <i>Clostridium</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp. <i>Actinomyces</i> spp., <i>Propionibacterium</i> spp.
Dentaires et parodontales Infections endodontiques et péri-apicales, parodontopathies	<i>Porphyromonas</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Campylobacter</i> spp., <i>Treponema</i> spp., <i>Eubacterium</i> spp.
De la sphère ORL Angine ulcéronécrotique de Vincent*, syndrome de Lemierre**, phlegmons, angines récurrentes Sinusites chroniques, sinusites aiguës d'origine dentaire, sinusites nosocomiales (intubation nasotrachéale, sonde nasogastrique) Otites moyennes chroniques	<i>Fusobacterium</i> spp. (<i>F. nucleatum</i> *, <i>F. necrophorum</i> **), <i>Prevotella</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp. <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., CGPA <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Porphyromonas</i> spp., CGPA, <i>Propionibacterium acnes</i>
Abcès cérébraux-empyèmes	<i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., CGPA, <i>Bacteroides</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>P. acnes</i>
Pleuropulmonaires	<i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp. (<i>F. nucleatum</i>), CGPA, <i>Actinomyces</i> spp.
Ostéo-articulaires	CGPA, <i>Propionibacterium</i> spp., <i>Clostridium</i> spp., <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> , <i>Actinomyces</i> spp.
De la peau et des tissus mous Dermohypodermite avec fasciite nécrosante polymicrobienne Dermohypodermite avec fasciite nécrosante monomicrobienne Myonécroses	<i>Clostridium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., CGPA <i>Clostridium</i> spp. (<i>C. perfringens</i>) <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., CGPA
Intra-abdominales et digestives Péritonites, appendicites, abcès hépatiques, infections des voies biliaires, abcès sous- phréniques, abcès pararectaux	<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Eggerthella lenta</i> , CGPA, <i>Prevotella</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Bilophila wadsworthia</i>
Endométrites-salpingites	<i>Prevotella</i> spp., CGPA, <i>Porphyromonas</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp.
Sur dispositif intra-utérin	<i>Actinomyces</i> spp., <i>Eubacterium nodatum</i>
Bactériémies	<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i> , <i>Clostridium</i> spp., CGPA, <i>Fusobacterium</i> spp., BGPANS

CGPA : cocci à Gram positif anaérobies

BGPANS : bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés

1.1.5. Pourquoi identifier les bactéries anaérobies ?

Cette question se pose car le rôle pathogène de ces bactéries dans les infections mixtes est difficile à préciser. De plus, les analyses sont délicates, coûteuses et le délai de réponse peut être long (20-22).

Cependant, l'identification des bactéries anaérobies paraît utile pour les raisons suivantes :

- la présence de facteurs de pathogénicité a été mise en évidence chez certaines espèces (*Fusobacterium necrophorum*, *Bacteroides* du groupe *fragilis*, *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. et *Clostridium* toxinogènes...),
- les bactéries anaérobies sont significativement associées à des infections dont la morbidité et la mortalité sont significatives (23),
- l'identification des bactéries anaérobies permet de prédire voire de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques et d'adapter au mieux l'antibiothérapie car il a été montré que les taux de morbidité et de mortalité observés chez les patients atteints de bactériémies à bactéries anaérobies étaient significativement plus élevés lorsque le traitement était inadapté (11, 18, 23, 24)
- l'optimisation des techniques d'identification de ces bactéries a permis d'apporter un bénéfice en terme de coût mais aussi de durée de séjour hospitalier et de mortalité (25, 26).

1.1.6. Faut-il identifier les bactéries anaérobies au niveau de l'espèce ou une identification au niveau du genre ou du groupe est-elle suffisante ?

Cela dépend du site de l'infection et de l'espèce en cause :

- L'identification au niveau de l'espèce est indiquée pour toutes les souches isolées de sites normalement stériles et de sites d'infections sévères (infections du système nerveux central, oculaires, pleuropulmonaires, abcès hépatiques, infections sévères des tissus mous telles que les myonécroses, infections ostéoarticulaires...), surtout si le traitement de ces infections est plutôt médical que chirurgical. Des identifications limitées au groupe ou au genre peuvent suffire dans d'autres situations (infections de la tête et du cou autres que celles concernant le système nerveux central, infections intra-abdominales, certaines infections des tissus mous comme les infections du « pied diabétique ») (27).
- Certaines espèces nécessitent une identification complète en raison de leur pouvoir pathogène et/ou de leur résistance aux antibiotiques (28) : *C. perfringens*, *Clostridium septicum*, *C. difficile*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium innocuum*, *F. necrophorum*, *Bacteroides* du groupe *fragilis*, *Actinomyces* spp....

1.1.7. Comment identifier les bactéries anaérobies ? (1, 27, 29-42)

L'identification présomptive repose sur :

- l'examen microscopique après coloration de Gram qui permet de fournir une réponse rapide lorsque l'aspect morphologique est évocateur (bacilles à Gram négatif fusiformes évoquant *F. nucleatum*, bacilles à Gram positif sporulés évoquant *Clostridium* spp...). Toutefois, certaines espèces de bactéries à Gram positif peuvent apparaître Gram négatif : *C. ramosum*, *Clostridium* du groupe *clostridioforme*, *C. innocuum*, *Peptoniphilus asaccharolyticus* (27, 43).
- l'aspect des colonies :
 - la pigmentation :
 - noire des colonies de *Porphyromonas* spp. et de certaines espèces de *Prevotella* spp.
 - brun-rouge des colonies d'*Actinomyces odontolyticus*
 - l'odeur : odeur de crottin de cheval caractéristique de *C. difficile*
 - l'hémolyse : double zone d'hémolyse observée autour des colonies de *C. perfringens*
- la recherche de la mobilité et de la présence de spores
- la production de catalase
- la croissance sur des milieux sélectifs
- la croissance ou son inhibition au contact de disques ou de comprimés imprégnés de substances inhibitrices : bile (1 mg), vert brillant (100 µg), polyanéthol sulfonate de sodium (1 mg), ou d'antibiotiques : vancomycine (5 µg), colistine (10 µg), kanamycine (1000 µg).

L'identification définitive peut être obtenue par l'étude de caractères biochimiques grâce à des méthodes conventionnelles qui permettent d'explorer le métabolisme des hydrates de carbone (fermentation, hydrolyse), le métabolisme protéique (présence d'une nitrate réductase, production d'indole, hydrolyse de l'urée et de la gélatine, action sur le lait), le métabolisme des lipides (lécithinase, lipase) et le métabolisme du soufre (production d'hydrogène sulfuré).

Alternativement, des galeries commercialisées permettant l'étude de certains de ces caractères ou la détection d'enzymes préformées peuvent être utilisés mais leur emploi nécessite une bonne connaissance des caractères phénotypiques en raison de bases de données parfois incomplètes.

L'identification de certaines espèces peut nécessiter le recours à des techniques chromatographiques (étude des produits terminaux du métabolisme par chromatographie en phase gazeuse) ou à des techniques de biologie moléculaire reposant sur le séquençage de gènes, principalement ceux codant l'ARN ribosomal 16S (44). Cependant, ces techniques restent l'apanage des laboratoires spécialisés.

1.2. Les corynébactéries

1.2.1. Définition

Les corynébactéries se définissent par une morphologie particulière : ce sont des bacilles à Gram positif de forme irrégulière, classiquement en massue, non sporulés, de type respiratoire aérobie ou anaérobie facultatif (figure 1).



Figure 1. Corynébactéries, coloration de Gram (d'après <http://www2.ac-lyon.fr/>)

1.2.2. Habitat

Ces bactéries font partie de la flore normale de l'homme (peau et muqueuses) et des animaux et peuvent être présentes dans l'environnement (45). Il existe une spécificité de niche en fonction des espèces : peau, oropharynx, tractus génitourinaire (exemple : *Corynebacterium glucuronolyticum*, *C. urealyticum*)...

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* (*Corynebacterium afermentans*, *Corynebacterium urealyticum* et *Corynebacterium jeikeium*) sont **aérobies strictes**. D'autres genres apparentés aux corynébactéries et aérobie 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* (*Actinomyces israelii*, *Actinomyces meyeri*) ont une croissance strictement anaérobie.

1.2.3. Pouvoir pathogène

La pathologie impliquant ces bactéries est encore dominée par la diphtérie causée par *Corynebacterium diphtheriae*, qui a pratiquement disparu en France mais a resurgi dans les pays d'Europe de l'Est, en Algérie et au Viet-nam (45).

D'autres corynébactéries, dont certaines présentent une multirésistance aux antibiotiques, se comportent comme des bactéries pathogènes opportunistes.

Les principales espèces dont la pathogénicité est reconnue figurent dans le tableau II.

1.2.4. Quand identifier les corynébactéries ? (46, 47)

En raison de leur appartenance aux flores normales de l'homme et en particulier à la flore cutanée, 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 et dans le cas d'hémocultures si au moins deux flacons sont positifs
- elles sont isolées dans des prélèvements d'urines, associées à une leucocyturie significative, à une concentration supérieure à 10^4 /mL en situation monomicrobienne ou à une concentration supérieure à 10^5 /mL si elles appartiennent à la flore prédominante.

Certaines espèces (*C. jeikeium*, *C. urealyticum*, *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 (46).

Tableau II. Principales espèces de corynébactéries dont le pouvoir pathogène est reconnu chez l'homme (46)

Espèces	Pouvoir pathogène
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Diphthérie (souches toxigènes), endocardite, bactériémie, pharyngite, plaie
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	Infection sur matériel étranger, abcès, bactériémie
<i>Corynebacterium aurimucosum</i> (<i>Corynebacterium nigricans</i>)	Arthrite septique ?, infection materno-fœtale
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	Bactériémie, méningite (neurochirurgie), endocardite, infection sur matériel étranger
<i>Corynebacterium kroppenstedtii</i>	Infection du sein (abcès, mastite granulomateuse)
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	Infections oculaires
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	Erythrasma ?, infections urinaires
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	Trachéite, abcès pulmonaire, endocardite
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Lymphadénite
<i>Corynebacterium riegelii</i>	Infection urinaire
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i> (<i>Corynebacterium seminale</i>)	Urétrite, prostatite
<i>Corynebacterium striatum</i>	Pleuropneumonie, abcès pulmonaire, endocardite.
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	Infection urinaire, endocardite
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	Pharyngite diphtériforme, abcès
<i>Actinobaculum</i> spp.	Infection urinaire
<i>Actinomyces</i> spp.	Actinomycose (<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>)
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	Pharyngite avec rash cutané, abcès, endocardite
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	Ulcère cutané, abcès
<i>Brevibacterium macbrellneri</i>	Dermatose dite « white piedra »
<i>Propionibacterium acnes</i>	Endocardite, infections ostéoarticulaires
<i>Rhodococcus equi</i>	Abcès pulmonaire, abcès cérébral
<i>Turicella otitidis</i>	Otite moyenne aigue

1.2.5. Comment identifier les corynébactéries ? (45, 46, 48)

Comme pour les bactéries anaérobies, l'**identification présomptive** du groupe repose sur :

- l'examen microscopique après coloration de Gram : les bactéries du genre *Corynebacterium* se présentent « en palissades », certaines bactéries corynéformes aérobies strictes sous forme coccoïde (genres *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Dietzia*, *Rhodococcus*). Les corynébactéries de type respiratoire anaérobie préférentiel se présentent souvent avec des branchements rudimentaires.
- l'aspect des colonies :
 - 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*, les seules exceptions étant *Corynebacterium falsenii* et *Corynebacterium lipophiloflavum* pour les souches d'origine humaine ainsi que le complexe *Corynebacterium renale* pour les souches d'intérêt vétérinaire.
 - l'odeur
 - l'hémolyse (Camp test) : *C. pseudotuberculosis* et *C. ulcerans* peuvent être différenciés de *C. diphtheriae* par un Camp test reverse positif (inhibition de l'activité hémolytique de *Staphylococcus aureus*). Cette caractéristique est aussi présente chez *Arcanobacterium haemolyticum*.
- la recherche de la mobilité, seulement positive chez quelques espèces de l'environnement
- la production de catalase, souvent négative pour les espèces de type respiratoire anaérobie préférentiel
- la détermination du type respiratoire
- la détection de la lipophilie : *C. urealyticum* et *C. jeikeium*, par exemple, nécessitent des lipides pour leur croissance.
- la recherche de la sensibilité au composé vibriostatique

En ce qui concerne les bactéries aérobies strictes appartenant aux genres *Gordonia*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* et *Dietzia*, le type respiratoire, l'aspect des colonies et l'examen microscopique sont généralement suffisants pour l'identification de ce groupe. Une coloration de Ziehl rapide est positive pour les genres *Gordonia* et *Tsukamurella* alors qu'elle est variable pour *Rhodococcus* sp. et négative pour le genre *Dietzia*.

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 l'urée et de la gélatine...) grâce à des méthodes conventionnelles ou des galeries commercialisées. L'emploi de ces galeries nécessite toutefois de garder un œil critique sur les résultats d'identification en raison de bases de données parfois incomplètes.

L'identification de certaines espèces peut nécessiter le recours à l'étude de composants de la paroi bactérienne ou à des techniques de biologie moléculaire reposant principalement sur le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S ou du gène *rpoB*. Ces techniques sont cependant réservées aux laboratoires spécialisés.

2. PRINCIPES DE L'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE DES BACTERIES ANAEROBIES ET DES CORYNEBACTERIES PAR LES SYSTEMES COMMERCIALISES (49-52)

Les méthodes conventionnelles d'identification reposant sur la détermination de caractères phénotypiques sont lourdes et fastidieuses et peuvent être coûteuses. Elles nécessitent l'utilisation de milieux pas toujours commercialisés (milieux préréduits pour les bactéries anaérobies par exemple). Elles ne sont donc pas applicables dans la plupart des laboratoires d'analyses médicales.

Pour faciliter l'identification bactérienne, plusieurs systèmes d'identification miniaturisés ont été commercialisés à la fin des années 1960. Ils contiennent différents substrats permettant d'établir un profil métabolique qui est comparé ensuite aux profils établis dans une base de données. Ils présentent de nombreux avantages : ils sont faciles à utiliser, nécessitent un espace de stockage restreint, leur durée de conservation est relativement longue et ils font l'objet de contrôles de qualité standardisés.

Vers la fin des années 1980, les premiers automates ont encore simplifié l'utilisation de ces systèmes en permettant l'automatisation de certaines étapes de l'identification. Cependant, les méthodes manuelles offrent la possibilité de lecture et d'interprétation des tests par l'utilisateur, permettant un contrôle, contrairement à certains systèmes pour lesquels la lecture est obligatoirement automatisée. De plus, l'interprétation des tests n'est pas possible lorsque la nature des substrats utilisés est inconnue ou lorsque les substrats sont connus mais inhabituels par rapport à ceux utilisés dans les méthodes conventionnelles. Enfin, il ne faut pas méconnaître les défauts des catalogues de profils (53).

Enfin, les années 1990 ont vu émerger les techniques de biologie moléculaire, reposant sur l'étude de caractères génotypiques observés après hybridation au moyen de sondes, systèmes d'amplification génique, séquençage de gènes.

Il existe globalement deux types de systèmes commercialisés : ceux nécessitant une croissance bactérienne et les systèmes rapides permettant la détection d'enzymes préformées (tableau III).

Les systèmes nécessitant une croissance bactérienne sont pour la plupart des versions miniatures des tests conventionnels. Ils nécessitent la croissance des bactéries et donc une incubation de 24-48 heures en général. Les caractères sont majoritairement ceux utilisés dans les schémas d'identification conventionnelle : fermentation d'hydrates de carbone et utilisation des protéines principalement. Le principe des réactions est basé sur une modification de pH des milieux contenus dans les cupules ou puits. La composition de ces milieux est comparable à celle des milieux utilisés pour l'identification conventionnelle. Des modifications mineures concernant en particulier la nature de l'indicateur de pH ou du tampon sont fréquentes. Ces modifications ont pour but d'assurer la stabilité des substrats pendant le processus de dessiccation, d'optimiser la vitesse de réaction et de permettre une lecture plus facile des réactions colorées.

Tableau III. Systèmes d'identification commercialisés disponibles en 2009 pour l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries (50)

Réactions explorées	Croissance bactérienne nécessaire	Temps d'incubation	Indicateur de résultat positif	Systèmes d'identification	
				Bactéries anaérobies	Corynébactéries
Fermentation d'hydrates de carbone, métabolisme protéique	Oui	24-48 h	Changement de couleur de l'indicateur de pH : utilisation des hydrates de carbone = pH acide ; utilisation des protéines = pH alcalin	API 20 A [®]	API Coryne [®] BD Crystal [®] GP
Principalement enzymatiques	Non	4-6 h	Changement de couleur ou fluorescence lorsque le complexe est hydrolysé par l'enzyme appropriée	RapID ANA II [®] Rapid ID 32 A [®] BD Crystal [®] ANR ID MicroScan Rapid Anaerobe [®] Vitek [®] 2 ANC	RapID CB Plus [®] BD Crystal [®] RGP Phoenix PID [®] Vitek [®] 2 ANC
Oxydation de produits organiques, sensibilité à différents inhibiteurs	Oui	4-24 h	Changement de couleur résultant du transfert d'électrons des sources de carbone marquées par du tétrazolium : incolore => formazan violet	Biolog [®] AN Microplate	Biolog [®] GP2 Microplate

Le système Biolog® s'appuie sur un principe original : l'oxydation de sources de carbone couplées à du tétrazolium. Une réaction positive entraîne une réduction de cet indicateur qui se traduit par la formation de formazan violet. Ce système utilise aussi des tests de sensibilité à différents inhibiteurs.

Au contraire, **les systèmes explorant le profil enzymatique**, qualifiés de « rapides », ne sont pas dépendants de la croissance bactérienne, comportent de nombreux tests non utilisés dans les méthodes conventionnelles et nécessitent en général quatre heures d'incubation. Ils utilisent comme substrats des hydrates de carbone ou des acides aminés voire des dipeptides liés à un chromogène ou à un fluorogène. Si le microorganisme à identifier produit l'enzyme appropriée, le complexe substrat-chromogène ou substrat-fluorogène est clivé et une réaction positive est détectée.

Concernant les systèmes utilisant des chromogènes, les mono ou disaccharides sont généralement liés de façon covalente à de l'ortho- ou du para-nitrophénol, et le complexe est alors incolore. Après clivage, le nitrophénol libre est jaune. Les acides aminés ou les dipeptides sont généralement couplés à la β -naphtylamine qui est incolore sous forme liée et libre. Pour révéler une réaction, il est donc nécessaire d'ajouter un réactif, qui par liaison avec la β -naphtylamine, entraîne la production d'une coloration.

Concernant les systèmes utilisant des fluorogènes, la 4-méthylumbelliférone (4 MU) est généralement couplée aux hydrates de carbone pour la détection des glycosidases, et la 7-amino-méthyl coumarine (7-AMC) couplée aux acides aminés ou dipeptides pour la détection des peptidases.

Par ailleurs, ces systèmes explorent d'autres caractères tels que la production d'uréase, d'indole, de nitrate réductase, de phosphatases (acide et/ou alcaline), de catalase et la fermentation d'hydrates de carbone.

Les résultats obtenus pour une même souche et concernant le même substrat peuvent être différents d'un système à l'autre (54).

2.1. Les étapes de l'identification biochimique bactérienne par les systèmes commercialisés (49-51)

2.1.1. La préparation de l'inoculum bactérien

Quelle que soit la méthode d'identification utilisée, il est nécessaire de disposer d'une souche en culture pure. La pureté de la souche peut être vérifiée par isolement de l'inoculum bactérien sur un milieu gélosé. Par ailleurs, il ne faut pas négliger l'observation de l'aspect microscopique après coloration de Gram et celle de l'aspect des colonies (hémolyse, pigmentation éventuelle...). Ces critères sont utiles pour l'interprétation des résultats même s'ils ne sont pas pris en compte par le système d'identification.

Les recommandations du fabricant précisent l'âge des cultures bactériennes à tester, qu'il est important de respecter.

Le type de gélose d'isolement est important pour l'expression des caractères biochimiques, car certains composants peuvent interférer avec les réactions (par exemple, les milieux contenant des mono ou disaccharides risquent d'inhiber l'activité glucidolytique des bactéries

avec la galerie Rapid ANA II[®]). Les milieux d'isolement préconisés par le fabricant sont précisés dans les notices. L'utilisation d'autres milieux peut conduire à des résultats erronés.

L'inoculum bactérien est réalisé par mise en suspension de colonies obtenues sur les milieux gélosés préconisés. Il est étalonné au moyen d'une gamme de MacFarland ou d'un néphélomètre. Du point de vue de l'utilisateur, le plus faible inoculum requis est le meilleur. Cependant, l'inoculum préconisé par le fabricant est parfois difficile à obtenir avec les espèces à croissance lente (par exemple, la galerie API Coryne[®] nécessite un inoculum bactérien de densité supérieure au point six de l'échelle de MacFarland).

2.1.2. La distribution de l'inoculum

Elle peut être manuelle ou automatisée.

2.1.3. L'incubation

Les galeries d'identification nécessitant une croissance bactérienne requièrent une incubation de 24 à 48 heures, en anaérobiose pour les bactéries anaérobies. Les systèmes commercialisés comportant des substrats d'enzymes préformées produites par les microorganismes nécessitent généralement une durée d'incubation de quatre heures.

La température d'incubation préconisée est généralement de 35 à 37°C.

2.1.4. La lecture et l'interprétation des résultats

Pour la plupart des systèmes, il est nécessaire d'ajouter des réactifs pour révéler les réactions avant la lecture. Celle-ci est visuelle et/ou automatique selon les systèmes.

Le profil métabolique obtenu est ensuite comparé à ceux d'une base de données figurant dans un catalogue ou dans un logiciel d'identification.

Lorsque l'identification d'une bactérie n'apparaît pas satisfaisante, certains fabricants proposent des tests complémentaires dont la réalisation peut être simple et rapide à mettre en oeuvre ou nécessiter une durée d'exécution plus longue et l'emploi de milieux qui ne sont pas toujours disponibles.

2.2. La base de données

Pour tous les systèmes, l'aptitude à générer des résultats d'identification corrects repose sur la qualité de la base de données. Celle-ci varie en fonction des systèmes d'identification : le nombre d'espèces incluses peut varier de quelques unes pour certains à plus de 1 900 pour d'autres (Biolog[®]), particulièrement si le système est utilisé aussi pour l'identification de souches d'origine environnementale ou dans le cadre de la recherche. Par ailleurs, certains profils d'espèces peuvent être établis en testant une centaine de souches, alors que d'autres, correspondant aux espèces plus rares, peuvent n'être établis qu'avec quelques souches, dont souvent des souches de référence. Ce manque de souches cliniques testées pour les espèces

rare est l'une des raisons pour lesquelles les systèmes ont généralement des performances moindres pour leur identification, surtout avec les premières versions des bases de données.

Pour la plupart des systèmes commercialisés, 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 (50).

2.3. Evaluation d'un système d'identification bactérienne

Evaluer et comparer les performances des systèmes d'identification à partir d'une revue de la littérature est un exercice difficile, car les différentes études concernant un même système ne sont pas conduites de la même façon et les résultats peuvent être facilement biaisés selon la manière dont l'étude a été conduite (54). L'utilisateur potentiel doit conserver un esprit critique vis-à-vis des données de la littérature, en portant une attention particulière (50, 55, 56) :

- **A l'origine des souches.** La majorité des souches testées par le fabricant pour construire la base de données sont d'origine clinique. Si les souches utilisées pour tester le système dans une étude sont également d'origine clinique, on devrait donc s'attendre à de meilleurs résultats que si des souches d'un autre environnement étaient utilisées. De même, les souches types ne devraient pas être utilisées pour évaluer les performances d'un système, car elles ne se comportent pas forcément de la même manière que les souches isolées de prélèvements cliniques.
- **Au nombre de souches testées par espèce.** Ce facteur a un très grand impact sur la démonstration des performances. Il existe deux voies d'évaluation :
 - tester les souches consécutives isolées au laboratoire : il en résulte beaucoup d'informations sur la capacité du système à identifier les espèces fréquemment isolées et peu de données concernant les espèces plus rares. Les résultats sont représentatifs des performances du système au jour le jour. Puisque l'accent est mis sur les espèces communes (comme le fait le fabricant), le pourcentage d'identifications correctes devrait être plutôt élevé.
 - tester un nombre de souches comparable que l'espèce soit fréquemment isolée ou rarement isolée. Cela donne une image plus juste des performances, incluant les évaluations concernant les bactéries plus rarement isolées. Puisque la plupart des systèmes ont de bonnes performances pour les espèces fréquemment isolées, cela aide à percevoir les différences entre ces systèmes. Les résultats sont généralement moins bons que dans le cas précédent.
- **A la méthode d'identification de référence (« gold standard »).** L'évaluation d'un système ne peut se faire que si les souches testées ont été identifiées de manière rigoureuse.
- **A la version de la base de données.** La première version d'un système d'identification est généralement moins performante que les versions suivantes, rendant la comparaison des résultats obtenus avec un même système difficile.

- **Aux tests complémentaires.** Lors de l'évaluation d'un système, les auteurs devraient préciser si le pourcentage d'identifications correctes a été obtenu avec ou sans l'utilisation des tests complémentaires recommandés. Le but de l'utilisateur est de pratiquer aussi peu de tests complémentaires que possible. Idéalement, les espèces fréquemment isolées ne devraient pas nécessiter de tests complémentaires. Si deux systèmes donnent des résultats équivalents en utilisant tous les tests complémentaires recommandés, mais qu'un système montre un pourcentage d'identifications correctes supérieur sans tests complémentaires, ce dernier est clairement préférable. Le recours à des tests complémentaires entraîne un allongement de la durée de l'identification, ce qui diminue l'intérêt des méthodes rapides.
- **A la définition d'une identification correcte.** C'est l'un des facteurs les plus critiques. La plupart des auteurs semblent adopter des définitions différentes qui rendent la comparaison entre articles très difficile. Elle peut correspondre à une identification au niveau du genre ou de l'espèce. Lors de la comparaison de plusieurs systèmes, certains auteurs n'identifient pas les souches à tester par une méthode de référence mais définissent un résultat correct comme celui obtenu avec deux systèmes ou plus. Il faut aussi définir un niveau d'identification acceptable : une identification correcte correspond-elle à un pourcentage d'homologie supérieur à 99 %, 95 %, 90 % avec l'ensemble des caractères définissant une espèce de la base de données ? Certains auteurs acceptent simplement le premier résultat indiqué correct sans tenir compte du pourcentage, d'autres considèrent un résultat comme correct si le nom de l'espèce figure parmi les choix proposés, même si elle ne correspond pas au premier choix (54). Enfin, certains auteurs prennent en considération les résultats obtenus après plusieurs tests répétés sur la même souche.

2.4. Les systèmes d'identification biochimique des bactéries anaérobies (tableau V)

2.4.1. Systèmes nécessitant une croissance bactérienne

Ces systèmes présentent l'inconvénient de nécessiter une incubation en anaérobiose pendant 24 à 48 heures (tableau V et VI).

2.4.1.1. API 20 A[®] (bioMérieux) (57-67)

Introduite sur le marché en 1974, cette galerie fut le premier système commercialisé pour identifier les bactéries anaérobies. La composition des substrats et des réactifs est restée inchangée (49). Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés (figure 2) : 16 microtubes testent la fermentation d'hydrates de carbone, les quatre autres testant l'hydrolyse de l'esculine, la production d'indole, l'hydrolyse de l'urée et l'hydrolyse de la gélatine. L'indicateur de pH est le bromocrésol pourpre.



Figure 2. API 20 A[®] (d'après <http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr>)

L'inoculation est manuelle et l'incubation doit être faite en anaérobiose.

Avant la lecture visuelle des réactions, il est nécessaire d'ajouter des réactifs pour révéler la production d'indole et la production de catalase.

La galerie API 20 A[®] prend en compte l'aspect à la coloration de Gram et la morphologie des bactéries pour l'interprétation des résultats.

L'interprétation est ensuite réalisée en convertissant le profil réactionnel en profil numérique ; l'identification est obtenue grâce à un catalogue analytique ou au logiciel d'identification *apiweb*[®] disponible via internet. Les résultats peuvent également être interprétés à l'aide des semi-automates ATB Expression[®] ou mini API[®] (qui ne sont plus commercialisés en 2009), ces systèmes nécessitant l'entrée manuelle du profil numérique à l'aide d'un clavier.

Le système est simple à utiliser et reproductible (60) mais le changement de couleur de l'indicateur coloré n'est pas toujours évident, pouvant rendre l'interprétation des tests difficile, notamment la fermentation des hydrates de carbone. Parfois, il est nécessaire d'ajouter du bromocrésol pourpre dans les microtubes. Plusieurs auteurs ont observé des teintes douteuses de brun, gris-brun ou brun-violet dans ces puits même après addition de bromocrésol pourpre (59, 61-63).

Selon certains auteurs, les tests indole et gélatine ne sont pas assez sensibles (64, 65). L'interprétation de l'hydrolyse de l'esculine nécessite une lampe à UV : une coloration noire peut être due à l'hydrolyse de l'esculine (la coloration noire persiste sous UV et il n'y a pas de fluorescence) ou à la production d'H₂S (fluorescence sous UV) (61) (figure 3).



Figure 3. API 20 A[®] : test de l'hydrolyse de l'esculine négatif (fluorescence sous UV)
(d'après <http://www.geniebio.ac-aix-marseille.fr>)

La base de données actuelle de la galerie API 20 A[®] ne permet pas de différencier certaines espèces appartenant au même genre bactérien :

- *Actinomyces meyeri* et *Actinomyces odontolyticus*
- *Bacteroides ovatus* et *Bacteroides thetaiotaomicron*,
- *Bacteroides stercoris* et *Bacteroides eggerthii*,
- *Fusobacterium necrophorum* et *Fusobacterium nucleatum* (la coloration de Gram permet cependant de les différencier),
- *Prevotella intermedia* et *Prevotella disiens*,
- *Prevotella melaninogenica* et *Prevotella oralis*,
- *Clostridium beijerinckii* et *Clostridium butyricum*
- *Clostridium botulinum* et *Clostridium sporogenes*
- *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus jensenii*
- *Propionibacterium propionicum* et *Propionibacterium avidum*

De même, le système n'identifie pas les cocci Gram positif anaérobies au niveau de l'espèce, sauf *Peptoniphilus asaccharolyticus*.

Ce système est approprié pour les espèces glucidolytiques à croissance rapide, comme les *Bacteroides* du groupe *fragilis* et les *Clostridium* glucidolytiques, mais le recours à des tests complémentaires est souvent nécessaire (27). La plupart des espèces non glucidolytiques et les espèces de culture difficile (*Prevotella* spp. par exemple) ne peuvent pas être identifiées avec ce système.

2.4.1.2. Biolog AN Microplate[®] (Biolog)

Le système MicroStation ID[®] de Biolog permet l'identification de plus de 1900 espèces de microorganismes incluant des bactéries aérobies et anaérobies, et des levures. La microplaque AN Microplate[®] est destinée à l'identification des bactéries anaérobies. Ce système se présente sous la forme d'une microplaque de 96 puits (figure 4) dans laquelle 95 puits contiennent les substrats (sources de carbone et inhibiteurs).



Figure 4. Plaqué d'identification du système Biolog[®] (d'après <http://www.biolog.com>)

Seule la gélose Biolog Universal Anaerobe[®] peut être utilisée pour la croissance bactérienne. La préparation de l'inoculum et l'inoculation sont manuelles, l'inoculation pouvant être facilitée par l'utilisation d'une pipette électronique à huit canaux. L'incubation doit être faite en anaérobiose pendant 20 à 24 heures.

Ce système présente l'avantage de ne pas nécessiter l'addition de réactifs avant la lecture, qui peut être visuelle ou automatisée. Cependant, l'identification de certaines espèces, dont certaines sont fréquemment isolées (*Actinomyces* spp., *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Propionibacterium* spp...), nécessite une lecture automatisée.

- Avec le système **MicroLog**[®], la lecture est visuelle et les réactions sont enregistrées manuellement dans un logiciel. Ce système inclut un turbidimètre pour la préparation des inocula et un logiciel d'identification.
- Avec le système **MicroStation ID**[®] (figure 5), la lecture est automatisée. Ce système inclut un turbidimètre, une pipette électronique à huit canaux, un lecteur de microplaques et le logiciel.

Les résultats sont ensuite comparés à la base de données informatique des bactéries anaérobies (Biolog AN Database[®]), qui est vendue séparément et est onéreuse.



Figure 5. Système MicroStation ID[®] (d'après <http://www.focusbiotech.com>.)

C'est le système qui possède la base de données la plus étendue (applications industrielles et environnementales) mais à notre connaissance, aucune évaluation de l'identification des bactéries anaérobies par ce système n'est disponible.

2.4.2. Systèmes explorant le profil enzymatique (dits « rapides »)

Ces systèmes, contrairement aux systèmes précédents, présentent l'avantage d'une incubation en aérobiose pendant une durée de seulement quatre à six heures (tableau V et VI).

2.4.2.1. Rapid ID 32 A[®] (bioMérieux) (65, 68-82)

Ce système se présente sous la forme d'une galerie comportant 32 cupules dont 29 contiennent des substrats déshydratés (figure 6). Il permet la réalisation de 27 tests enzymatiques et de deux tests de fermentation des glucides (mannose et raffinose).



Figure 6. Rapid ID 32A[®] (<http://www.microbe-edu.org>)

L'inoculation est manuelle. La lecture peut se faire selon deux modes :

- **visuel**, permettant d'obtenir un profil numérique. L'identification est obtenue avec le logiciel *apiweb[®]* après saisie manuelle de ce profil.
- **automatisé** si le laboratoire dispose des semi-automates ATB-Expression[®] (figure 7) ou mini API[®] (figure 8) qui sont ne plus commercialisés en 2009. Après lecture et transmission des données à l'ordinateur, le logiciel d'identification interprète les résultats.



Figure 7. Semi-automate ATB-Expression[®] (d'après <http://www.microbe-edu.org>)



Figure 8. Semi-automate mini API[®] (d'après 83)

Un des inconvénients de la galerie Rapid ID 32 A[®] est la nécessité d'utiliser un seul type de gélose d'isolement, la gélose Columbia au sang supplémentée en vitamine K (77).

Les réactions des tests explorant les glycosidases sont simples à lire sauf celles détectant la β -galactosidase-6-phosphate et l' α -galactosidase, qui donnent parfois une coloration jaune pâle (70). En revanche, la lecture des réactions détectant les arylamidases peut être difficile (orange pâle : réaction négative, orange : réaction positive) (70, 73, 75, 77). La production d'indole se manifeste par une couleur rose très marquée, contrairement à ce qui est observé avec le système API 20 A[®] (73).

Une durée d'incubation de quatre heures peut s'avérer insuffisante pour les réactions concernant la fermentation des glucides (données personnelles).

Le système Rapid ID 32 A[®] ne prend pas en compte la morphologie bactérienne, l'aspect après coloration de Gram, la présence de spores, le test de la catalase ou le type respiratoire, ce qui peut être préjudiciable pour l'interprétation (données personnelles).

2.4.2.2. RapID ANA II[®] (Remel) (65, 68, 74, 81, 84-88)

La galerie est composée de dix cupules dont huit sont bifonctionnelles (figure 9), permettant la détection de 18 caractères enzymatiques : huit glycosidases, sept aminopeptidases, phosphatase alcaline, uréase, tryptophane désaminase (indole).



Figure 9. RapID ANA II[®] (d'après <http://www.oxid.com>)

Cette galerie est la seule qui permette la préparation de l'inoculum à partir de milieux d'isolement sélectifs. L'inoculation manuelle est facile car il suffit de verser la suspension bactérienne dans les deux premières cupules de la galerie puis d'incliner celle-ci.

La lecture présente l'avantage de pouvoir être différée au lendemain après conservation de la galerie entre 2 et 8 °C. Il faut effectuer une première lecture avant addition des réactifs, puis une deuxième lecture après addition de réactifs dans les huit dernières cupules bifonctionnelles. Un profil numérique est ensuite établi, puis comparé à ceux de la base de données figurant dans un manuel (*Code Compendium*) ou dans un logiciel (ERIC[®]), après prise en compte de la morphologie et de l'aspect après coloration de Gram.

Le recueil ou le logiciel fournissent une ou plusieurs identifications possibles avec les probabilités d'identification correcte correspondantes, les tests à l'encontre et les tests additionnels utiles pour parvenir à identification correcte.

2.4.2.3. BD Crystal[®] ANR ID (Becton Dickinson) (74, 78, 81, 89-91)

Ce système se présente sous la forme d'un couvercle contenant 29 substrats déshydratés et un contrôle fluorescent négatif, et d'une base contenant 30 puits réactionnels. 26 tests sont enzymatiques, 17 substrats étant liés à un fluorogène et neuf à un chromogène. Les trois tests restant sont des tests de fermentation d'hydrates de carbone.

Ce système permet la suppression de l'opération de pipetage dans chaque puits car l'ensemencement se fait en une seule opération : la suspension bactérienne est versée dans la base contenant les puits réactionnels, et lorsque le couvercle est aligné avec la base, l'inoculum réhydrate les substrats.

Le système doit être incubé en atmosphère humide (40-60 %).

La lecture ne nécessite pas l'addition préalable de réactifs et peut être visuelle ou automatique. La lecture visuelle des réactions fluorescentes et d'hydrolyse de l'esculine (positivité du test marquée par une diminution de la fluorescence) nécessite de disposer d'une source de lumière UV. Une visionneuse commercialisée par le fabricant dispose d'une source de lumière blanche pour la lecture des réactions chromogènes et d'une source de lumière UV permettant la lecture des réactions fluorogènes (figure 10). La lecture automatique s'effectue grâce au lecteur BD Crystal[®], vendu séparément (figure 11).



Figure 10. Visionneuse BD Crystal[®]
(d'après <http://www.bd.com>)



Figure 11. Lecteur BD Crystal[®]
(d'après <http://www.bd.com>)

Quel que soit le mode de lecture, les résultats des tests coloration de Gram, catalase et indole, doivent être renseignés pour l'interprétation. Après lecture visuelle, les résultats doivent être saisis dans un micro-ordinateur du laboratoire (PC) dans lequel la disquette contenant les bases de données des systèmes BD Crystal ID[®] a été installée (disquette non fournie). Après lecture automatique, les microorganismes sont identifiés après transmission automatique des résultats au logiciel.

Le système BD Crystal Anaérobies ID[®] possède trois bases de données établies selon le milieu de culture utilisé : gélose Schaedler, gélose CDC au sang pour culture des bactéries anaérobies et géloses au sang (Brucella, Columbia). Ces bases de données sont très complètes. Le logiciel affiche l'identification au niveau du genre ou de l'espèce, propose plusieurs espèces en cas de faible discrimination. Sont également mentionnées des commentaires précisant les réactions atypiques et les tests complémentaires permettant de différencier les bactéries en cas de faible discrimination.

2.4.2.4. MicroScan Rapid Anaerobe[®] (Siemens) (92)

Ce système est constitué d'une plaque de 96 puits contenant 24 substrats déshydratés et deux contrôles (un substrat nitrophényl et un substrat β -naphtylamide) destinés à favoriser l'interprétation des réactions colorées. 23 tests sont enzymatiques (20 substrats sont couplés à un chromogène) et un test correspond à la fermentation d'hydrate de carbone. Le test de la catalase est pris en compte pour l'identification et s'effectue dans l'un des puits. L'inoculum peut être préparé à l'aide d'une pointe calibrée permettant de standardiser la densité de l'inoculum sans utiliser de turbidimètre [système Prompt[®] (figure 12)]. L'inoculation est manuelle, mais peut être facilitée par l'utilisation d'un dispositif de pipettage qui inocule les plaques en une étape (42 secondes) [système RENOK[®] (figure 13)]. (données Siemens).



Figure 12. Système d'inoculation Prompt[®] (d'après Siemens[®])



Figure 13. MicroScan[®] : système d'inoculation RENOK[®]
(d'après <http://www.usamma.army.mil>)

Le système peut être utilisé :

- **manuellement** : l'incubation de la plaque a lieu dans une étuve, la lecture nécessite l'addition préalable de réactifs et est visuelle. Le profil numérique établi est comparé à ceux de la base de données figurant dans un manuel. Des difficultés de lecture concernant la réaction lysine-arylamidase et la phosphatase ont été rapportées (92).

- avec le semi-automate **AutoSCAN-4[®]** (figure 14) permettant la lecture automatisée des plaques MicroScan[®] d'identification et d'antibiogramme, après incubation dans une étuve. L'interprétation est automatisée par l'intermédiaire du logiciel Labpro[®] (fourni).



Figure 14. Semi-automate AutoScan-4[®] (d'après <http://www.diagnostics.siemens.com>)

- avec l'automate **MicroScan WalkAway[®] plus** (figure 15) (capacité 40 ou 96 plaques) qui permet l'incubation, l'addition de réactifs et la lecture automatisées des plaques pour les identifications et les antibiogrammes. L'interprétation est automatisée par l'intermédiaire du logiciel Labpro[®] (fourni).



Figure 15. Automate Microscan[®] WalkAway (d'après 83)

Ces instruments permettent une connexion bidirectionnelle avec l'informatique de laboratoire, l'édition des résultats, le stockage et l'archivage de données et possèdent un logiciel d'épidémiologie.

En ce qui concerne l'expression des résultats, toutes les identifications possibles sont indiquées dans l'ordre des probabilités décroissantes avec une probabilité d'identification cumulée de 99,9 %. Si plusieurs espèces sont identifiées par un même profil numérique, des tests complémentaires sont souvent nécessaires pour parvenir à l'identification définitive, mais ces tests ne sont pas proposés par le système.

2.4.2.5. API ZYM® (bioMérieux) (93-103)

Cette galerie de 20 microcuvettes (figure 16) permet d'étudier 19 activités enzymatiques de manière semi-quantitative.



Figure 16. Galerie API ZYM® (d'après <http://www.didier-pol.net>)

Toutes les étapes de l'identification sont manuelles. Un inoculum de densité optique de cinq à six de l'échelle de McFarland est requis, ce qui peut être difficile à obtenir pour les bactéries de croissance difficile.

La galerie doit être incubée pendant quatre heures à 37°C.

La lecture nécessite l'addition préalable de réactifs. L'utilisateur attribue une note à chaque réaction selon l'intensité de la couleur observée dans les microcuvettes, à l'aide d'une échelle de lecture (figure 17). Les colorations restent stables plusieurs heures mais moins de 24 heures. La lecture présente donc l'avantage de pouvoir être différée. Les réactions sont faciles à interpréter et le système est reproductible (67, 100).

Ce système n'est pas spécifique à l'identification des bactéries anaérobies mais il peut être utile pour l'identification des *Porphyromonas* spp. et des clostridia (93, 103).

Le système API ZYM ne possède pas de base de données ; les résultats sont interprétés en fonction des données de la littérature. (53, 67, 84, 93-103).

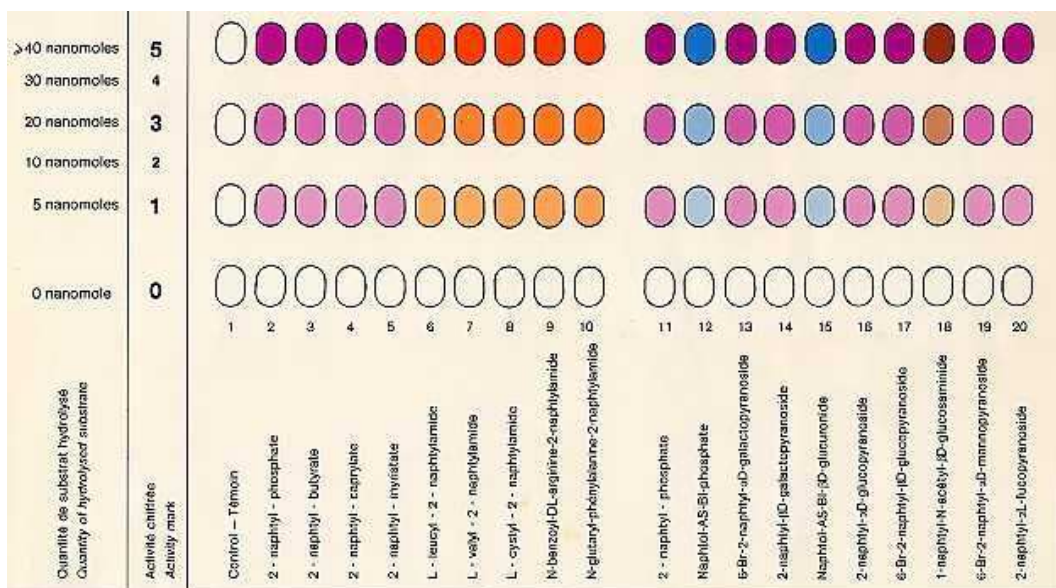


Figure 17. Echelle de lecture aidant à l'interprétation de la galerie API ZYM® (d'après <http://www.didier-pol.net>)

2.4.2.6. Carte Vitek[®] 2 ANC (bioMérieux) (104-107)

Cette carte colorimétrique (figure 18) contient 36 tests biochimiques: 17 enzymatiques (glycosidases et arylamidases), 13 tests d'acidification, deux tests d'alcalinisation et quatre tests divers (annexe 2).

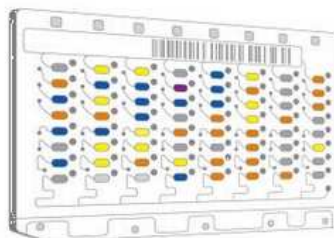


Figure 18. Schéma d'une carte du système Vitek[®]
(d'après <http://www.biomerieux-diagnostics>)

Les étapes d'inoculation, d'incubation (en aérobiose), de lecture et d'interprétation sont automatisées. Cette carte peut être utilisée avec les automates Vitek[®] 2 (capacité de 60 cartes) (figure 19), Vitek[®] 2 XL (capacité de 120 cartes) et Vitek[®] 2 Compact (capacité de 15, 30 ou 60 cartes) (figure 20). Le Vitek[®] 2 Compact est une version moins onéreuse du Vitek[®] 2, destinée à de plus petits laboratoires.

Ces systèmes sont composés (107) :

- ▶ d'un **Densichek[®]** : densitomètre permettant l'ajustement de l'inoculum,
- ▶ de **cassettes** pouvant contenir jusqu'à 15 cartes et les tubes contenant la suspension bactérienne à inoculer. L'inoculation de la carte est réalisée au moyen d'un tube de transfert que l'on plonge dans le tube contenant la suspension bactérienne. Ces cassettes sont destinées à être incorporées dans l'automate (figure 21).
- ▶ d'un **automate** réalisant les étapes de remplissage, de scellage, d'incubation, de lecture et d'interprétation des cartes. Une lecture est effectuée toutes les 15 minutes.
- ▶ d'un **ordinateur** et de **logiciels** spécialisés gérant et analysant les données générées par l'automate. Ce système permet une recherche rapide par patient, date de test, organisme identifié, technicien manipulateur, ... Il peut être connecté à une interface centrale, il permet la validation automatique et le transfert des premiers résultats.

Les systèmes Vitek[®] 2 et Vitek[®] 2 XL comprennent également une **Station Compacte Satellite[®]** (SCS) (figure 22), utilisée pour associer le numéro d'échantillon du patient à la carte par l'intermédiaire d'un code à barres et au tube contenant la suspension à inoculer. Ce petit ordinateur transfère ces informations à l'automate. La SCS est composée d'une unité de base (puce de mémoire qui enregistre les informations entrées), d'un écran, d'un lecteur de code à barres et d'un clavier.



Figure 19. Automate Vitek® 2 (d'après <http://www.biomerieux-diagnostics>)



Figure 20. Automate Vitek® 2 Compact (d'après <http://www.biomerieux-diagnostics>)

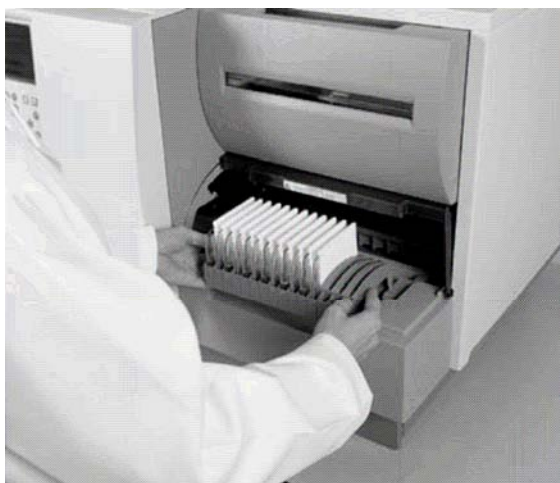


Figure 21. Chargement d'une cassette dans le Vitek® 2 (107)



Figure 22. Station Compacte Satellite® (d'après <http://www.biomerieux-diagnostics>)

L'intervention du technicien est nécessaire pour :

- La préparation de l'inoculum, qui doit être utilisé dans les 30 minutes suivant sa préparation
- L'identification de la carte grâce à un lecteur de code barres pour permettre de la relier à l'échantillon du patient
- Le dépôt des cassettes dans l'automate
- L'enregistrement de trois caractères – le type respiratoire, la morphologie et la coloration de Gram - dans l'ordinateur de l'automate, en utilisant les caractères « - », « + » ou « ? ».
- Dans le cas du Vitek® 2 Compact, le technicien doit déplacer la cassette au sein de l'automate entre l'inoculation et l'incubation.

Dans l'automate, la cassette est transférée 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, permettant de remplir tous les puits réactionnels. Le tube de transfert est ensuite coupé et les cartes sont scellées avant d'être incubées à 35,5 +/- 1,0 °C dans l'automate. Toutes les 15 minutes, ces cartes sont transférées vers un système optique pour la lecture des réactions puis sont à nouveau réintroduites automatiquement dans l'incubateur. Les résultats des réactions sont exprimées ainsi : « + » pour une réaction positive, « - » pour une réaction négative et « ? » pour les réactions ininterprétables.

Le profil réactionnel obtenu est comparé à ceux des taxons contenus dans la base de données et un calcul de probabilité d'identification correcte est effectué. Différents niveaux de confiance y sont associés (tableau IV).

Tableau IV. Niveaux de confiance pouvant être associés à un résultat d'identification avec la carte Vitek® 2 ANC

Niveau de confiance d'identification	Probabilité d'identification correcte (%)	Commentaires
Excellent	96 – 99	Un seul taxon est proposé
Très bon	93 – 95	
Bon	89 – 92	
Acceptable	85 – 88	
Faible discrimination		Deux ou trois taxons présentent un profil similaire. Des tests complémentaires sont proposés par le système pour aboutir à une identification correcte.
Absence d'identification		Plus de trois taxons présentent un profil similaire ou le profil est atypique et ne correspond à aucune espèce de la base de données. Il est alors recommandé de vérifier la coloration de Gram et la pureté.

L'inventaire des tests complémentaires susceptibles d'être proposés par le système sont répertoriés en annexe (annexe 3).

La base de données revendique 63 taxons incluant des bactéries anaérobies et des corynébactéries (annexe 1). Parmi les bactéries anaérobies, les *Bifidobacterium* et les *Veillonella* sont identifiés au niveau du genre, et les espèces *Actinomyces israelii* et *Actinomyces gerencseriae* ne sont pas différenciées.

2.5. Systèmes d'identification biochimique des corynébactéries (tableau VI)

2.5.1. Systèmes nécessitant une croissance bactérienne

Ces systèmes requièrent une durée d'incubation de 18 à 48 heures, sauf le système Biolog[®] qui peut fournir un résultat d'identification après une durée minimale de quatre heures.

2.5.1.1. API Coryne[®] (bioMérieux) (108-112)

Cette galerie a été le premier système d'identification commercialisé dédié spécifiquement à l'identification des bactéries corynéformes. Elle comprend 20 microtubes contenant les substrats déshydratés permettant la mise en évidence d'activités enzymatiques (douze) et de la fermentation d'hydrates de carbone (huit). Le test de la catalase est réalisé dans un des microtubes.

La densité de l'inoculum requise (supérieure au point six de l'échelle de MacFarland) constitue un inconvénient car elle nécessite une culture riche impliquant parfois le recours à l'ensemencement de plusieurs milieux gélosés (111). La préparation d'un second inoculum à partir du premier pour l'étude des tests de fermentation constitue un autre inconvénient.

Un temps d'incubation de 24 heures peut ne pas être suffisant, car certaines réactions de fermentation des hydrates de carbone ne se positivent qu'après une incubation prolongée (110).

La lecture est uniquement visuelle. L'addition de zinc dans le puits nitrate est recommandée quand le test apparaît négatif pour détecter les souches qui peuvent réduire les nitrites (111). Des difficultés concernant la lecture des réactions enzymatiques (en particulier, phosphatase alcaline, N-acétyl- β -glucosaminidase, et hydrolyse de l'esculine) ont été rapportées (110, 111). Comme pour la galerie API 20 A[®], l'hydrolyse de l'esculine peut être vérifiée par l'absence de fluorescence sous exposition à la lumière UV.

L'identification est obtenue à l'aide d'un catalogue analytique ou du logiciel d'identification *apiweb*[®] après saisie manuelle du profil numérique obtenu à partir du profil réactionnel. Parfois, les réactions ne permettent pas de différencier deux espèces et des tests complémentaires sont nécessaires. Dans ce cas, le descriptif de ces tests et les références bibliographiques sont indiqués par le fabricant.

2.5.1.2. BD Crystal[®] GP (Becton Dickinson) (108)

Ce système est destiné à l'identification des bactéries aérobies à Gram positif. Il est comparable au système BD Crystal[®] ANR ID : il contient le même nombre de substrats déshydratés (29) et un contrôle fluorescent. L'inoculation, la lecture et l'interprétation suivent le même principe.

Les différences concernent :

- La nature des substrats. Onze sont couplés à un fluorogène, dix-huit à un chromogène,
- la nature des milieux de culture recommandés pour la préparation de l'inoculum,
- la densité de l'inoculum,
- la durée d'incubation,
- les tests complémentaires requis pour l'interprétation : seule la coloration de Gram est prise en compte.

2.5.1.3. Biolog[®] GP2 Microplate (Biolog) (113)

Cette microplaque, destinée à l'identification des bactéries aérobies à Gram positif, est analogue à l'AN Microplate[®] et s'utilise avec les mêmes systèmes (MicroLog[®] ou MicroStation[®]). L'incubation des plaques en aérobiose permet l'utilisation de l'automate OmniLog[®] (figure 23), dont la capacité est de 50 microplaques. Avec cet appareil, l'incubation, la lecture et l'interprétation sont automatisées.

La base de données étendue est vendue séparément et est onéreuse.



Figure 23 : Automate OmniLog[®] (<http://www.uri.edu>)

2.5.2. Systèmes explorant le profil enzymatique (« dits rapides »)

2.5.2.1. RapID CB Plus[®] (Remel) (74, 81, 108, 114, 115)

La galerie est composée de 18 cupules (figure 24), permettant l'étude de la fermentation de quatre hydrates de carbone et la détection de 14 caractères enzymatiques : cinq glycosidases, cinq aminopeptidases, phosphatase alcaline, uréase, estérase, nitrate réductase.



Figure 24. RapID CB Plus[®] (d'après <http://www.oxid.com>)

Le principe d'inoculation est le même que celui de la galerie RapID ANA II[®].

Après incubation et addition de réactifs, une lecture visuelle des réactions permet l'établissement d'un profil numérique.

L'identification est ensuite réalisée grâce à un catalogue ou à un logiciel d'identification (ERIC[®]) dans lequel l'utilisateur aura enregistré le profil numérique obtenu après prise en compte du test de la catalase et de l'évaluation de la pigmentation jaune de l'isolat.

Certains auteurs ont rapporté des difficultés de lecture de quelques réactions (114) : les couleurs orange apparaissant dans les puits correspondants à la fermentation des hydrates de carbone doivent être généralement considérées comme des résultats négatifs.

2.5.2.2. BD Crystal[®] RGP (Becton Dickinson)

Ce système rapide est comparable au système BD Crystal[®] GP. Les différences concernent :

- la densité de l'inoculum qui doit être au moins équivalente au point deux de l'échelle de McFarland,
- la durée d'incubation qui n'est que de quatre heures,
- la base de données qui revendique moins d'espèces de corynébactéries.

2.5.2.3. Phoenix PID[®] (Becton Dickinson)

La galerie PID[®], contient 136 alvéoles : 45 contiennent des substrats chromogéniques et fluorogéniques utilisés pour l'identification et deux contiennent des contrôles fluorescents. Elle est utilisée conjointement avec l'automate BD Phoenix[®] (figure 25) pour identifier les bactéries aérobies à Gram positif. Cet automate a une capacité de 100 galeries.

La préparation et la distribution de l'inoculum sont manuelles, contrairement au Vitek[®] 2 qui permet une inoculation automatique. Par contre, la faible densité de l'inoculum requise par le système Phoenix PID[®] (point 0,5 de l'échelle de MacFarland) est un avantage.

L'automate gère toutes les étapes de l'identification depuis l'incubation au rendu des résultats. La lecture ne peut être visuelle. Les résultats d'identification sont associés à un pourcentage de probabilité (51).

Le système possède une informatique gérant l'automate et connectable à une informatique centralisée.

A notre connaissance, aucune étude d'évaluation des performances d'identification des corynébactéries avec ce système n'a été publiée à ce jour.



Figure 25. Automate Phoenix[®] (d'après <http://www.bd.com>)

2.5.2.4. Carte Vitek[®] 2 ANC

La description du système a été abordée dans le chapitre 2.4.2.6.

Tableau V. Caractéristiques des systèmes commercialisés d'identification biochimique des bactéries anaérobies

	API 20 A®	AN MicroPlate®	Rapid ID 32 A®	RapID ANA II®	BD Crystal® ANR ID	MicroScan Rapid Anaerobe®	Vitek® 2 ANC
Fabricant (firme commerciale en France)	bioMérieux	Biolog (AES Chemunex)	bioMérieux	Remel (Oxoid)	BD Diagnostics	Siemens	bioMérieux
Conservation	2-8 °C	2-8 °C	2-8 °C	2-8 °C	2-8 °C	2-8 °C	2-8 °C
Milieux d'isolement (régénérés)	GS	Gélose Biolog Universal Anaerobe®	GS Columbia	GS, BHI, LD, TSA, PEA, EYA, PV, KV	GS : Brucella, CDC, Columbia, Schaedler	GS : TSA, Brucella, BHI, Columbia	GS : Columbia, CDC, Brucella, TSA
Inoculum (Mc Farland)	≥ 3	?	4	3	4 à 5	3 à 5	3
Nombre de tests	20	95	29	18	29	24	36
Conditions d'incubation	24h-48 h ; anaérobiose	20-24 h anaérobiose	4 h-4 h30 aérobie	4-6 h aérobie	4 h aérobie	4 h aérobie	6 h aérobie
Addition de réactifs avant lecture	Oui	Non	Oui	Oui	Non	Oui	Non
Caractères complémentaires requis pour l'interprétation	Morphologie, Gram, spores, catalase	Non	Non	Gram, morphologie	Gram, indole, catalase	Catalase	Morphologie, Gram, type respiratoire
Automatisation	Non	Lecture	Non ^a	Non	Lecture	Incubation, lecture	Inoculation, incubation, lecture
Base de données (2007)	52 taxons	361 taxons	80 taxons	98 taxons	108 taxons	54 taxons	52 taxons
Prix H.T. par test 2009 (€)	4,71	13,09	4,58	8,81	10,15	6,35	8,04

Gram : coloration de Gram ; ? : données absentes ; GS : gélose au sang ; BHI : Brain Heart Infusion ; LD : milieu Lombard-Dowell ; TSA : milieu trypticase soja ; PEA : milieu avec phényléthylalcool ; EYA : milieu enrichi au jaune d'oeuf ; PV : milieu à base de paromomycine/vancomycine ; KV : milieu à base de kanamycine/vancomycine ; CDC : milieu Centers for Disease Control and Prevention ;

^a Sauf si le laboratoire possède les semi-automates ATB Expression® ou mini-API®, la lecture peut être automatique

Tableau VI. Caractéristiques des systèmes commercialisés d'identification biochimique des corynébactéries

	API Coryne®	BD Crystal® GP	GP2 MicroPlate®	RapID CB Plus®	BD Crystal® RGP	Phoenix PID®	Vitek® 2 ANC
Fabricant (firme commerciale en France)	bioMérieux	BD Diagnostics	Biolog (AES Chemunex)	Remel (Oxoid)	BD Diagnostics	BD Diagnostics	bioMérieux
Conservation	2-8 °C	2-8 °C	?	2-8 °C	2-8 °C	15-25°C	2-8 °C
Milieux d'isolement	GS : TSA, Columbia, CNA	GS : TSA, Columbia, CNA, PEA	GS Biolog Universal Growth®	GS : TSA, Columbia, CNA, BHI	GS : TSA, Columbia, CNA, BHI	TSA ^a , GC, GS Columbia, CNA, PEA, BD CHROMagar® Orientation	Columbia, CNA, TSA
Inoculum (Mc Farland)	> 6	0,5	?	4	2	0,5	3
Nombre de tests	20	29	95	18	29	45	36
Temps d'incubation	24-48 h	18-24 h	4-24 h	4-6 h	4 h	2-6 h	6 h
Addition de réactifs avant lecture	Oui	Non	Non	Oui	Non	Non	Non
Caractères complémentaires requis pour l'interprétation	Catalase	Non	Non	Catalase, pigmentation jaune des colonies	Non	Non	Morphologie, Gram, type respiratoire
Automatisation	Non	Lecture	Incubation, lecture	Non	Lecture	Incubation, lecture	Inoculation, incubation, lecture
Base de données corynébactéries (2007)	31 taxons	17 taxons	99 taxons	39 taxons	10 taxons	24 taxons	11 taxons
Prix H.T. par test 2009 (€)	5,35	9,50	11,96	7,88	9,64	5,72	8,04

GS, TSA, CNA, PEA, ?, Gram : voir tableau V ; GC : gélose chocolat ; CNA : gélose Columbia avec 5% de sang de mouton, acide nalidixique et colistine

^a +/- sang, +/- lécithine et Tween 80

TRAVAIL EXPERIMENTAL

1. OBJECTIFS

Jusqu'à l'introduction de la carte Vitek® 2 ANC par la société bioMérieux, l'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries était peu automatisée. Préalablement à sa mise sur le marché en 2008, cette carte avait été évaluée par deux équipes nord-américaines (105, 106).

L'objectif de notre étude a été d'évaluer les performances de la carte Vitek® 2 ANC à partir de souches cliniques de bactéries anaérobies et de corynébactéries isolées dans deux CHU français avant sa mise sur le marché (104).

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Souches étudiées

Dans un premier temps, l'étude a porté sur 315 souches cliniques non consécutives, soit 261 souches de bactéries anaérobies et 54 souches de corynébactéries appartenant respectivement à 43 et dix taxons d'intérêt médical, inclus dans la base de données de la carte Vitek® 2 ANC.

- Les bactéries anaérobies ont été sélectionnées parmi les souches isolées au laboratoire de Bactériologie du CHU de Nancy entre janvier 2006 et décembre 2007, en tenant compte de leur fréquence d'isolement. L'origine des souches figure dans le tableau VII.

Tableau VII. Distribution des souches cliniques de bactéries anaérobies selon l'origine des prélèvements

Origine des prélèvements	Nombre de souches
Hémocultures	102
Système nerveux central	9
Pleuropulmonaire	11
Intra-abdominale	54
Tissus mous	29
Ostéoarticulaire	14
Génitale	11
Selles	20
Autres	11

- Les souches de corynébactéries ont été sélectionnées parmi une collection de souches cliniques du laboratoire de Bactériologie des Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, en tenant compte de la fréquence d'isolement et/ou du pouvoir pathogène des espèces (*C. diphtheriae*).

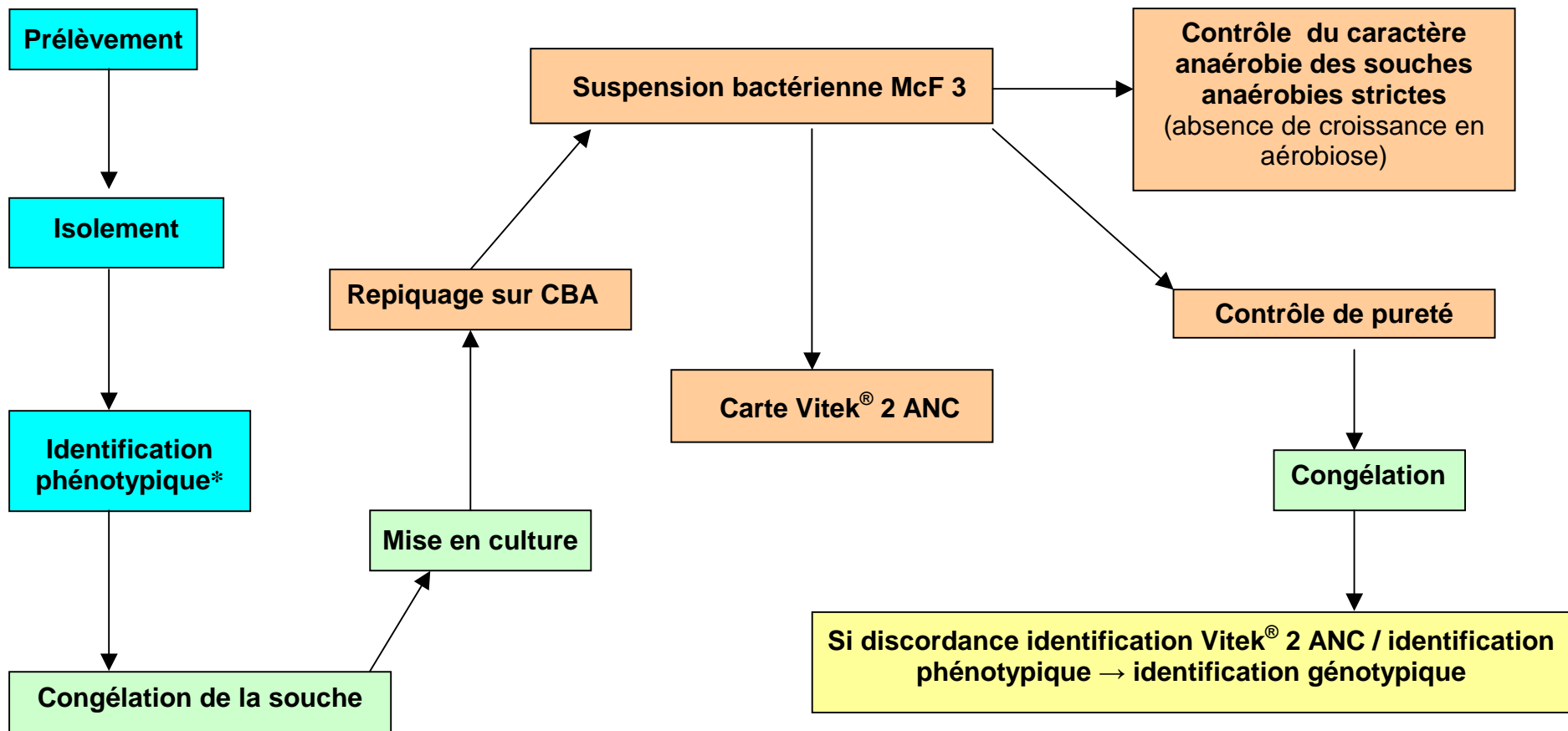
Trois souches de référence provenant de l'American Type Culture Collection, *Actinomyces israelii* ATCC 12102, *Propionibacterium acnes* ATCC 6919 et *Clostridium difficile* ATCC 9689 ont également été testées.

Les six souches de référence suivantes, utilisées comme contrôle de qualité, ont été testées à intervalles réguliers : *Bacteroides ovatus* ATCC BAA-1296, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Parabacteroides distasonis* ATCC BAA-1295, *Clostridium septicum* ATCC 12464, *Clostridium sordellii* ATCC 9714, *Corynebacterium striatum* ATCC BAA-1293.

Dans un deuxième temps, 19 souches appartenant à des espèces non revendiquées par la base de données de la carte Vitek[®] 2 ANC et isolées fréquemment dans notre laboratoire ont été testées : *Prevotella oris* (n=6), *Porphyromonas asaccharolytica* (n=1), *Actinomyces odontolyticus* (n=3), *Clostridium innocuum* (n=7), *Corynebacterium glucuronolyticum* (n=1), *Corynebacterium accolens* (n=1). Ces souches ont fait l'objet d'une identification phénotypique et génotypique (séquençage du gène codant l'ARNr 16S pour les bactéries anaérobies et du gène *rpoB* pour les corynébactéries).

Toutes les souches ont été conservées par congélation à -80°C avant d'être testées, à l'exception de celles isolées au cours de l'étude.

Le schéma général de l'expérience est illustré par la figure 26.



CBA : gélose Columbia au sang de mouton (bioMérieux®); McF : MacFarland

* Espèces non revendiquées : identification phénotypique + identification génotypique

Figure 26. Schéma général de l'expérience

2.2. Identification phénotypique

2.2.1. Bactéries anaérobies

Elle a été réalisée selon les méthodes utilisées en routine au laboratoire :

- Grâce à des tests d'identification présomptive :
 - aspect après coloration de Gram,
 - aspect des colonies,
 - présence de spores (clostridia),
 - mobilité,
 - production de catalase,
 - sensibilité à la vancomycine (5 µg), à la kanamycine (1000 µg), à la colistine (10 µg),
 - évaluation de la croissance en présence d'inhibiteurs tels que la bile (1 mg) et le vert brillant (100 µg) (bacilles à Gram négatif), et pour les cocci à Gram positif, sensibilité au polyanéthol sulfonate de sodium (1 mg).
- Puis par l'étude des caractères métaboliques réalisée dans la mesure du possible au moyen de galeries commercialisées :
 - fermentation des hydrates de carbone, hydrolyse de l'esculine (API 20 A[®]),
 - métabolisme protéique : recherche d'une nitrate réductase (bouillon, Rapid ID 32A[®]), hydrolyse de la gélatine (API 20 A[®]), production d'indole, (bouillon, Rapid ID 32A[®], Rapid ANA II[®])
 - métabolisme lipidique : production de lécithinase (figure 27) et/ou de lipase sur milieu gélosé au jaune d'œuf (*Clostridium*)
 - présence d'enzymes préformées (Rapid ID 32A[®], Rapid ANA II[®])



Figure 27. Souche productrice de lécithinase après culture sur gélose enrichie au jaune d'œuf (d'après <http://bacterioweb.univ-fcomte.fr>)

2.2.2. Corynébactéries

Toutes les souches testées ont été identifiées avec la galerie API Coryne[®] (bioMérieux).

Des tests et des techniques complémentaires ont permis d'affirmer l'identification des souches appartenant aux espèces revendiquées par la base de données de la carte :

- Toutes les souches du genre *Corynebacterium* ont été identifiées par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight), en référence avec les souches types de chacune des espèces
- Les souches des espèces *C. ulcerans*, *C. jeikeium* et *C. minutissimum* ont été analysées par hybridation ADN/ADN vis-à-vis des souches types
- Les souches de *C. diphtheriae* ont été analysées par ribotypage et électrophorèse en champ pulsé
- Les souches de *C. amycolatum* ont été analysées par HPLC afin de confirmer l'absence d'acides mycoliques
- Une réaction de Camp test reverse positive a été observée avec les souches d'*Arcanobacterium haemolyticum*.

2.3. Identification au moyen de la carte Vitek[®] 2 ANC

Procédure :

Les souches testées ont été repiquées sur gélose Columbia additionnée de sang de mouton (bioMérieux), une fois si elles étaient isolées au cours de l'étude, deux fois si elles étaient conservées à -80°C. Ces milieux ont été incubés à 35°C-37°C, en anaérobiose pour les bactéries anaérobies (24 à 72 h en fonction de la croissance bactérienne) et 24 h en atmosphère enrichie en 10 % de CO₂ pour les corynébactéries. Afin de s'assurer de la pureté des souches, les cultures ont été observées au stéréomicroscope et une coloration de Gram à été effectuée.

Une suspension bactérienne a été ensuite réalisée à partir de la culture, dans une solution saline stérile (0,45 % à 0,50 % de NaCl, pH 4,5 à 7,0) distribuée dans un tube en plastique transparent, et l'opacité de l'inoculum a été ajustée au point trois de l'échelle de MacFarland (2,7-3,3) au moyen du Densichek[®]. Les code à barres des cartes utilisées ont été scannés et les tubes identifiés grâce à la Station Compacte Satellite[®] ; chaque carte a ensuite été placée dans une cassette, à côté du tube approprié de façon à ce que le tube de transfert de la carte plonge dans la suspension bactérienne. Les cassettes ont été introduites dans le Vitek[®] 2 dans les 30 minutes suivant la préparation des suspensions bactériennes (recommandation du fabricant). Une fois le chargement reconnu par l'automate, une brève alarme sonore se déclenche. Le type respiratoire, l'aspect après coloration de Gram et la morphologie ont alors été renseignés dans l'ordinateur associé au Vitek[®] 2 pour chaque souche à identifier, au moyen des caractères « + », « - » ou « ? ». Après six heures, les résultats d'identification étaient disponibles et dans le cas de faibles discriminations, les tests complémentaires proposés ont été effectués.

Contrôle de pureté : à partir de chaque suspension bactérienne utilisée, ont été ensemencées :

- pour les bactéries anaérobies, deux géloses Columbia au sang de mouton. Une boîte a été incubée en anaérobiose, l'autre en aérobiose. La pureté de l'échantillon a été vérifiée après 48 à 72 h d'incubation à 35°C par l'absence de croissance en aérobiose et la présence d'une culture pure en anaérobiose.
- pour les corynébactéries, une gélose Columbia au sang de mouton incubée 48 heures dans une atmosphère enrichie en 10 % de CO₂.

La pureté des cultures a été vérifiée dans les deux cas par observation de l'homogénéité des colonies et coloration de Gram.

2.4. Identification bactérienne par séquençage de l'ADN

Dans un premier temps, le séquençage a été réalisé sur les souches appartenant aux espèces revendiquées par la base de données et dont les résultats d'identification obtenus par la carte Vitek[®] 2 ANC et les tests phénotypiques de routine étaient discordants. Il s'agissait de huit souches de bactéries anaérobies pour lesquelles nous avons déterminé la séquence d'une portion du gène codant l'ARN ribosomique (ARNr) 16S, et d'une souche appartenant au genre *Corynebacterium*, pour laquelle la séquence de l'ADNr 16S n'était pas suffisamment discriminante. Le séquençage d'un fragment du gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase a donc également été réalisé pour cette souche.

Dans un deuxième temps, les 19 souches n'appartenant pas aux espèces revendiquées par la base de données de la carte Vitek[®] 2 ANC ont fait l'objet d'un séquençage pour confirmer l'identification phénotypique : séquençage du gène codant l'ARNr 16S pour les bactéries anaérobies et du gène *rpoB* pour les espèces du genre *Corynebacterium*.

2.4.1. Principe du séquençage (116)

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

Le séquençage de l'ADN bactérien comprend plusieurs étapes (figure 28) :

Extraction du matériel génétique à partir des cellules bactériennes.

Amplification du gène cible par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Pour l'identification d'espèce bactérienne, le gène le plus fréquemment utilisé est celui codant l'ARNr 16S qui, associé à 21 protéines ribosomiques, constitue la petite sous-unité 30S du ribosome bactérien. Ce gène, d'environ 1550 paires de bases (pb), est une bonne cible pour l'identification bactérienne (44, 117), car il est spécifiquement bactérien, présent chez toutes les bactéries et constitue un bon marqueur de l'évolution. Il est composé de domaines hautement conservés permettant l'utilisation d'amorces universelles, entourant des domaines

variables en fonction des espèces. L'utilisation d'amorces universelles permet d'identifier la grande majorité des bactéries. Il a été rapporté que le séquençage des 500 premières pb de ce gène était suffisant pour une identification satisfaisante de la plupart des espèces bactériennes isolées en clinique (117, 118).

Cependant, le gène de l'ARNr 16S n'est parfois pas suffisamment discriminant pour permettre l'identification de certaines espèces, notamment du genre *Corynebacterium*. Un autre gène cible ayant une séquence plus polymorphe est donc nécessaire. Khamis et coll. (119) ont montré que le séquençage d'une région hautement polymorphe (environ 440 pb) du gène *rpoB* entourée de séquences conservées permettait une meilleure différenciation de ces espèces. Dans cette étude, le pourcentage d'homologie le plus élevé entre deux espèces était de 95,9 %, alors qu'il est de 99,7 % pour le gène entier de l'ARNr 16S (119).

Mise en évidence du produit PCR par migration électrophorétique en gel d'agarose et vérification que les fragments amplifiés aient la taille attendue.

Purification du produit PCR pour éliminer l'excès d'amorces et de nucléotides qui pourraient interférer avec les réactions suivantes.

Dosage de l'ADN amplifié.

La pureté et la concentration en ADN sont évaluées en mesurant la densité optique (DO) à des longueurs d'ondes de 260 et 280 nm et en déterminant le rapport de DO 260/280. La mesure de DO à 260 nm permet de calculer la concentration en ADN, d'après la loi de Beer-Lambert. Une DO égale à un signifie que la concentration en ADN est de 50 µg/mL, l'idéal étant d'obtenir une concentration en ADN comprise entre 20 et 60 µg/mL. Un rapport DO_{260} / DO_{280} inférieur à 1,7 signifie que l'échantillon est probablement contaminé par des protéines et un rapport supérieur à 2,0 signifie que l'échantillon est probablement contaminé par de l'ARN.

Deuxième étape de PCR permettant le séquençage des deux brins d'ADN.

Le produit PCR purifié est utilisé comme point de départ. Les séquences sens et antisens sont amplifiées au cours de deux réactions séparées. Le mélange réactionnel comprend notamment la Taq polymérase, l'amorce sens ou antisens, les quatre désoxynucléotides ou dNTPs (dATP, dGTP, dCTP et dTTP) et les quatre didésoxyribonucléotides ou ddNTPs marqués par un fluorophore (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP). Au cours de la réaction de PCR, l'ADN polymérase ajoute le nucléotide complémentaire au brin matrice qui peut être soit un dNTP, soit un ddNTP. S'il s'agit d'un ddNTP, l'élongation de l'ADN est stoppée car ce nucléotide ne possède plus le site hydroxyle nécessaire à la liaison du nucléotide suivant. Ce choix étant aléatoire, chaque base de l'ADN matrice aura statistiquement vu un certain nombre de fois l'incorporation d'un ddNTP. Ainsi, le milieu réactionnel contient l'ensemble des molécules néosynthétisées possibles.

Purification des brins d'ADN à séquencer.

Le principe repose sur la précipitation à froid de l'ADN en présence d'éthanol et permet d'éliminer l'excédent d'amorces, les dNTPs ou les ddNTPs marqués non incorporés.

Electrophorèse de l'ADN en capillaire dans un séquenceur.

Dans un séquenceur automatique, les fragments d'ADN dénaturés sont séparés en fonction de leur taille dans un gel d'électrophorèse capillaire. A la sortie du capillaire, un laser excite les molécules et une caméra récupère les rayons émis. Chaque ddNTP étant marqué par un fluorophore différent, la dernière base de chaque fragment, du plus petit (premier nucléotide

de la matrice) au plus grand (dernier nucléotide de la matrice), peut être déterminée. On peut ainsi reconstituer la séquence du gène à partir d'un électrophorégramme, tracé de détection des fragments dans l'ordre où ils sont élués par la colonne, où chaque base est représentée par une couleur différente.

Les séquences complémentaires d'un gène, sens et antisens, sont séquencées séparément.

Analyse et interprétation des séquences obtenues.

Les séquences sens et antisens sont ensuite alignées grâce à un logiciel permettant l'obtention d'une séquence consensus des deux brins d'ADN. Celle-ci est ensuite comparée aux banques de séquences. Parmi ces bases de données accessibles gratuitement sur internet, la plus connue et la plus complète est la GenBank[®] (120) qui comprend plus de 50 millions de séquences déposées (eucaryotes, procaryotes...) dont plus de 900 000 concernent le gène de l'ARNr 16S. Il existe également des bases de données spécialisées comme BIBI (Bio Informatic Bacterial Identification[®]) (121), ou RDP (Ribosomal Database Project[®]) (122). Cette dernière ne répertorie que les séquences ribosomiques et ne concerne donc pas le gène *rpoB*.

Aujourd'hui, il n'existe pas de consensus sur le seuil de définition d'un genre ou d'une espèce par comparaison des séquences du gène de l'ARNr 16S (117). Ceci est dû en partie à l'hétérogénéité des méthodes utilisées dans les différentes études (bases de données différentes, utilisation de fragments de 500 ou 1500 bp, programme utilisé pour les calculs). Couramment, un seuil d'au moins 99 % d'homologie avec les séquences d'une base de données est utilisé pour définir une espèce et un seuil d'au moins 95 % d'homologie pour définir un genre (117, 123), mais ces taux ne peuvent s'appliquer à tous les groupes bactériens et doivent être adaptés à chaque situation.

En ce qui concerne les comparaisons des séquences du gène *rpoB*, Khamis et coll. (119) préconisent de définir une espèce en utilisant un seuil de 96,6 % d'homologie.

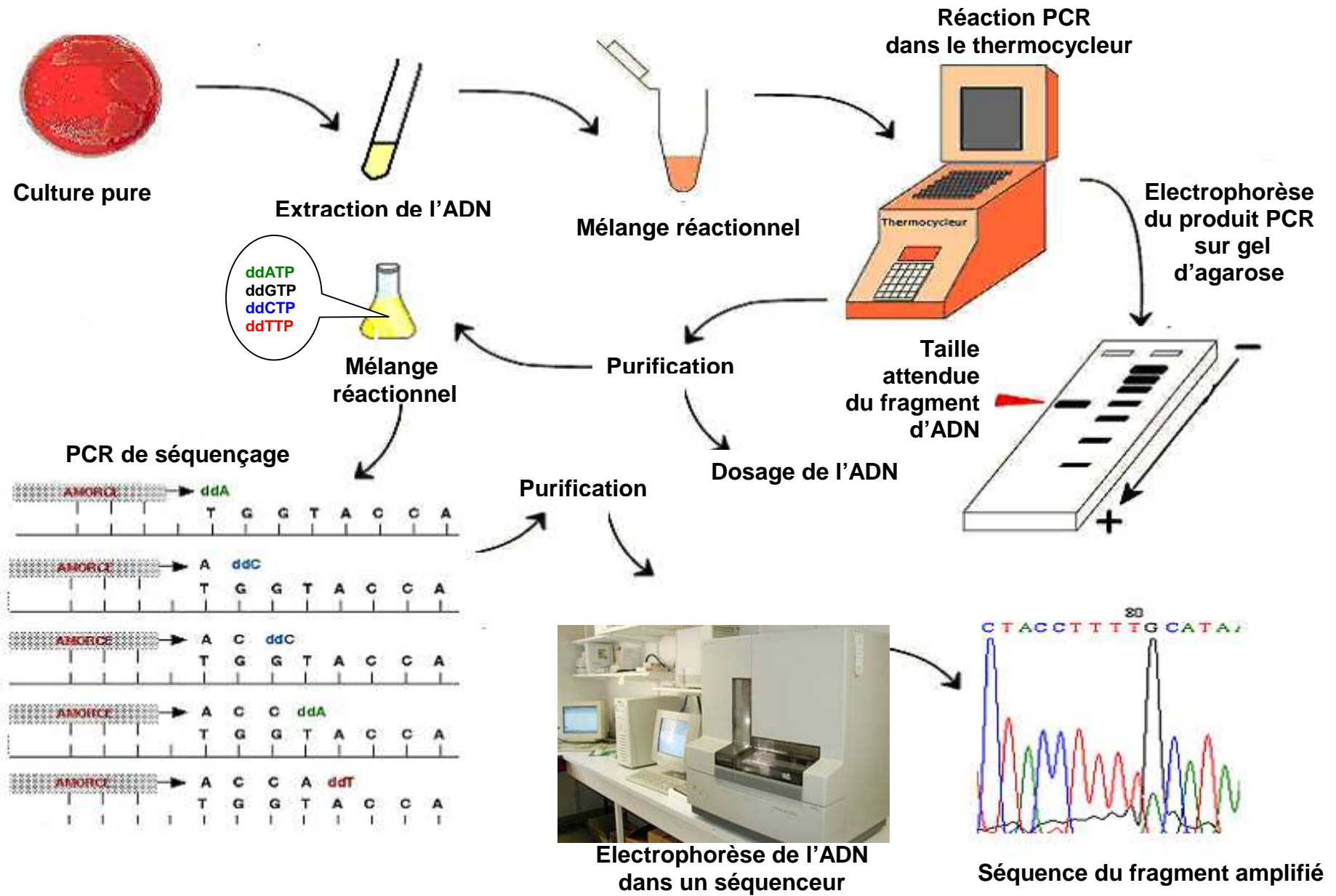


Figure 28. Etapes du séquençage de l'ADN bactérien

2.4.2. Méthode de séquençage utilisée

Avant extraction, la pureté de la souche a été contrôlée par observation de l'homogénéité des colonies et examen au microscope après coloration de Gram.

Concernant les souches revendiquées et donnant des résultats discordants entre l'identification de routine du laboratoire et l'identification par la carte Vitek[®] 2 ANC, l'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée avec le QIAamp DNA Mini kit[®] selon les recommandations du fabricant (QIAGEN[®]).

Concernant les 19 souches non revendiquées par la base de données, l'extraction de l'ADN bactérien a été réalisée par choc thermique : une quantité de colonies représentant environ la moitié d'une oese de 10 µL a été mise en suspension dans 1 mL d'eau pour biologie moléculaire. Cette suspension a été soumise à de brusques variations de températures engendrant l'éclatement des bactéries: cinq minutes à 100 °C puis à - 80°C, suivi de quatre cycles alternant 1 min 30 s à 100 °C et à - 80 °C.

La suspension a ensuite été centrifugée cinq minutes à 10 000 tours/minute. L'ADN extrait a été récupéré dans le surnageant et conservé à -80°C.

Les tableaux VIII, IX et X présentent les couples d'amorces, la composition des mélanges réactionnels et les programmations du thermocycleur (Biometra[®], LabGene Scientific Instruments[®]) utilisés pour les PCR d'amplification.

Un témoin positif contenant 2 µL d'ADN d'une souche de référence a permis de valider le bon fonctionnement de la réaction de PCR. Un témoin négatif contenant 2 µL d'eau a permis de valider l'absence de contamination de la PCR par de l'ADN bactérien environnemental.

Les produits de PCR ont été mis en évidence par électrophorèse sur gel d'agarose préparé extemporanément en ajoutant à 1,5 % d'agarose dans du tampon Tris-Borate-EDTA (Ethylene-Diamine Tetra-acetic Acid) ou TBE 1X. Les échantillons (5 µL) et un marqueur de poids moléculaire (5 µL) ont été déposés dans les puits en ajoutant une solution de charge (4 µL). La migration s'est effectuée à 100 Volts, 200 mA, pendant 40 minutes. Le gel a été révélé dans un bain à 0,005 % de bromure d'éthidium pendant 20 minutes. Au produit de PCR attendu correspond une bande fluorescente à 1500 pb pour l'ADNr 16S ou à 450 pb pour le gène *rpoB* (figure 29).

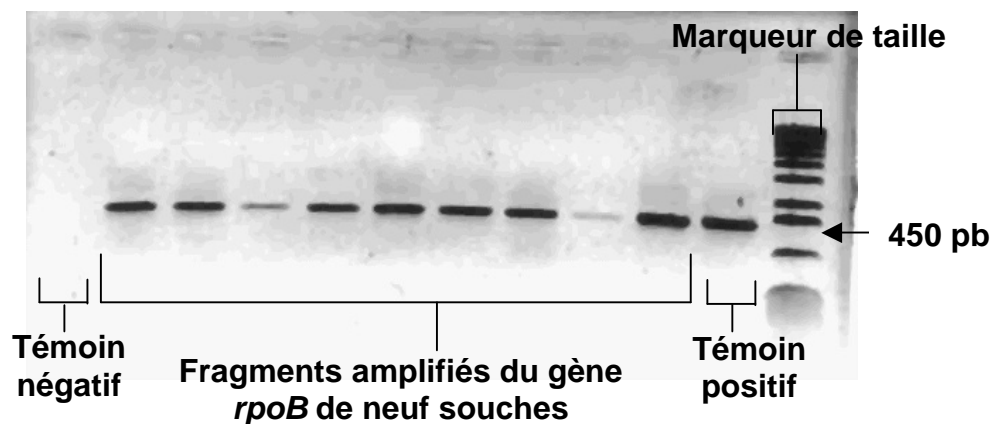


Figure 29. Photographie d'un gel d'agarose où ont migré les fragments amplifiés du gène *rpoB* de neuf souches (donnée personnelle)

Tableau VIII. Couples d'amorces utilisées pour les PCR d'amplification du gène codant l'ARNr 16S et du gène *rpoB*

Gène cible	Couple d'amorces	Séquences nucléotidiques	Taille (pb)	Référence
Gène de l'ARNr 16S	P8/P1525	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	Environ 1500	124
<i>rpoB</i>	C2700F/C3130R	5'-CGWATGAACATYGGBCAGGT-3' 5'-TCCATYTCRCCRAARCGCTG -3'	Environ 450	119

Tableau IX. Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les PCR d'amplification du gène codant l'ARNr 16S et du gène *rpoB*

Réactifs		Gène de l'ARNr 16S	Gène <i>rpoB</i>
		Volume pour une réaction (µL)	
H ₂ O		37,6	37,6
Tampon de PCR 10X		5,0	5,0
MgCl ₂ (50 mM)		2,0	3,0
dNTPs (10 mM)		1,0	1,0
Amorce sens	P8 (40 µM)	1,0	-
	C2700 (10 µM)	-	0,5
Amorce antisens	P1525 (40 µM)	1,0	-
	C3130 (10 µM)	-	0,5
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 U/µL)		0,4	0,4
ADN extrait		2,0	2,0

Tableau X. Programmations du thermocycleur utilisées pour les PCR d'amplification du gène codant l'ARNr 16S et du gène *rpoB*

Étapes	Gène de l'ARNr 16S			Gène <i>rpoB</i>		
	Température	Durée	Nombre de cycles	Température	Durée	Nombre de cycles
Pré-dénaturation	94°C	5 min	1	94°C	5 min	1
Dénaturation	94°C	1 min	30	94°C	30 s	35
Hybridation	65°C	1 min		55°C	30 s	
Elongation	72°C	1 min		72°C	2 min	
Extension	72°C	5 min	1	72°C	5 min	1

L'ADN a ensuite été purifié avec le QIAquick PCR Purification Kit[®] selon les recommandations du fabricant (QIAGEN[®]) puis dosé avec le spectrophotomètre GeneQuant pro[®].

Les tableaux XI, XII et XIII présentent les couples d'amorces, la composition des mélanges réactionnels et les programmations du thermocycleur (Biometra[®], LabGene Scientific Instruments[®]) utilisés pour les PCR de séquençage.

Tableau XI. Couples d'amorces utilisées pour les PCR de séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène *rpoB*

Gène cible	Couple d'amorces	Séquences nucléotidiques	Taille (pb)	Référence
Gène de l'ARNr 16S	P8/P519	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 5'-GTATTACCGCGGCTGCTGGCAC-3'	Environ 500	124
<i>rpoB</i>	C2700F/C3130R	5'-CGWATGAACATYGGBCAGGT-3' 5'-TCCATYTCRCCRAARCGCTG-3'	Environ 450	119

Tableau XII. Composition des mélanges réactionnels utilisés pour les PCR de séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène *rpoB*

Réactifs		Gène de l'ARNr 16S		Gène <i>rpoB</i>	
		P8	P519	C2700F	C3130R
Volume pour une réaction (µL)					
Solution Ready Mix [®] (Big Dye [®] Sequencing, Applera [®])		2,0	2,0	4,0	4,0
Tampon de PCR 5X		1,0	1,0	2,0	2,0
Produit PCR		0,75	1,5	6,0	6,0
Amorce sens	P8 (1 µM)	1,6	-	-	-
	C2700 (1 µM)	-	-	3,2	-
Amorce antisens	P519 (1 µM)	-	1,6	-	-
	C3130 (1µM)	-	-	-	4,8
H ₂ O qsp 20µL		4,65	3,9	4,8	3,2

Tableau XIII. Programmations du thermocycleur utilisées pour les PCR de séquençage du gène codant l'ARNr 16S et du gène *rpoB*

Etapas	Gène de l'ARNr 16S			Gène <i>rpoB</i>		
	Température	Durée	Nombres de cycles	Température	Durée	Nombres de cycles
Dénaturation	96°C	10 s	25	96°C	10 s	25
Hybridation	60°C	5 s		55°C	5 s	
Elongation	60°C	4 min		60°C	4 min	

L'ADN a ensuite été purifié : 2 µL d'acétate de sodium, 2 µL d'EDTA, 50 µL d'éthanol à 95° et 20 µL de produit de PCR ont été mélangés dans un tube réfrigéré. Après 15 minutes dans de la glace, le tube a été centrifugé à 13000 g pendant 20 min à 12°C. Le surnageant a été éliminé à la pipette. Le culot d'ADN a été rincé avec 250 µL d'éthanol à 70° ensuite éliminé après centrifugation à 13000 g pendant 10 minutes à 4°C. L'ADN a ensuite été séché et conservé à 4°C à l'obscurité en attendant le séquençage.

Avant électrophorèse, les molécules d'ADN ont été dénaturées dans 5 µL de formamide puis déposées dans les puits d'une microplaque à 96 puits. Le séquenceur utilisé pour l'électrophorèse était un ABI-PRISM 3100[®] (Applied Biosystems[®]) avec des capillaires en verre de 36 cm permettant d'analyser des séquences d'environ 500 pb. Les données ont été récupérées par le logiciel Sequencing Analysis[®] (version 5.1.1, Applied Biosystems[®]), permettant l'édition d'un électrophorégramme. Les séquences ont ensuite été analysées avec le logiciel SeqScape[®] (version 2.5, Applied Biosystems[®]) puis comparées aux bases de données GenBank[®] et Ribosomal Database Project II[®] (uniquement pour les séquences d'ADNr 16S) afin d'identifier l'espèce bactérienne.

Concernant les comparaisons des séquences du gène de l'ARNr 16S, les seuils de similarité retenus après revue de la littérature étaient : supérieur à 99 % d'homologie avec les séquences des bases de données pour définir une espèce, et supérieur à 97 % pour définir un genre (125), tout en les adaptant en fonction des groupes bactériens.

En ce qui concerne les comparaisons des séquences du gène *rpoB*, nous avons utilisé un seuil de 96,6 % d'homologie pour définir une espèce comme préconisé par Khamis et coll. (119).

3. RESULTATS

Les six souches de référence utilisées comme contrôles de qualité ont été correctement identifiées (obtention de résultats reproductibles et en accord avec la base de données établie par le fabricant). Toutes ont été identifiées avec un niveau de confiance « excellent », sauf la souche de *Parabacteroides distasonis* qui, lors d'un seul contrôle, a été identifiée avec un niveau de confiance « très bon » (probabilité d'identification correcte : 95 %).

Les trois autres souches de référence ont été également correctement identifiées, avec un niveau de confiance « excellent ».

Concernant les souches appartenant à des taxons inclus dans la base de données (tableaux XIV, XV et XVI), la carte Vitek[®] 2 ANC a permis l'identification correcte sans recours à des tests additionnels de 311 parmi 315 (98,7 %) souches testées au niveau du genre et, au niveau de l'espèce, de 270 parmi 305 (88,5 %) souches testées appartenant à des genres différents de *Bifidobacterium* et *Veillonella* (pour lesquels la carte Vitek 2[®] ANC revendique l'identification au niveau du genre). 24 souches (7,6 %) ont été identifiées avec une faible discrimination mais l'espèce correcte figurait parmi la liste de choix (tableau XVII). Après l'application des tests additionnels recommandés par le fabricant, 94,1 % (287/305) des souches testées ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce. Deux souches (0,6 %) n'ont pas été identifiées. Neuf souches (2,9 %) ont été incorrectement identifiées et parmi celles-ci, seules deux souches n'ont pas été identifiées correctement au niveau du genre (tableau XVIII). Les niveaux de confiance ayant souvent été « excellents » ou « très bons », ce paramètre n'a pas amené à suspecter les erreurs.

Parmi les 116 souches de **bacilles à Gram négatif anaérobies** testées, 109 (94 %) ont été correctement identifiées sans avoir recours à des tests additionnels. Trois souches (deux *P. bivia* et un *F. nucleatum*) identifiées initialement avec une faible discrimination ont été

correctement identifiées après application des tests recommandés par le fabricant. Ceci a permis d'obtenir un taux final d'identification correcte de 96,5 % (112/116). Quatre souches (trois appartenant au genre *Prevotella* et une au genre *Bacteroides*) ont été identifiées correctement au niveau du genre mais l'identification au niveau de l'espèce a été incorrecte.

Parmi les **cocci anaérobies**, les cinq souches de *Veillonella* et toutes les souches de cocci à Gram positif testées ont été correctement identifiées respectivement au niveau du genre et de l'espèce.

Parmi les 46 souches de **bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés** testées, 44 (95,7 %) ont été identifiées correctement sans avoir recours à des tests additionnels. Deux souches (parmi trois testées) de *P. granulosum* ont été identifiées comme appartenant à l'espèce *C. difficile*.

Parmi les 70 souches de **Clostridia** testées, deux souches de *C. bifermentans* n'ont pas été identifiées, une souche de *C. difficile* et une souche de *C. tertium* ont été incorrectement identifiées tandis que 45 souches (64,3 %) ont été correctement identifiées sans avoir recours à des tests complémentaires. Parmi les 21 souches identifiées initialement avec une faible discrimination, 14 ont été correctement identifiées après application des tests recommandés par le fabricant, ce qui correspond à un taux d'identification correcte de 84,3 %.

Concernant quatre souches de *C. butyricum* identifiées initialement avec une faible discrimination (*C. butyricum* – *C. clostridioforme*), l'application du test de la nitrate réductase recommandé par le fabricant a permis d'obtenir une identification correcte avec un niveau de confiance de 90 %. Toutefois, selon le fabricant, 10 % des souches de *C. clostridioforme* ne produisent pas cette enzyme, donc en présence d'une réaction négative, il était impossible de conclure. Une simple coloration de Gram nous a permis de confirmer l'identification de *C. butyricum* qui se présente sous la forme d'un bacille à Gram positif formant des spores subterminales, et d'exclure l'identification de *C. clostridioforme* qui apparaît comme un bacille à Gram négatif en forme de cigare. De même, une simple coloration de Gram nous a permis de confirmer l'identification d'une souche de *C. butyricum* identifiée initialement avec une faible discrimination (*C. butyricum*, *C. clostridioforme*, *C. bifermentans*). En effet, le test de la lécithinase proposé par le fabricant ne permettait pas de différencier *C. butyricum* de *C. clostridioforme*, car parmi les trois espèces proposées, seule *C. bifermentans* produit une lécithinase. Concernant deux souches de *C. difficile* identifiées avec un faible niveau de discrimination (*C. difficile*-*C. subterminale*-*C. sporogenes*), le seul test de la lipase préconisé par le fabricant ne permettait pas de différencier *C. difficile* de *C. subterminale* car ces deux espèces ne produisent pas de lipase. L'étude de la fermentation du glucose et du mannitol nous a permis de confirmer l'identification de *C. difficile*. Si ces tests (coloration de Gram pour l'identification de *C. butyricum*, fermentation du glucose et du mannitol pour celle de *C. difficile*) avaient été proposés par le fabricant, le système aurait permis l'identification de 94,3 % des souches de clostridia testées à l'aide de tests additionnels.

Parmi les 54 souches de ***Corynebacterium spp.*** et ***Arcanobacterium spp.***, 53 (98,1 %) ont été identifiées correctement sans avoir recours à des tests additionnels. Une souche de *C. striatum* a été incorrectement identifiée (*C. minutissimum*) et son identification a été confirmée par le séquençage du gène *rpoB*, le séquençage du gène codant l'ARNr 16S n'ayant pas permis de différencier *C. striatum* de *Corynebacterium simulans*.

Concernant les souches appartenant à des espèces non revendiquées par la base de données (tableau XIX), toutes les souches anaérobies ont été correctement identifiées au niveau du genre sauf la souche appartenant à l'espèce *Porphyromonas asaccharolytica*. Pour les deux souches de corynébactéries testées, une souche a donné lieu à une identification incorrecte au niveau du genre et la seconde n'a pas été identifiée.

Tableau XIV. Identification des 261 souches cliniques de bactéries anaérobies avec la carte Vitek® 2 ANC

Organismes	Nombre de souches (%) ayant été :					
	Testées	Correctement identifiées	Identifiées avec faible discrimination	Incorrectement identifiées	Correctement identifiées après tests additionnels	Non identifiées
<i>Bacteroides</i> spp.	61	60 (98,4)	0 (0,0)	1 (1,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Bacteroides</i> du groupe <i>fragilis</i>	55	54	0	1	0	0
<i>Bacteroides caccae</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Parabacteroides distasonis</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Bacteroides fragilis</i>	20	20	0	0	0	0
<i>Bacteroides ovatus</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	14	13	0	1	0	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Bacteroides vulgatus</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Prevotella</i> spp.	36	31 (86,1)	2 (5,6)	3 (8,3)	2 (5,6)	0 (0,0)
<i>Prevotella bivia</i>	10	7	2	1	2	0
<i>Prevotella buccae</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Prevotella disiens</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Prevotella intermedia</i>	5	4	0	1	0	0
<i>Prevotella melaninogenica</i>	6	5	0	1	0	0
<i>Prevotella oralis</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Fusobacterium</i> spp.	19	18 (94,7)	1 (5,3)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)
<i>Fusobacterium mortiferum</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	12	11	1	0	1	0
<i>Fusobacterium varium</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Veillonella</i> spp.	5	5 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Cocci à Gram positif	24	24 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Finegoldia magna</i>	5	5	0	0	0	0

Organismes	Nombre de souches (%) ayant été :					
	Testées	Correctement identifiées	Identifiées avec faible discrimination	Incorrectement identifiées	Correctement identifiées après tests additionnels	Non identifiées
<i>Parvimonas micra</i>	10	10	0	0	0	0
<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	5	5	0	0	0	0
Bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés	46	44 (95,7)	0 (0,0)	2 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Actinomyces israelii/gerencseriae</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Actinomyces meyeri</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> spp.	5	5	0	0	0	0
<i>Eggerthella lenta</i>	11	11	0	0	0	0
<i>Eubacterium limosum</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Propionibacterium acnes</i>	20	20	0	0	0	0
<i>Propionibacterium granulosum</i>	3	1	0	2	0	0
Bacilles à Gram positif sporulés	70	45 (64,3)	21 (30)	2 (2,9)	14 (20)	2 (2,9)
<i>Clostridium bifermentans</i>	2	0	0	0	0	2
<i>Clostridium butyricum</i>	5	0	5	0	0	0
<i>Clostridium cadaveris</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Clostridium clostridioforme</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Clostridium difficile</i>	20	7	12	1	10	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	3	3	0	0	0	0
<i>Clostridium perfringens</i>	10	10	0	0	0	0
<i>Clostridium ramosum</i>	5	4	1	0	1	0
<i>Clostridium septicum</i>	1	1	0	0	0	0
<i>Clostridium sordellii</i>	2	2	0	0	0	0
<i>Clostridium sporogenes</i>	4	1	3	0	3	0
<i>Clostridium tertium</i>	6	5	0	1	0	0
Total	261	227 (87)	24 (9,2)	8 (3,1)	17 (6,6)	2 (0,8)

Tableau XV. Identification des 54 souches cliniques de corynébactéries avec la carte Vitek® 2 ANC

Organismes	Nombre de souches (%) ayant été :					
	Testées	Correctement identifiées	Identifiées avec faible discrimination	Incorrectement identifiées	Correctement identifiées après tests additionnels	Non identifiées
<i>Corynebacterium</i> spp.	46	45 (97,8)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	8	8	0	0	0	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	8	8	0	0	0	0
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	4	4	0	0	0	0
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Corynebacterium striatum</i>	5	4	0	1	0	0
<i>Corynebacterium ulcerans</i>	5	5	0	0	0	0
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	6	6	0	0	0	0
<i>Arcanobacterium</i> spp.	8	8 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>	7	7	0	0	0	0
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1	1	0	0	0	0
Total	54	53 (98,1)	0 (0,0)	1 (1,9)	0 (0,0)	0 (0,0)

Tableau XVI : Performances de la carte Vitek® 2 ANC

Groupe bactérien	Nombre de souches testées	Identification (%)					
		Correcte au genre	Correcte à l'espèce	Avec FD	Incorrecte	Correcte après TA	Absente
Anaérobies	261	99,2	87,0	9,2	3,1	93,5	0,8
BGN	116	100	94,0	2,6	3,4	96,5	0,0
Cocci	29	100	100	0,0	0,0	100	0,0
BGPNS	46	95,7	95,1	0,0	4,3	95,7	0,0
Clostridia	70	100	64,3	30,0	2,9	84,3	2,9
<i>Corynebacterium spp.</i> et <i>Arcanobacterium spp.</i>	54	100	98,1	0,0	1,9	98,1	0,0
Total	315	98,7	88,5	7,6	2,9	94,1	0,6

FD : faible discrimination ; TA : tests additionnels ; BGN : bacilles à Gram négatif ; BGPNS : bacilles à Gram positif non sporulés

 Taux d'identification correcte ≥ 95 %

 Taux d'identification correcte ≥ 90 %

Tableau XVII : Souches identifiées avec une faible discrimination par le système Vitek® 2 ANC

Résultats Vitek® 2 ANC (nombre de souches)	Tests additionnels proposés par le fabricant	Résultats ^a après tests additionnels	
		Attendus	Obtenus
<i>P. bivia</i> ^b - <i>P. melaninogenica</i> (2)	Saccharose	<i>P. bivia</i> (-), <i>P. melaninogenica</i> (+)	-
<i>F. nucleatum</i> ^b - <i>F. varium</i> (1)	Coloration de Gram	Extrémités effilées : <i>F. nucleatum</i> (+), <i>F. varium</i> (-)	Extrémités effilées +
<i>C. butyricum</i> ^b - <i>C. clostridioforme</i> (4)	Nitrate réductase	<i>C. butyricum</i> (-), <i>C. clostridioforme</i> (+)	-
<i>C. butyricum</i> ^b - <i>C. clostridioforme</i> - <i>C. bifermentans</i> (1)	Lécithinase	<i>C. bifermentans</i> (+), autres espèces (-)	-
<i>C. difficile</i> ^b - <i>C. bifermentans</i> - <i>C. sporogenes</i> (10)	Indole	<i>C. bifermentans</i> (+), autres espèces (-)	-
	Lipase	<i>C. sporogenes</i> (+), autres espèces (-)	-
<i>C. difficile</i> ^b - <i>C. subterminale</i> - <i>C. sporogenes</i> (2)	Lipase	<i>C. sporogenes</i> (+), autres espèces (-)	-
<i>C. ramosum</i> ^b - <i>C. paraputrificum</i> (1)	Mannitol	<i>C. ramosum</i> (+), <i>C. paraputrificum</i> (-)	+
<i>C. sporogenes</i> ^b - <i>C. bifermentans</i> (2)	Lipase	<i>C. sporogenes</i> (+), <i>C. bifermentans</i> (-)	+
<i>C. sporogenes</i> ^b - <i>C. subterminale</i> (1)	Lipase	<i>C. sporogenes</i> (+), <i>C. subterminale</i> (-)	+

^a + : positif ; - : négatif. ^b Identification de référence

Tableau XVIII. Souches incorrectement identifiées par le système Vitek 2[®] ANC

Résultats de l'identification		
Phénotypique de routine	Carte Vitek[®] 2 ANC (niveau d'identification)	Génotypique
<i>B. thetaiotaomicron</i>	<i>B. ovatus</i> (B)	<i>B. thetaiotaomicron</i>
<i>P. bivia</i>	<i>P. melaninogenica</i> (TB)	<i>P. bivia</i>
<i>P. intermedia</i>	<i>P. disiens</i> (Ex)	<i>P. intermedia</i>
<i>P. melaninogenica</i>	<i>P. bivia</i> (Ex)	<i>P. melaninogenica</i>
<i>P. granulosum</i>	<i>C. difficile</i> (Ex)	<i>P. granulosum</i>
<i>P. granulosum</i> ⁽¹⁾	<i>C. difficile</i> (B) <i>C. minutissimum/C. pseudodiphtheriticum</i> (FD)	<i>P. granulosum</i>
<i>C. difficile</i>	<i>C. sporogenes</i> (Ex)	<i>C. difficile</i>
<i>C. tertium</i>	<i>C. baratii</i> (Acc)	<i>C. tertium</i>
<i>C. striatum</i>	<i>C. minutissimum</i> (Ex)	<i>C. striatum</i>

Ex : excellente identification ; TB : très bonne identification ; B : bonne identification ;
Acc : identification acceptable ; FD : faible discrimination

⁽¹⁾ Souche identifiée *C. difficile* lorsque le caractère anaérobie était renseigné et *C. minutissimum/C. pseudodiphtheriticum* lorsqu'était renseigné le caractère aéro-anaérobie facultatif.

Tableau XIX. Identification des souches appartenant à des espèces non revendiquées par la base de données de la carte Vitek® 2 ANC

Résultats de l'identification		
Phénotypique de routine (nombre de souches)	Carte Vitek® 2 ANC (niveau d'identification)	Génotypique
<i>P. oris</i> (1)	<i>P. melaninogenica</i> (TB)	<i>P. oris</i>
<i>P. oris</i> (5)	<i>P. oralis</i> (Acc)	<i>P. oris</i>
<i>P. asaccharolytica</i> (1)	<i>Prevotella disiens</i> (Ex)	<i>P. asaccharolytica</i>
<i>A. odontolyticus</i> (3)	<i>A. meyeri</i> (Ex, TB, B)	<i>A. odontolyticus</i>
<i>C. innocuum</i> (4)	<i>C. baratii</i> (3 TB, 1 B)	<i>C. innocuum</i>
<i>C. innocuum</i> (1)	<i>C. subterminale</i> (Ex)	<i>C. innocuum</i>
<i>C. innocuum</i> (2)	<i>C. sporogenes</i> - <i>C. subterminale</i> (FD)	<i>C. innocuum</i>
<i>C. glucuronolyticum</i> (1)	Non identifié	<i>C. glucuronolyticum</i>
<i>C. accolens</i> (1)	<i>P. acnes</i> (TB)	<i>C. accolens</i>

Ex : excellente identification ; TB : très bonne identification ; B : bonne identification ;
Acc : identification acceptable ; FD : faible discrimination

4. DISCUSSION

Afin d'établir une comparaison plus équitable avec les autres systèmes d'identification commercialisés, les performances de ces systèmes ont été déterminées en prenant en compte uniquement les résultats concernant les espèces répertoriées dans la base de données de la carte Vitek[®] 2 ANC et les changements taxonomiques (126) (annexe 4). Les résultats obtenus avec la carte Vitek[®] 2 ANC sont globalement meilleurs que ceux obtenus avec les autres systèmes (104-106).

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) (50).

Dans notre étude, ce seuil a été atteint pour l'identification au niveau du **genre** sans recours à des tests additionnels pour l'ensemble des groupes bactériens testés (tableau XVI).

Concernant l'identification au niveau de **l'espèce** et dans la limite des espèces ou genres inclus dans la base de données et du panel des souches testées, la carte Vitek[®] 2 ANC a permis l'identification correcte **sans tests additionnels** avec un pourcentage d'identification supérieur à 95 % des souches appartenant (104-106) :

- aux *Bacteroides* du groupe *fragilis* (bactéries anaérobies les plus fréquemment isolées) et à l'espèce *B. ureolyticus*,
- aux cocci à Gram positif anaérobies,
- aux bacilles à Gram positif anaérobies non sporulés. Cependant, contrairement à l'étude de Wilkey et coll. (106) qui a montré une identification correcte initiale des 20 souches testées, nous avons rencontré des problèmes d'identification pour l'espèce *P. granulosum* car parmi les trois souches testées, deux ont été identifiées *C. difficile* lorsque le caractère anaérobie était renseigné, et l'une d'entre elles *C. pseudodiphtheriticum*-*C. minutissimum* avec une faible discrimination lorsque le caractère anaérobie facultatif était renseigné. Or, *P. granulosum* est décrit comme anaérobie ou microaérophile, contrairement à *P. acnes* qui est plus aérotolérant et pour lequel aucun problème d'identification n'a été observé alors que le caractère anaérobie strict était renseigné. Même si *P. granulosum* peut se développer en aérobiose, la taille de ses colonies est nettement plus importante en anaérobiose (46). Par ailleurs, l'habitat de *P. granulosum* et de *C. difficile* est différent : *P. granulosum* est isolé des régions riches en sebum de la peau alors que *C. difficile* est présent dans le tube digestif et est recherché le plus souvent dans les selles dans un contexte d'infection digestive. La nature du prélèvement mais aussi l'aspect après coloration de Gram (*P. granulosum* : bacille à Gram positif irrégulier, *C. difficile* : bacille à Gram positif droit sporulé) sont donc importants à prendre en compte car ils permettent de déceler cette erreur d'identification.
- aux genres *Corynebacterium* et *Arcanobacterium*. Les performances de la carte sont donc meilleures que celles obtenues avec les systèmes API Coryne[®] et RapID CB Plus[®] car un taux d'identification correcte supérieur à 95 % a pu être obtenu seulement après tests additionnels (110, 114, 115). Dans une étude ancienne, les performances du système Biolog[®] GP2 Microplate n'étaient pas satisfaisantes avec la base de données version 3.50 (113).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans les deux autres études portant sur le système Vitek® 2 ANC pour ce qui concerne les *Bacteroides* du groupe fragilis, l'espèce *B. ureolyticus* et les cocci à Gram positif (105, 106). Rennie et coll. (105) ont cependant observé un taux d'identification correcte légèrement inférieur (93 %) pour les bacilles à Gram positif non sporulés et les corynébactéries, alors que le nombre de souches testées pour ces deux groupes bactériens était comparable à celui de notre étude.

Le système API 20 A® apparaît globalement moins performant que la carte Vitek® 2 ANC pour l'identification des bactéries anaérobies. Cependant, les données de la littérature sont anciennes. Ce système requiert un délai d'identification plus long, surtout si des tests complémentaires sont nécessaires, et ceci peut être préjudiciable pour l'optimisation de la prise en charge thérapeutique.

Concernant le système MicroScan Rapid Anaerobe®, la seule étude disponible (ancienne) conclut que le système a des performances d'identification nettement moins bonnes que les méthodes conventionnelles auxquelles il est comparé (92).

Concernant les autres systèmes, le seuil de 95 % d'identification correcte au niveau de l'espèce et sans recours à des tests additionnels a été atteint avec les systèmes Rapid ID 32 A® pour l'identification des cocci à Gram positif (76, 80), Rapid ANA II® pour l'identification des cocci à Gram positif et des *Prevotella* spp. (85), et BD Crystal® ANR ID pour l'identification des cocci à Gram positif et des *Fusobacterium* spp. (89, 90).

Pour la plupart des espèces d'intérêt médical revendiquées par la base de données de la carte Vitek® 2 ANC, des taux d'identification correcte d'au moins 95 % ont été rapportés **après la réalisation de tests additionnels** recommandés par le fabricant avec les systèmes Rapid ID 32 A® (70, 73, 76), RapID ANA II® (86) et BD Crystal® ANR ID (89). Il est à noter qu'avec le système Rapid ID 32 A®, des analyses simples et rapides telles que la coloration de Gram, la pigmentation des colonies, l'aérotolérance, et la catalase sont considérées comme des tests additionnels car ils ne sont pas requis pour l'identification initiale.

Wilkey et coll. et Rennie et coll. n'ont pas mentionné avoir réalisé les tests additionnels recommandés par le fabricant pour les souches identifiées avec une faible discrimination. Il est possible que les taux d'identification correcte obtenus aient été alors supérieurs.

Dans notre étude, après réalisation des tests additionnels recommandés, le seuil de 95 % d'identification correcte a été atteint pour les souches de *Fusobacterium* spp. testées. La seule souche de *F. nucleatum* identifiée initialement avec un faible niveau de discrimination a été rapidement correctement identifiée après réalisation d'une coloration de Gram recommandée par le fabricant (figure 30). Ce « test complémentaire », qui est de toute façon réalisé au préalable, ne demande ni temps supplémentaire ni réactif particulier. Toutes les souches du genre *Fusobacterium* testées ont donc été identifiées rapidement dans notre étude. Des taux d'identification initiale correcte inférieurs (82 et 87 %) ont été obtenus dans les deux autres études évaluant la carte Vitek® 2 ANC (105, 106).



Figure 30. *Fusobacterium nucleatum*, coloration de Gram (d'après <http://www.asm.org/>)

A l'instar des deux autres études portant sur la carte Vitek[®] 2 ANC, nous avons observé des taux d'identification correcte inférieurs à 95 % pour les *Prevotella* spp. [86 % (n=36) (104), 78 % (n=18) (105), 91 % (n=347) (106)] et les *Clostridium* spp. [64 % (n=70) (104), 79 % (n=86) (105), 77 % (n=1129) (106)] et la réalisation de tests additionnels dans notre étude n'a pas permis d'atteindre ce seuil.

Comme dans ces deux études, les problèmes d'identification concernent essentiellement les espèces *P. bivia* et *P. melaninogenica* dont certaines souches ne sont pas différenciées ou ne sont pas correctement identifiées dans notre étude, et *P. intermedia* dont une souche est incorrectement identifiée dans notre étude (*P. disiens*).

Pour différencier *P. bivia* de *P. melaninogenica*, le test complémentaire proposé par le fabricant est la fermentation du saccharose (positive chez *P. melaninogenica*), qui nécessite au moins 24 heures d'incubation. Ce test, pourtant intégré au sein de la carte Vitek[®] 2 ANC, est apparu négatif pour les souches incorrectement identifiées d'emblée. La durée d'incubation de la carte n'est peut-être pas assez longue pour optimiser la réaction de fermentation du saccharose. D'autres tests peuvent être préconisés pour différencier ces deux espèces : la pigmentation noire des colonies (figure 31) et la détection de l' α -galactosidase, présentes uniquement chez *P. melaninogenica*. La pigmentation des colonies des *Prevotella* spp. pigmentées peut apparaître tardivement, mais elle est précédée par une fluorescence rouge brique détectable sous lumière U.V. (40), ce qui nécessite de disposer d'une lampe à U.V. La détection de l' α -galactosidase quant à elle, peut être effectuée rapidement grâce à un test unitaire (comprimé Rosco Diagnostica[®]).

P. intermedia se différencie de *P. disiens* par la pigmentation noire de ses colonies, la fermentation du saccharose, la production d'indole et d' α -fucosidase. Il est intéressant de noter que le test de fermentation du saccharose ainsi que le test α -fucosidase étaient également négatifs pour la souche de *P. intermedia* identifiée *P. disiens* dans notre étude. La détection de l' α -fucosidase peut également être effectuée grâce à un test unitaire (comprimé Rosco Diagnostica[®]).

L'intégration du test de détection de l' α -galactosidase au sein de la carte Vitek[®] 2 ANC pourrait donc peut-être augmenter les performances d'identification des *Prevotella* spp. Le test indole nécessite l'ajout d'un réactif de révélation et ne peut donc pas être intégré dans la carte Vitek[®] 2 ANC.

L'identification au niveau de l'espèce des *Prevotella* spp. au moyen de galeries commercialisées n'est pas toujours possible. Celle-ci peut nécessiter le recours à des techniques de biologie moléculaire (séquençage du gène de l'ARNr 16S). En pratique courante, cette identification ne paraît pas indispensable en l'absence de facteurs de

pathogénicité et/ou de mécanismes de résistance aux antibiotiques connus. En revanche, il est nécessaire de rechercher pour les souches appartenant à ce groupe bactérien, la production de β -lactamase et/ou une sensibilité diminuée au métronidazole.



Figure 31. Colonies de *P. melaninogenica* sur gélose au sang (d'après Dubreuil)

Des résultats moins satisfaisants ont été obtenus lors de l'identification des souches de *Clostridium* spp. car 64,3 % des souches ont été correctement identifiées au niveau de l'espèce sans recours à des tests additionnels. Ce taux est passé à 84,3 % après réalisation des tests additionnels recommandés par le fabricant mais ces tests nécessitent une durée d'incubation d'au moins 24 heures. Le taux d'identification correcte initiale observé dans notre étude est légèrement inférieur à ceux rapportés dans les deux autres études (77-79 %). Ceci peut s'expliquer, du moins en partie, par la différence de distribution des espèces entre les études et en particulier par le fait que le nombre de souches de *C. difficile* testées dans notre étude [28,6 % (20/70)] était relativement élevé comparativement au nombre de souches incluses dans les deux autres études [4,7 % (4/86) (105), 8,7 % (98/1129) (106)]. Or la carte Vitek[®] 2 ANC n'identifie pas de manière satisfaisante les souches appartenant à cette espèce. A l'instar de l'étude de Wilkey et coll. (106), un taux d'identification correcte d'au moins 95 % a été obtenu avec les espèces toxigènes suivantes : *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, et comme dans les deux autres études (105, 106), avec des espèces non toxigènes telles que *C. cadaveris* et *C. paraputrificum*.

Globalement, des résultats non satisfaisants ont également été observés avec les autres systèmes sauf avec le système Rapid ID 32 A[®] dans l'étude de Sperner et coll. (82). Celle-ci rapporte un taux d'identification correcte initiale de 96 % pour les espèces de *Clostridium* revendiquées par la carte Vitek[®] 2 ANC. Cependant, dans cette étude, les souches étaient d'origine alimentaire ou de collection et 75 % des souches testées appartenaient aux espèces *C. perfringens* (49/113) et *C. bifermentans* (36/113).

Les espèces de clostridia ayant posé des problèmes d'identification avec la carte Vitek[®] 2 ANC sont les suivantes :

C. bifermentans : dans notre étude, les deux souches testées n'ont pas été identifiées et dans les deux autres études, les souches ont été identifiées le plus souvent avec une faible discrimination.

C. butyricum : dans toutes les études, ces souches ont été identifiées avec une faible discrimination. Les tests additionnels proposés (nitrate réductase, lécithinase) nécessitent 24 à 48 heures supplémentaires alors qu'une simple coloration de Gram permet la différenciation rapide entre *C. butyricum* et *C. clostridioforme*. La production de β -lactamase doit être recherchée pour ces deux espèces (127).

C. clostridioforme : dans notre étude, les six souches testées ont été correctement identifiées. Dans les deux autres études, le taux d'identification correcte était inférieur. Ceci pourrait s'expliquer par une différence de sélection des souches : nous avons sélectionné des souches appartenant à l'espèce *C. clostridioforme* sensu stricto et il est possible que les souches des deux autres études appartiennent aux *Clostridium* du groupe *clostridioforme* qui comprend également des espèces morphologiquement proches. Il est également important d'identifier cette espèce (ou ce groupe d'espèces) pour rechercher la production de β -lactamase comme nous l'avons vu, mais aussi en raison de la fréquence de leur isolement, en particulier dans les hémocultures (128). Par ailleurs, cette espèce est associée à des infections invasives sévères chez l'homme (41).

C. ramosum : lors d'une faible discrimination entre cette espèce et *C. paraputrificum* comme cela a été le cas pour une souche de notre étude, la coloration de Gram peut permettre l'identification définitive. En effet, *C. ramosum* peut apparaître Gram négatif (figure 32) et ne sporule que très difficilement (contrairement à *C. paraputrificum*). *C. ramosum* est une espèce importante à identifier, car elle est également fréquemment isolée dans les hémocultures (27). De plus, cette espèce est susceptible de produire une β -lactamase.

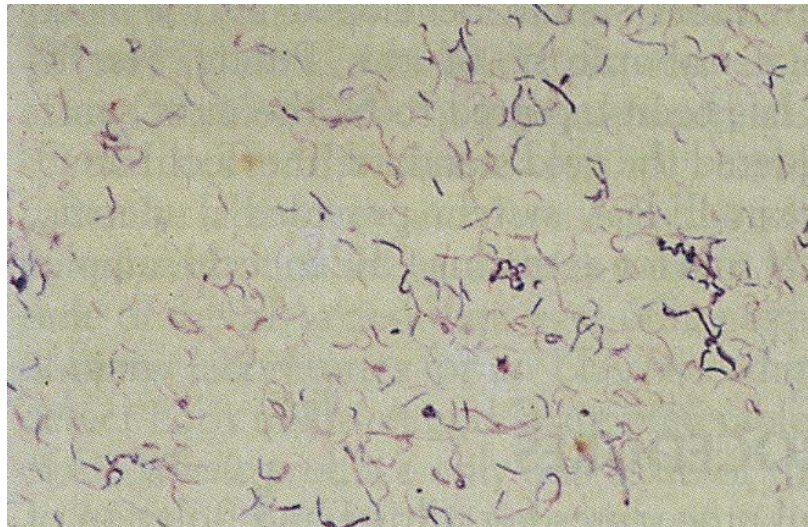


Figure 32 : Coloration de Gram de *C. ramosum* (d'après 129)

C. sporogenes : toutes les études d'évaluation de la carte Vitek[®] 2 ANC ont montré un taux d'identification de cette espèce non satisfaisant. L'identification de *C. sporogenes* requiert souvent le recours à des tests additionnels comme la détection de la lipase, qui nécessite plusieurs jours d'incubation et l'emploi d'un milieu au jaune d'oeuf. Celui-ci peut être préparé à partir d'une solution au jaune d'oeuf disponible dans le commerce.

C. tertium : toutes les souches de notre étude ont été correctement identifiées lorsque le caractère anaérobie facultatif était renseigné. Pour la seule souche identifiée *C. baratii*, c'est le caractère anaérobie strict qui avait été sélectionné. Ceci montre l'importance de la sélection

des trois caractères (coloration de Gram, morphologie, type respiratoire) pris en compte pour l'identification initiale. En effet, contrairement à *C. baratii*, *C. tertium* est aérotolérant. *C. tertium* a une importance clinique car il est souvent isolé d'hémocultures de patients neutropéniques et peut être la cause d'entérococolite chez ces patients et de méningites (41, 130-133). De plus, il est résistant à certains antibiotiques, en particulier aux céphalosporines de troisième génération et pour certains auteurs, au métronidazole (41). Dans notre étude, l'identification incorrecte d'une des six souches aurait donc pu être préjudiciable pour le patient.

C. difficile : l'identification de cette espèce est réalisée le plus souvent dans un contexte de diagnostic d'infection digestive. C'est l'espèce de *Clostridium* toxigène pour laquelle les résultats obtenus avec la carte Vitek[®] 2 ANC apparaissent les moins satisfaisants, la majorité des souches étant identifiées avec une faible discrimination (104, 106). Dans notre étude, un taux d'identification correcte de 85 % a été obtenu après réalisation de tests additionnels qui nécessitent au moins 24 heures d'incubation. Parmi les autres systèmes, une identification satisfaisante de *C. difficile* a pu être obtenue avec API ZYM[®], BD Crystal[®] ANR ID (89), API 20 A[®] (après 48 heures d'incubation) (66, 67) et Rapid ID 32 A[®] après réalisation de tests additionnels (76, 77).

L'aspect en verre brisé des colonies de *C. difficile* (figure 33) et leur odeur de « crottin de cheval » sont très évocateurs. Ces caractères peuvent contribuer à identifier cette espèce lors de faibles discriminations avec d'autres espèces de *Clostridium* et de suspecter une erreur lorsque *C. difficile* est identifié *C. sporogenes* comme nous l'avons observé pour une souche de notre étude.

La croissance sur milieu sélectif composé de cyclosérine et de céfoxitine (figure 34) permet également d'éliminer certaines de ces espèces, hormis *C. glycolicum*, *C. bifermentans* et *C. innocuum* qui peuvent se développer sur ce milieu (134). Les colonies de *C. glycolicum* et *C. bifermentans* ont un aspect différent de celui des colonies de *C. difficile*. Par contre, les colonies de *C. innocuum* ont un aspect proche de celles de *C. difficile*, mais contrairement à *C. difficile*, *C. innocuum* ne produit pas de L-proline-aminopeptidase (134). En cas de doute, la production de cette enzyme peut être détectée grâce à un comprimé Rosco DIATABS[®].

La démarche diagnostique d'infection digestive à *C. difficile* repose cependant avant tout sur la détection des toxines A et/ou B dans les selles des patients symptomatiques (135-139) pouvant être associée à la détection d'une enzyme : la glutamate déshydrogénase (GDH) produite par *C. difficile* mais aussi par d'autres espèces de *Clostridium*. L'intérêt de ce test réside dans son excellente valeur prédictive négative (135, 137, 140, 141). Avec l'apparition de souches de *C. difficile* virulentes et à l'origine d'épidémies, les laboratoires ont été encouragés à réaliser la culture des selles pour l'isolement des souches de *C. difficile* dans un but épidémiologique (142). Cette pratique permet d'augmenter la sensibilité diagnostique (138) mais il est nécessaire de rechercher la production de toxines à partir des souches car seules les souches toxigènes sont considérées comme pathogènes.

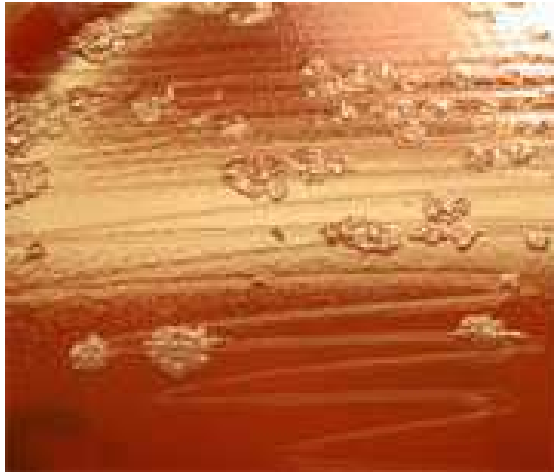


Figure 33



Figure 34

Figure 33. Colonies de *C. difficile* sur gélose au sang (d'après <http://www.bact.wisc.edu>) ;
Figure 34. Colonies de *C. difficile* sur milieu CCFA au jaune d'œuf (d'après 129)

Par ailleurs, comparée aux autres systèmes d'identification des bactéries anaérobies et des corynébactéries, la carte Vitek[®] 2 ANC présente l'avantage d'offrir une automatisation plus complète. Les manipulations réservées au technicien sont très rapides à effectuer. De plus, le coût de la carte est inférieur à celui de la plupart des autres systèmes (tableaux V et VI). Cependant, un des inconvénients de ce système est sa base de données qui pourrait être étendue.

Concernant les bacilles à Gram négatif, l'intérêt de pouvoir identifier *Capnocytophaga* spp. et *Leptotrichia* spp. réside entre autre dans le fait que ces bactéries peuvent être confondues avec *F. nucleatum* car elles ont une morphologie similaire après coloration de Gram (27) (figures 35 et 36). La pigmentation jaune des colonies de *Capnocytophaga* spp. et l'aspect « framboisé » des colonies de *Leptotrichia buccalis* sont évocatrices (40). De plus, contrairement à *F. nucleatum*, les *Capnocytophaga* spp. sont capables de se développer dans une atmosphère enrichie en CO₂. Il est à noter que *Capnocytophaga* sp. est revendiqué par la base de données de la carte Vitek[®] 2 NH. Bien que rarement isolées, les espèces appartenant au genre *Capnocytophaga* et *Leptotrichia* ont une importance clinique car elles sont isolées d'hémocultures chez des patients neutropéniques (33).

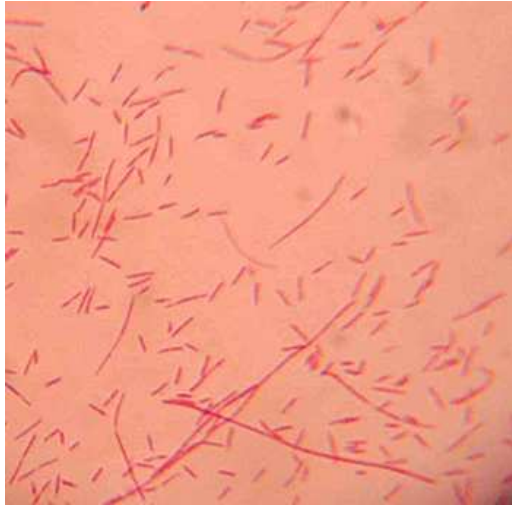


Figure 35

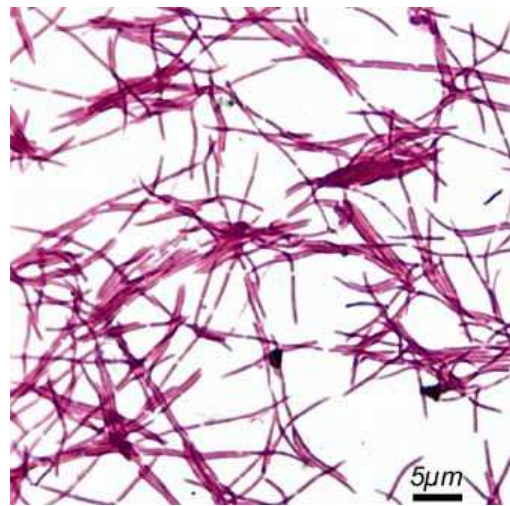


Figure 36

Figure 35. Coloration de Gram de *Capnocytophaga* sp. (d'après <http://www.scielo.cl/>) ;
Figure 36. Coloration de Gram de *Leptotrichia* sp. (d'après <http://vietsciences.free.fr>)

La base de données de la carte Vitek[®] 2 ANC ne revendique aucune espèce du genre *Porphyromonas*, contrairement à d'autres systèmes. Ces espèces, rarement isolées (27), sont principalement responsables d'infections urogénitales, intra-abdominales (*P. asaccharolytica*) (33) ou de la sphère ORL (*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*) (33, 40). Elles peuvent être aussi responsables de bactériémies. Elles forment, la plupart du temps, des colonies noires sur gélose au sang (figure 37). Cette pigmentation, qui peut être longue à apparaître, est précédée d'une fluorescence sous U.V. pour certaines espèces. Les *Porphyromonas* spp. peuvent être confondus avec certaines espèces pigmentées du genre *Prevotella* en l'absence de la détermination de la sensibilité à la vancomycine (les *Porphyromonas* spp. y sont sensibles, les *Prevotella* spp. résistantes) (33). Lorsque l'on isole un bacille à Gram négatif formant des colonies noires, il peut être judicieux d'évaluer sa sensibilité à la vancomycine (comprimé à 5 µg) parallèlement à l'identification avec la carte Vitek[®] 2 ANC.

Dans notre étude, l'unique souche de *P. asaccharolytica* testée a été identifiée *P. disiens*, espèce non pigmentée en noir. Ceci permet de suspecter l'erreur et de vérifier l'identification à l'aide d'un comprimé de vancomycine. Il est à noter que les *Porphyromonas* spp. sont bien identifiés par la galerie API ZYM[®] qui permet la détection de la trypsine et de la chymotrypsine.



Figure 37. Colonies de *Porphyromonas* sp. et *Prevotella* sp. pigmentées
(d'après <http://www.icb.usp.br/>)

Concernant les **clostridia**, d'autres systèmes intègrent des espèces telles que *Clostridium botulinum*, *Clostridium glycolicum*, *Clostridium innocuum*, *Clostridium limosum*, *Clostridium novyi A*, *Clostridium tetani*...

Les diagnostics du botulisme et du tétanos ne sont habituellement pas basés sur l'identification des bactéries en cause, mais sur la recherche de la toxine botulique dans le cas du botulisme (intoxication alimentaire) et sur l'examen clinique dans le cas du tétanos. L'intégration de *C. botulinum* et *C. tetani* dans les bases de données ne paraît donc pas d'une importance fondamentale.

Par contre, il serait intéressant de pouvoir identifier *C. novyi A* et *C. innocuum*. Bien que rarement isolé, *C. novyi A* est une espèce toxigène qui peut être à l'origine de gangrènes gazeuses et de chocs toxiques, grevés d'un taux de mortalité important, en particulier chez les patients toxicomanes (143, 144).

C. innocuum, fréquemment isolé en particulier dans les infections concernant les patients immunodéprimés, est résistant à plusieurs antibiotiques utilisés pour traiter les infections à anaérobies, et présente une résistance de bas niveau à la vancomycine (145-148, 41). Cette espèce apparaît Gram négatif après coloration de Gram (68). Elle est mal identifiée d'emblée par les systèmes d'identification enzymatiques (38, 145), les taux d'identification correcte sans tests additionnels n'excédant pas 50 % dans la plupart des études (68, 77, 78, 85, 86, 89, 90). Toutes les souches testées dans notre étude ont été correctement identifiées au niveau du genre mais incorrectement identifiées à l'espèce. Etant donné que *C. innocuum* est une espèce plus résistante aux antibiotiques que les autres clostridia, ces résultats peuvent induire des erreurs de traitement.

Les bactéries appartenant au genre *Actinomyces* sont importantes à identifier car certaines espèces sont impliquées entre autre dans l'actinomycose qui nécessite un traitement prolongé (28). Par ailleurs, ces bactéries sont résistantes au métronidazole. Les espèces impliquées le plus fréquemment dans l'actinomycose, en particulier cervico-faciale, sont *A. israelii*, *A. gerencseriae*, *A. odontolyticus*, et moins fréquemment, *A. meyeri*, *A. naeslundii*, *A. viscosus* et *A. graevenitzii* (35, 149). La base de données de la carte Vitek® 2 ANC ne comprend pas les espèces *A. odontolyticus*, *A. viscosus* et *A. graevenitzii*.

Dans notre étude, les trois souches d' *A. odontolyticus* testées ont été identifiées *A. meyeri*. Ces deux espèces peuvent être différenciées par l'observation d'une pigmentation rose-brune des colonies d' *A. odontolyticus*.

Les autres espèces d'*Actinomyces* sont principalement impliquées dans les infections de la peau et des tissus mous, aussi une identification au niveau du genre paraît satisfaisante.

La carte Vitek[®] 2 ANC permet l'identification de **corynébactéries** importantes lorsque sont pris en compte l'impact clinique, la fréquence d'isolement et la résistance aux antibiotiques, mais le genre *Corynebacterium* comprend de nombreuses autres espèces. Ainsi, des espèces telles que *C. accolens*, *Corynebacterium propinquum*, *C. afermentans*, *C. glucuronolyticum*, *C. macginleyi*, *Corynebacterium auris*, *C. pseudotuberculosis*, etc., sont comprises dans les bases de données d'autres systèmes mais ne font pas partie de celle de la carte Vitek[®] 2 ANC. Pourtant, l'identification de certaines de ces espèces permettrait de préciser leur pathogénicité : *C. glucuronolyticum* dans les infections prostatiques (150, 151), *C. kroppenstedtii* dans les mastites granulomateuses (152, 153), *C. auris* dans les otites, *C. macginleyi* lors d'infections oculaires (154), *C. riegelii* dans les infections urinaires (155). *C. pseudotuberculosis* peut 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 (156), une pharyngite et éventuellement un syndrome diphtérique (157).

Il serait également intéressant d'intégrer le genre *Actinobaculum* au sein de la base de données de la carte Vitek[®] 2 ANC car ces espèces peuvent être responsables d'infections urinaires notamment.

D'autres systèmes d'identification intègrent parfois dans leur base de données des corynébactéries telles que *Leifsonia aquatica*, *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Cellulomonas* spp., *Dermabacter* spp., *Dietzia* spp., *Gordonia* spp., *Oerksovia* spp., *Rhodococcus* spp., *Rothia* spp. et *Turicella otitidis*.

On peut remarquer que les corynébactéries rencontrées en pathologie humaine et présentant des colonies pigmentées ne sont pas incluses dans la base de données de la carte Vitek[®] 2 ANC : *Corynebacterium falsenii*, *Corynebacterium lipophiloflavum*, le complexe *C. renale* (figure 38), *L. aquatica*, *Cellulomonas* spp., *Microbacterium* spp., *Oerksovia* spp. et *Curtobacterium* spp. donnent des colonies jaunes ; *Corynebacterium auricomucosum* peut donner des colonies noires (figure 39) ; *Dietzia* spp., *Gordonia* spp. et *Rhodococcus* spp. donnent des colonies généralement orange à rose.

De même, la recherche de la mobilité à partir d'une culture en milieu liquide n'est positive que pour certaines espèces dont la plupart ne sont pas reconnues par la carte Vitek[®] 2 ANC (*L. aquatica*, certaines espèces de *Microbacterium*, *Arthrobacter* spp., *Cellulomonas* spp., *Oerksovia* spp.).

Ainsi, la carte Vitek[®] 2 ANC ne devrait pas être utilisée pour l'identification de toute bactérie corynéforme pigmentée et mobile.



Figure 38. Colonies de *C. renale* sur gélose au sang
(d'après <http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/>)



Figure 39 : Colonies de *C. auricomucosum* sur gélose au sang après 96 heures d'incubation (d'après 47)

Certains systèmes permettent également l'identification d'autres bacilles à Gram positif tels que *Listeria* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae* et *Gardnerella vaginalis*. L'intégration de ces espèces dans les bases de données n'est pas inutile, car ces bactéries peuvent être confondues avec des corynébactéries par un observateur non expérimenté. Il existe notamment un risque d'erreur majeur concernant *Listeria monocytogenes* qui peut apparaître de forme irrégulière à la coloration de Gram (46), bien que cette espèce soit décrite comme un bacille à contours réguliers le plus souvent rectiligne (figure 40). Il faut toujours suspecter sa présence dans une hémoculture positive à bacilles à Gram positif (46).

L. monocytogenes, *E. rhusiopathiae* et *G. vaginalis* sont revendiquées par la base de données d'une autre carte utilisée avec l'automate Vitek[®] 2, la carte Vitek[®] 2 GP (158). Pour les utilisateurs du système Vitek[®] 2, en cas de doute quant à l'aspect morphologique après coloration de Gram, il paraît judicieux d'utiliser les deux cartes (Vitek[®] 2 ANC et Vitek[®] 2 GP). *G. vaginalis* appartient également à la base de données de la carte Vitek[®] 2 NH. En cas de suspicion d'une infection à *L. monocytogenes*, il est aussi possible d'effectuer des tests d'identification présomptive : rechercher la mobilité après culture à 22 °C, incuber un

milieu de culture à 4 °C, effectuer le test d'hydrolyse de l'esculine. Si l'un de ces tests est positif, il faut utiliser la carte Vitek[®] 2 GP pour identifier la souche.



Figure 40

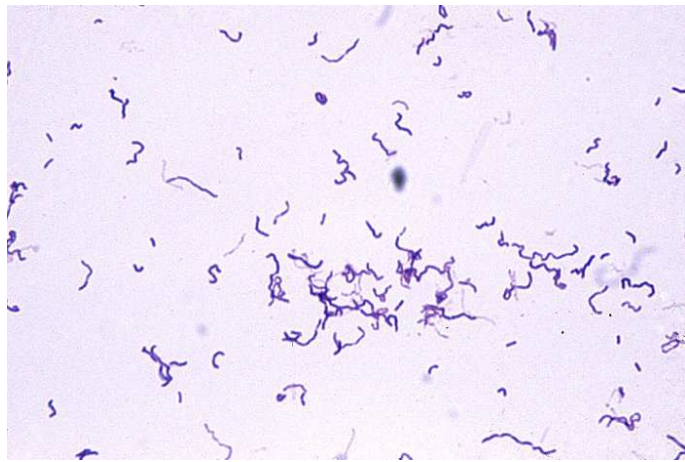


Figure 41

Figure 40. Coloration de Gram de *Listeria monocytogenes* (d'après <http://www.microbe-edu.org/>); **Figure 41.** Coloration de Gram d'*Erysipelothrix rhusiopathiae* (d'après <http://www.gefor.4t.com/>)

L'identification phénotypique basée sur l'étude des caractères biochimiques des bactéries est encore la plus utilisée en routine dans les laboratoires de biologie médicale. Mais d'autres techniques d'identification bactérienne émergent, s'appuyant sur la biologie moléculaire (séquençage par exemple) ou la chimie analytique (spectrométrie infrarouge, spectrométrie de masse...). Ces techniques restent encore actuellement l'apanage de laboratoires spécialisés.

Les méthodes génotypiques peuvent compléter voire se substituer aux méthodes d'identification phénotypique.

L'identification génotypique des bactéries peut être réalisée grâce à l'utilisation de différentes techniques, telles que (159) :

- L'hybridation de l'ADN ou de l'ARNr bactérien avec des sondes nucléiques spécifiques d'espèces et marquées par un composé radioactif, enzymatique ou chimique. Elle peut être réalisée directement à partir de prélèvements ou à partir de colonies isolées. Cette méthode est très spécifique mais manque de sensibilité. Les puces à ADN, qui sont susceptibles de se développer à l'avenir, sont basées sur ce principe : des dizaines de milliers de sondes sont greffées sur un support, et l'hybridation de l'ADN bactérien avec certaines de ces sondes permet l'identification des microorganismes.
- Le séquençage de gènes présents chez toutes les bactéries, comme par exemple le gène codant l'ARNr 16S, reposant sur l'utilisation d'amorces universelles (voir « Matériels et méthodes »).

- La PCR spécifique basée sur l'utilisation d'amorces spécifiques qui permettent uniquement l'amplification de l'ADN bactérien de l'espèce ciblée. Il existe plusieurs variantes de PCR (PCR multiplexe, PCR nichée, PCR en temps réel). Parmi elles, la PCR en temps réel est de plus en plus utilisée : l'accumulation du produit d'amplification est suivie en temps réel grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes. Cette technique constitue un progrès majeur car :
 - elle est rapide,
 - elle permet le suivi de l'amplification donc élimine les étapes de mise en évidence du produit d'amplification après la PCR (électrophorèse),
 - elle peut être utilisée pour quantifier les bactéries (160).
 Récemment, des méthodes de PCR en temps réel unitaires et permettant la détection du gène codant la toxine B de *C. difficile* (*tcdB*) (BD GeneOhm[®] Cdiff, BD Diagnostics) (Xpert[®] *C. difficile*, Cepheid) ont été commercialisées.

Par rapport aux méthodes d'identification phénotypiques, voici les avantages des méthodes d'identification génotypiques (118, 160) :

- elles sont plus sensibles
- elles sont plus spécifiques (117)
- elles n'impliquent pas forcément l'isolement des bactéries ; elles peuvent être effectuées directement à partir de prélèvements, ce qui facilite l'identification de bactéries difficiles à cultiver ou non cultivables
- elles permettent parfois l'identification d'une bactérie lorsque les méthodes phénotypiques conduisent à une impasse
- elles sont relativement rapides dans le cas des bactéries d'identification phénotypique longue et délicate (ex : bacilles anaérobies à Gram positif).

Cependant, les méthodes de biologie moléculaire présentent certains inconvénients (160) :

- l'obligation d'organiser le laboratoire en plusieurs secteurs géographiquement isolés les uns des autres.
- le coût des réactifs
- les faux positifs : étant donné la grande sensibilité de ces techniques et l'emploi fréquent d'amorces universelles, des contaminations par l'ADN de bactéries non responsables d'infections peuvent avoir lieu
- les faux négatifs : les réactions de PCR pouvant être réalisées à partir d'un faible volume, la concentration bactérienne peut être très faible. Les faux négatifs peuvent être également dus à des composés inhibiteurs de la réaction, à la dégradation de l'ADN par des nucléases, à une mauvaise extraction de l'ADN...
- lors des PCR spécifiques, le choix de l'amorce et la nécessité de ciblage des bactéries à rechercher (161)
- la difficulté à identifier plusieurs espèces simultanément, même avec la PCR multiplexe
- la détection d'organismes non viables. Certaines études ont montré que l'ADN de bactéries rendues non viables par une antibiothérapie pouvait être détecté jusqu'à trois semaines après le traitement (116)
- lorsqu'elles sont effectuées directement à partir de prélèvements, l'absence d'isolement de la bactérie ne permet pas la détermination de la sensibilité aux antibiotiques en l'absence de techniques de biologie moléculaire mettant en évidence les gènes de résistance.

- la qualité des séquences répertoriées dans les bases de données : certaines peuvent être incomplètes voire erronées
- l'absence de critères précis pour définir une espèce (séquençage)

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) est une technique de séparation de molécules (protéines et peptides en ce qui concerne la microbiologie) selon leur masse (161-174). Le processus de préparation des échantillons comprend plusieurs étapes : tout d'abord, l'inactivation des bactéries, puis la lyse de la paroi bactérienne, ce qui permet la libération des protéines. Les molécules sont disposées sur une cible. Un laser UV permet l'ionisation et la désorption par l'intermédiaire d'une matrice cristalline adjuvante. L'énergie absorbée provoque une émission d'ions en phase gazeuse. La séparation se fait par la mesure du temps de déplacement des molécules dans un tube sous vide (159), la vitesse de chaque ion étant inversement proportionnelle à sa masse. Le poids moléculaire des molécules étudiées est compris entre 2000 et 20 000 Dalton. Les protéines ribosomales et certaines protéines membranaires sont les plus abondantes. L'analyse des profils obtenus révèle des biomarqueurs spécifiques permettant de distinguer les espèces.

Les avantages de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont notamment :

- la rapidité de l'identification, de l'ordre de quelques minutes (164, 166, 167)
- le fait qu'un faible inoculum bactérien suffise
- le faible coût par analyse en terme de consommables (164, 166)
- la fiabilité et la reproductibilité de l'identification rapportées par certains auteurs (167, 172, 173)
- le niveau de l'identification, allant parfois jusqu'à la sous-espèce, voire la caractérisation d'une souche. Concernant les bactéries anaérobies, cette technique a permis notamment :
 - la différenciation entre *C. botulinum* et *C. sporogenes*, ainsi qu'entre des groupes métaboliques au sein de l'espèce *C. botulinum* (167, 171)
 - l'identification de *C. difficile* de PCR ribotype O27 (171)
 - l'identification de sous-espèces au sein de l'espèce *F. nucleatum* (172)
 - l'identification des espèces de *Porphyromonas* (172)

Les inconvénients de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont notamment :

- le coût élevé du spectromètre et de son entretien annuel (164, 166)
- comme pour tout système d'identification, la nécessité de construire des bases de données de qualité, en particulier pour les bactéries anaérobies.

CONCLUSION

Le système Vitek[®] 2 ANC est une méthode simple, rapide et satisfaisante pour l'identification des principales espèces de bactéries anaérobies et de corynébactéries fréquemment isolées dans un laboratoire de bactériologie médicale. Il représente une amélioration par rapport aux autres systèmes d'identification phénotypique disponibles. Dans notre étude, la plupart des problèmes d'identification rencontrés ont été résolus à l'aide des tests complémentaires proposés par le fabricant. Toutefois, le recours à ces tests entraîne un allongement de la durée d'identification et peut nécessiter le recours à certains tests non disponibles. Une rapidité de l'identification est un atout important surtout si une communication en temps réel existe entre le biologiste et le clinicien (25).

Ce système pourrait être amélioré par l'incorporation d'autres tests dans la carte, l'addition d'autres tests complémentaires et par l'intégration dans la base de données d'autres espèces de bactéries anaérobies et de corynébactéries susceptibles d'être rencontrées en pathologie humaine.

Toutefois, l'automatisation donne des outils au biologiste mais celui-ci doit cependant garder un esprit critique vis-à-vis des résultats en ne négligeant pas des tests simples tels que la coloration de Gram, la morphologie, la pigmentation et l'odeur des colonies, le type respiratoire, etc. et prendre en compte l'origine du prélèvement et le contexte clinique.

BIBLIOGRAPHIE

1. SEDALLIAN A. et DUBREUIL L. Généralités sur les bactéries anaérobies. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
2. BLAIRON L., DE GHELDRE Y., DELAERE B., SONET A., BOSLY A., et GLUPCZYNSKI Y. A 62-month retrospective epidemiological survey of anaerobic bacteraemia in a university hospital. *Clin Microbiol Infect.* (2006), 12(6) : 527-532.
3. BROOK I. et FRAZIER E.H. Aerobic and anaerobic infection associated with malignancy. *Support Care Cancer.* (1998), 6(2) : 125-131.
4. LARK R.L., MCNEIL S.A., VANDERHYDE K., NOORANI Z., UBERTI J. et CHENOWETH C. Risk factors for anaerobic bloodstream infections in bone marrow transplant recipients. *Clin Infect Dis.* (2001), 33(3) : 338-343.
5. NORIEGA L.M., VAN DER AUWERA P., PHAN M., DANEAU D., MEUNIER F., GERAIN J. et AOUN M. Anaerobic bacteremia in a cancer center. *Support Care Cancer.* (1993), 1(5) : 250-255.
6. SAITO T., SENDA K., TAKAKURA S., FUJIHARA N., KUDO T., LINUMA Y., FUJITA N., KOMORI T., BABA N., HORII T., MATSUOKA K., TANIMOTO M. et ICHIYAMA S. Anaerobic bacteremia: the yield of positive anaerobic blood cultures: patient characteristics and potential risk factors. *Clin Chem Lab Med.* (2003), 41(3) : 293-297
7. SPÁNIK S., TRUPL J., KUNOVÁ A., PICHNA P., HELPIANSKA L., ILAVSKÁ I., KUKUCKOVÁ E., LACKA J., GRAUSOVÁ S., STOPKOVÁ K., DRGONA L. ET KRČMÉR V. Jr. Bloodstream infections due to anaerobic bacteria in cancer patients : epidemiology, etiology, risk factors, clinical presentation and outcome of anaerobic bacteremia. *Neoplasma.* (1996), 43(4) : 235-238.
8. WILSON J.R. et LIMAYE A.P. Risk factors for mortality in patients with anaerobic bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2004), 23(4) : 310-316.
9. HECHT D.W. Routine anaerobic blood cultures: back where we started ? *Clin Infect Dis.* (2007), 44(7) : 901-903.
10. DORSHER C.W., ROSENBLATT J.E. et WILSON W.R. Anaerobic bacteremia: decreasing rate over a 15-year period. *Rev Infect Dis.* (1991), 13(4) : 633-636.
11. GOLDSTEIN E.J.. Anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis.* (1996), 23(1) : 97-101.
12. LOMBARDI D.P. et ENGLEBERG N.C. Anaerobic bacteremia: incidence, patient characteristics, and clinical significance. *Am J Med.* (1992), 92(1) : 53-60.
13. ORTIZ E. et SANDE M.A. Routine use of anaerobic blood cultures: are they still indicated ? *Am J Med.* (2000), 108(6) : 445-447.
14. LASSMANN B., GUSTAFSON D.R., WOOD C.M. et ROSENBLATT J.E. Reemergence of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis.* (2007), 44(7) : 895-900.
15. GROLLIER G., LE MOAL G. et ROBERT R. Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (*Clostridium difficile* et *Actinomyces* exclus). *Encyclopédie médico-chirurgicale*. Paris, Elsevier, 2005.
16. GÓMEZ J., BAÑOS V., RUIZ J., HERRERO F., PÉREZ M., PRETEL L., CANTERAS M. et VALDÉS M. Clinical significance of anaerobic bacteremias in a general hospital. A prospective study from 1988 to 1992. *Clin Investig.* (1993), 71(8) : 595-599.
17. PERAINO V.A., CROSS S.A. et GOLDSTEIN E.J. Incidence and clinical significance of anaerobic bacteremia in a community hospital. *Clin Infect Dis.* (1993), 16(4) : 288-291.
18. SALONEN J.H., EEROLA E. et MEURMAN O. Clinical significance and outcome of anaerobic bacteremia. *Clin Infect Dis.* (1998), 26(6) : 1413-1417.

19. SFM (Société Française de Microbiologie). *Rémic 2007 - Référentiel en microbiologie médicale (bactériologie et mycologie)*. 3^e édition. Vivactis Plus, 2007.
20. GOLDSTEIN E.J., CITRON D.M., et GOLDMAN R.J. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility testing methods: results and recommendations for improvement. *J Clin Microbiol.* (1992), 30(6) : 1529-1534.
21. GOLDSTEIN E.J., CITRON D.M., GOLDMAN R.J., CLAROS M.C., et HUNT-GERRADO S. United States National Hospital Survey of anaerobic culture and susceptibility methods, II. *Anaerobe.* (1995), 1(6) : 309-314.
22. GOLDSTEIN E.J., CITRON D.M., GOLDMAN P.J. et GOLDMAN R.J. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. *Anaerobe.* (2008), 14(2) : 68-72.
23. ROSENBLATT J.E. Can we afford to do anaerobic cultures and identification? A positive point of view. *Clin Infect Dis.* (1997), 25(2) : 127-131.
24. NGUYEN M.H., YU V.L., MORRIS A.J., MCDERMOTT L., WAGENER M.W., HARRELL L. et SNYDMAN D.R. Antimicrobial resistance and clinical outcome of *Bacteroides* bacteremia: findings of a multicenter prospective observational trial. *Clin Infect Dis.* (2000), 30(6) : 870-876.
25. BARENFANGER J., DRAKE C. et KACICH G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol.* (1999), 37(5) : 1415-1418.
26. BARENFANGER J., DRAKE C., LAWHORN J., KOPEC C., et KILLIAM R. Outcomes of improved anaerobic techniques in clinical microbiology. *Clin Infect Dis.* (2002), 35(1) : 78-83.
27. JOUSIMIES-SOMER H., SUMMANEN P., CITRON D.M., JO BARON E., WEXLER H.M. et FINEGOLD S.M. *Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual*. 6^e édition. Belmont, Star Publishing Company, 2002.
28. CITRON D.M. et APPELBAUM P.C. How far should a clinical laboratory go in identifying anaerobic isolates, and who should pay ? *Clin Infect Dis.* (1993), 16(4) : 435-438.
29. CITRON D.M. Rapid identification of anaerobes in the clinical laboratory. *Anaerobe* (1999), 5 : 109-113.
30. BARON E.J. Rapid identification of bacteria and yeast : summary of a National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed guideline. *Clin Infect Dis.* (2001), 33(2) : 220-225.
31. BARON E.J. et CITRON D.M. Anaerobic identification flowchart using minimal laboratory resources. *Clin Infect Dis.* (1997), 25(2) : 143-146.
32. CITRON D.M. Algorithm for identification of anaerobic bacteria. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
33. CITRON D.M., POXTON I.R. et JO BARON E. *Bacteroides, Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium, and other anaerobic Gram-negative rods. Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
34. SONG Y. et FINEGOLD S.M. *Peptostreptococcus, Finegoldia, Anaerococcus, Peptoniphilus, Veillonella, and other anaerobic cocci. Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
35. KÖNÖNEN E. et WADE W.G. *Propionibacterium, Lactobacillus, Actinomyces, and other non-spore-forming anaerobic gram-positive rods. Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
36. SEDALLIAN A., GAVINI F. et DUBREUIL L. Cocci anaérobies à Gram positif (GPAC). *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.

37. GAVINI F., SEDALLIAN A. et DUBREUIL L. Anaérobies à Gram positif non sporulés. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
38. BLAND S., SEDALLIAN A. et DUBREUIL L. *Clostridium* autres que *C. difficile*. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
39. DELMEE M. *Clostridium difficile*. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
40. DUBREUIL L. et SEDALLIAN A. Bacilles anaérobies à Gram négatif. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
41. JOHNSON E.A., SUMMANEN P. et FINEGOLD S.M. *Clostridium*. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
42. MARCHANDIN H. Les cocci à Gram négatif anaérobies. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
43. JOHNSON M.J., THATCHER E. et COX M.E. Techniques for controlling variability in gram staining of obligate anaerobes. *J Clin Microbiol.* (1995) 33(3) : 755-758.
44. SONG Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*. (2005), 11(1-2) : 79-91.
45. RIEGEL P. Les corynébactéries, aspects bactériologiques et cliniques. *Annales de Biologie Clinique* (1998), 56(3) : 285-296.
46. RIEGEL P. *Corynebacterium* et bactéries apparentées. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
47. FUNKE G. et BERNARD K.A. Coryneform Gram-positive rods. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
48. FUNKE G., VON GRAEVENITZ A., CLARRIDGE J.E 3RD et BERNARD K.A. Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev.* (1997), 10(1) : 125-159.
49. TRUANT A.L. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology, 2002.
50. CARROLL K.C. et WEINSTEIN M.P. Manual and automated systems for detection and identification of microorganisms. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2007.
51. CROIZE J. Systèmes automatiques d'identification bactérienne. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
52. MILLER M., O'HARA C. Manual and automated systems for microbial identification. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2003.
53. BOLLET C., ELENA M., CHARREL J., ESTRANGIN E., DURAND-GASSELIN J., VAN GAVER P. et de MICCO P. Application du coefficient de capacité diagnostique à la comparaison de trois galeries miniaturisées d'identification des bactéries anaérobies. *Path Biol.* (1988), 36(3) : 203-208.
54. OLSON W.P. *Automated Microbial Identification and Quantitation: Technologies for the 2000s*. CRC Press, 1996.
55. MILLER J. M. Evaluating biochemical identification systems. *J Clin Microbiol.* (1991), 29 : 1559-1561.
56. STAGER C.E. et DAVIS J.R. Automated systems for identification of microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* (1992), 5(3) : 302-327.
57. HANSEN S.L. et STEWART B.J. Comparison of API and Minitek to Center for Disease Control methods for the biochemical characterization of anaerobes. *J Clin Microbiol.* (1976), 4(3) : 227-231.

58. HANSON C.W., CASSORLA R. et MARTIN W.J. API and Minitex systems in identification of clinical isolates of anaerobic gram-negative bacilli and *Clostridium* species *J Clin. Microbiol* (1979), 10 : 14-18
59. APPELBAUM P.C., KAUFMANN C.S., KEIFER J.C. et VENBRUX H.J. Comparison of three methods for anaerobe identification. *J Clin Microbiol.* (1983), 18(3) : 614-621.
60. MURRAY P.R., WEBER C.J. et NILES A.C. Comparative evaluation of three identification systems for anaerobes. *J Clin Microbiol.* (1985), 22(1) : 52-55.
61. KARACHEWSKI N.O., BUSCH E.L. et WELLS C.L. Comparison of PRAS II, RapID ANA, and API 20A systems for identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* (1985), 21(1) : 122-126.
62. SUMMANEN P. et JOUSIMIES-SOMER H. Comparative evaluation of RapID ANA and API 20 A for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (1988), 7(6) : 771-775.
63. GULLETTA E., AMATO G., NANI E. et COVELLI I. Comparison of two systems for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol.* (1985), 4(3) : 282-285.
64. MOORE H.B., SUTTER V.L. et FINEGOLD S.M. Comparison of three procedures for biochemical testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* (1975), 1(1) : 15-24.
65. LINDSTRÖM M.K., JANKOLA H.M., HJELM S., HYYTIÄ E.K. et KORKEALA H.J. Identification of *Clostridium botulinum* with API 20 A, Rapid ID 32 A and RapID ANA II. *FEMS Immunol Med Microbiol.* (1999), 24(3) : 267-274.
66. GRESSER M.E., SHANHOLTZER C.J., GERDING D.N. et GARRETT C.R., PETERSON L.R. Evaluation of the 24-h API 20A anaerobe system for identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* (1984), 19(6) : 915-916.
67. HEAD C.B., et RATNAM S. Comparison of API ZYM system with API AN-Ident, API 20A, Minitex anaerobe II, et RapID-ANA systems for identification of *Clostridium difficile*. *J Clin. Microbiol* (1988), 26 : 144-146
68. ALEXANDER C.J., CITRON D.M., BRAZIER J.S. et GOLDSTEIN E.J. Identification and antimicrobial resistance patterns of clinical isolates of *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium innocuum*, and *Clostridium ramosum* compared with those of clinical isolates of *Clostridium perfringens*. *J Clin Microbiol.* (1995), 33(12) : 3209-3215.
69. ARZESE A., MINISINI R. et BOTTA G.A. Evaluation of an automated system for identification of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (1994), 13(2) : 135-141.
70. DOWNES J., KING A., HARDIE J. et PHILLIPS 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(6) : 319-326.
71. GROLLIER G., BURUCOA C., BONNIN M. et DE RAUTLIN DE LA ROY Y. Identification and susceptibility testing for obligate anaerobic bacteria using a semi-automated API ATB plus system. *Ann Biol Clin.* (1992), 50(6-7) : 393-397.
72. JAMES N.G., LAI-KING N.G., CHOW A.W. et DILLON J.A. Identification of five *Peptostreptococcus* species isolated predominantly from the female genital tract by using the rapid ID32A system. *J Clin Microbiol.* (1994), 32(5) : 1302-1307.
73. JENKINS S.A., DRUCKER D.B., KEANEY M.G. et GANGULI L.A. Evaluation of the RAPID ID 32A system for the identification of *Bacteroides fragilis* and related organisms. *J Appl Bacteriol.* (1991), 71(4) : 360-365.
74. KERTTULA A.M., CARLSON P., SARKONEN N., HALL V. et KÖNÖNEN E. Enzymatic/biochemical analysis of *Actinomyces* with commercial test kits with an emphasis on newly described species. *Anaerobe.* (2005), 11(1-2) : 99-108.
75. KING A. et PHILLIPS I. Evaluation of the Rapid ID 32A system for the identification of the *Bacteroides fragilis* group. *Clin Microbiol Infect.* (1996), 2(2) : 115-122.

76. KITCH T.T. et APPELBAUM P.C. Accuracy and reproducibility of the 4-hour ATB 32A method for anaerobe identification. *J Clin Microbiol.* (1989), 27(11) : 2509-2513.
77. LOONEY W.J., GALLUSSER A.J. et MODDE H.K. Evaluation of the ATB 32 A system for identification of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* (1990), 28(7) : 1519-1524.
78. MOLL W.M., UNGERECHTS J., MARKLEIN G. et SCHAAL K.P. Comparison of BBL Crystal ANR ID Kit and API rapid ID 32 A for identification of anaerobic bacteria. *Zentralbl Bakteriol.* (1996), 284(2-3) : 329-47.
79. PATTYN S.R., IEVEN M. et BUFFET L. Comparative evaluation of the Rapid ID 32A kit system, miniaturized standard procedure and a rapid fermentation procedure for the identification of anaerobic bacteria. *Acta Clin Belg.* (1993), 48(2) : 81-85.
80. ROGER F., ROGER A. et CANIAUX I. Evaluation du système ATB 32 A d'identification automatisée des bactéries anaérobies. *Annales de Biologie Clinique* (1991), 49(1) : 14-17.
81. SANTALA A.M., SARKONEN N., HALL V., CARLSON P., JOUSIMIES-SOMER H. et KÖNÖNEN E. Evaluation of four commercial tests system for identification of *Actinomyces* and some closely related species. *J Clin Microbiol.* (2004), 42(1) : 418-420.
82. SPERNER B., EISGRUBER H. et STOLLE A. Use of the RAPID ID 32 A system for rapid identification of *Clostridium* species important in food hygiene. *Int J Food Microbiol.* (1999), 52(3) : 169-180.
83. PHILIPPON A. Place des automates (culture, identification, antibiogramme) en 2005. *Bio Tribune Magazine* (2005), 16(1) : 28-30.
84. BRANDER M.A. et JOUSIMIES-SOMER H.R. Evaluation of the RapID ANA II and API ZYM systems for identification of *Actinomyces* species from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* (1992), 30(12) : 3112-3116.
85. CELIG D.M. et SCHRECKENBERGER P.C. Clinical evaluation of the RapID-ANA II panel for identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* (1991), 29(3) : 457-462.
86. MARLER L.M., SIDERS J.A., WOLTERS L.C., PETTIGREW Y., SKITT B.L. et ALLEN S.D. Evaluation of the new RapID-ANA II system for the identification of clinical anaerobic isolates. *J Clin Microbiol.* (1991), 29(5) : 874-878.
87. MILLER P.H., WIGGS L.S. et MILLER J.M. Evaluation of API An-IDENT and RapID ANA II systems for identification of *Actinomyces* species from clinical specimens. *J Clin Microbiol.* (1995), 33(2) : 329-330.
88. PEIFFER S. et COX M. Enzymatic reactions of *Clostridium difficile* in aerobic and anaerobic environments with the RapID-ANA II identification system. *J Clin Microbiol.* (1993), 31(2) : 279-282.
89. AVESANI V. et DELMEE M. Evaluation of Crystal anaerobes identification system on 140 clinical anaerobic isolates. 1995, 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, mars 1995, Vienne (Autriche).
90. CAVALLARO J.J., WIGGS L.S. et MILLER J.M. Evaluation of the BBL Crystal Anaerobe identification system. *J Clin Microbiol.* (1997), 35(12) : 3186-3191.
91. REUBEN J., SALOMON J., WILES T., DUNK T., MONTHONY J. et LINVINGSTON D. BBL Crystal anaerobe identification systems a novel approach. 1995, 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, mars 1995, Vienne (Autriche).
92. STOAKES L., KELLY T., MANARIN K., SCHIEVEN B., LANNIGAN R., GROVES D. et HUSSAIN Z. Accuracy and reproducibility of the MicroScan rapid anaerobe identification system with an automated reader. *J Clin Microbiol.* (1990), 28(6) : 1135-1138.

93. DURMAZ B., JOUSIMIES-SOMER H.R. et FINEGOLD S.M. Enzymatic profiles of *Prevotella*, *Porphyromonas*, and *Bacteroides* species obtained with the API ZYM system and Rosco diagnostic tablets. *Clin Infect Dis.* (1995), 20(2) : 192-194.
94. FONTANA C., JEZZI T., TESTORE G.P. et DAINELLI B. Differentiation of *Clostridium difficile*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium sordellii*, and *Clostridium perfringens* from diarrheal stool by API ZYM and API LRA oxidase test. *Microbiol Immunol.* (1995) 39(4) : 231-235.
95. HOFSTAD T. Evaluation of the API ZYM system for identification of *Bacteroides* and *Fusobacterium* species. *Med Microbiol Immunol.* (1980), 168(3) : 173-177.
96. KELLEY RW. Phenotypic differentiation of some of the *Veillonella* species with the API ZYM system. *Can J Microbiol.* (1982), 28(6) : 703-705.
97. KILIAN M. Rapid identification of Actinomycetaceae and related bacteria. *J Clin Microbiol.* (1978), 8(2) : 127-133.
98. LAUGHON B.E., SYED S.A. et LOESCHE W.J. API ZYM system for identification of *Bacteroides* spp., *Capnocytophaga* spp., and spirochetes of oral origin. *J Clin Microbiol.* (1982), 15(1) : 97-102.
99. LEVETT P.N. Identification of *Clostridium difficile* using the API ZYM system. *Eur J Clin Microbiol.* (1985), 4(5) : 505-507.
100. MARLER L., ALLEN S. et SIDERS J. Rapid enzymatic characterization of clinically encountered anaerobic bacteria with the API ZYM system. *Eur J Clin Microbiol.* (1984), 3(4) : 294-300.
101. SLOTS J. Enzymatic characterization of some oral and nonoral gram-negative bacteria with the API ZYM system. *J Clin Microbiol.* (1981), 14(3) : 288-294.
102. THARAGONNET D., SISSON P.R., ROXBY C.M., INGHAM H.R. et SELKON J.B. The API ZYM system in the identification of Gram-negative anaerobes. *J Clin Pathol.* (1977), 30(6) : 505-509.
103. VÄISÄNEN M.L., KIVIRANTA M., SUMMANEN P., FINEGOLD S.M. et JOUSIMIES-SOMER H.R. *Porphyromonas endodontalis*-like organisms from extraoral sources. *Clin Infect Dis.* (1997), 25(2) : 191-193.
104. MORY F., ALAUZET C., MATUSZEWSKI C., RIEGEL P. et LOZNIIEWSKI A. Evaluation of the new Vitek 2 ANC card for identification of medically relevant anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* (2009), 47(6) : 1923-1926.
105. RENNIE R.P., BROSNIKOFF C., TURNBULL L., RELLER L.B., MIRRETT S., JANDA W, RISTOW K. et KRILCICH A. Multicenter evaluation of the Vitek 2 anaerobe and *Corynebacterium* identification card. *J Clin Microbiol.* (2008), 46(8) : 2646-2651.
106. WILKEY K., BRINKMEYER J., COLON-REVELES J., MOSS N., MILLS J., MATHIAS E., FOSSMAN E., PINCUS D., CLARRIDGE J., JITJAI C., McLAUGHLIN A. et CHATELLIER S. Rapid automated identification of anaerobic and coryneform species with the new VITEK 2 ANC Card. 2006, Abstr. 106th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, D.C. (Etats-Unis).
107. PINCUS D.H. (consulté le 27/08/2009). *Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system.* https://store.pda.org/bookstore/TableOfContents/ERMM_V2_Ch01.pdf
108. ADDERSON E.E., BOUDREAUX J.W., CUMMINGS J.R., POUNDS S., WILSON D.A., PROCOP G.W. et HAYDEN R.T. Identification of clinical coryneform bacterial isolates : comparison of biochemical methods and sequence analysis of 16S rRNA and *rpoB* genes. *J Clin Microbiol.* (2008), 46(3) : 921-927.
109. FRENEY J., DUPERRON M.T., COURTIER C., HANSEN W., ALLARD F., BOEUFGRAS J.M., MONGET D. et FLEURETTE J. Evaluation of API Coryne in comparison with conventional methods for identifying coryneform bacteria. *J Clin Microbiol.* (1991), 29(1) : 38-41.

110. FUNKE G., RENAUD F.N.R, FRENEY J., et RIEGEL P. Multicenter evaluation of the updated and extended API (RAPID) Coryne Database 2.0. *J Clin. Microbiol.* (1997), 35(12) : 3122-3126.
111. GAVIN S.E., LEONARD R.B., BRISELDEN A.M. et COYLE M.B. Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *J Clin Microbiol.* (1992), 30(7) : 1692-1695.
112. SOTO A., ZAPARDIEL J. et SORIANO F. Evaluation of API Coryne system for identifying coryneform bacteria. *J Clin Pathol.* (1994), 47(8) : 756-759.
113. LINDENMANN K., VON GRAEVENITZ A. et FUNKE G. Evaluation of the Biolog system for the identification of asporogenous, aerobic gram-positive rods. *Med. Microbiol. Lett.* (1995), 4 : 287-296.
114. FUNKE G., PETERS K. et ARAVENA-ROMAN M. Evaluation of the RapID CB plus system for identification of coryneform bacteria and *Listeria* spp. *J Clin Microbiol.* (1998), 36(9) : 2439-2442.
115. HUDSPETH M.K., GERARDO S.H., CITRON D.M. et GOLDSTEIN E.J. Evaluation of the RapID CB Plus System for Identification of *Corynebacterium* species and other gram-positive rods. *J Clin. Microbiol.* (1998), 36 : 543-547.
116. AMEZIANE N., BOGARD M. et LAMORIL J. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.* Paris, Elsevier, 2005.
117. CLARRIDGE J.E. 3RD. 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.
118. WOO P.C., NG K.H., LAU S.K., YIP K.T., FUNG A.M., LEUNG K.W., TAM D.M., QUE T.L. et YUEN K.Y. Usefulness of the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA-based bacterial identification system for identification of clinically significant bacterial isolates with ambiguous biochemical profiles. *J Clin Microbiol.* (2003), 41(5):1996–2001.
119. KHAMIS A., RAOULT D. et LA SCOLA B. Comparison between rpoB and 16S rRNA gene sequencing for molecular identification of 168 clinical isolates of *Corynebacterium*. *J Clin Microbiol.* (2005), 43(4) : 1934-1936.
120. GenBank® (consulté le 27/08/09). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>
121. BIBI, Bio Informatic Bacterial Identification® (consulté le 27/08/09). <http://umr5558-sud-str1.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>
122. RDP, Ribosomal Database Project®. (consulté le 27/08/09). <http://rdp.cme.msu.edu/>
123. BOSSHARD P.P., ABELS S., ZBINDEN R., BÖTTGER E.C. et ALTWEGG M. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation). *J Clin Microbiol.* (2003), 41(9) : 4134-4140.
124. ALAUZET C., MORY F., CARLIER J.P., MARCHANDIN H., JUMAS-BILAK E. et LOZNIIEWSKI A. *Prevotella nanceiensis* sp. nov., isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol.* (2007), 57 : 2216-2220.
125. DRANCOURT M., BOLLET C., CARLIOZ A., MARTELIN R., GAYRAL J.P. et RAOULT D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* (2000), 38 : 3623-3630.
126. LPSN (consulté le 27/08/09). *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.* <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>
127. DUBREUIL L. Bactéries anaérobies strictes. *Bactériologie médicale : Techniques usuelles.* Paris, Masson, 2007.
128. YULI S., CHENGXU L. et SYDNEY M. F. Multiplex PCR for rapid differentiation of three species in the "*Clostridium clostridioforme* group". *FEMS Microbiol Lett.* (2005), 244(2) : 391-395.

129. DE LA MAZA L.M., PEZZLO M.T., PETERSON E.M. et SHIGEI J.T. *Color atlas of medical bacteriology*. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 2004.
130. COLEMAN N., SPEIRS G., KHAN J., BROADBENT V., WIGHT D.G. et WARREN R.E. Neutropenic enterocolitis associated with *Clostridium tertium*. *J Clin Pathol.* (1993), 46(2) : 180-183.
131. KOURTIS A.P., WEINER R., BELSON K. et RICHARDS F.O. Jr. *Clostridium tertium* meningitis as the presenting sign of a meningocele in a twelve-year-old child. *Pediatr Infect Dis J.* (1997), 16(5) : 527-529.
132. LEEGAARD T.M., SANDVEN P. et GAUSTAD P. *Clostridium tertium*: 3 case reports. *Scand J Infect Dis.* (2005), 37(3) : 230-232.
133. STEYAERT S., PELEMAN R., VANECHOUTTE M., DE BAERE T., CLAEYS G. et VERSCHRAEGEN G. Septicemia in neutropenic patients infected with *Clostridium tertium* resistant to cefepime and other expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol.* (1999), 37(11) : 3778-3779.
134. FEDORKO D.P. et WILLIAMS E.C. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* (1997) 35(5) : 1258-9.
135. BARBUT F., LALANDE V., DAPREY G., COHEN P., MARLE N., BURGHOFFER B., PETIT J.C. Usefulness of simultaneous detection of toxin A and glutamate dehydrogenase for the diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (2000), 19(6) : 481-484.
136. KUIPERS E.J. et SURAWICZ C.M. *Clostridium difficile* infection. *Lancet.* (2008), 371(9623) : 1486-1488.
137. LANDRY M.L., TOPAL J., FERGUSON D., GIUDETTI D. et TANG Y. Evaluation of biosite triage *Clostridium difficile* panel for rapid detection of *Clostridium difficile* in stool samples. *J Clin Microbiol.* (2001), 39(5) : 1855-1858.
138. PETERSON L.R., KELLY P.J. et NORDBROCK H.A. Role of culture and toxin detection in laboratory testing for diagnosis of *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* (1996), 15(4) : 330-336.
139. VONBERG R.P., KUIJPER E.J., WILCOX M.H., BARBUT F., TÜLL P., GASTMEIER P., VAN DEN BROEK P.J., COLVILLE A., COIGNARD B., DAHA T., DEBAST S., DUERDEN B.I., VAN DEN HOF S., VAN DER KOOI T., MAARLEVELD H.J., NAGY E., NOTERMANS D.W., O'DRISCOLL J., PATEL B., STONE S. et WIUFF C. Infection control measures to limit the spread of *Clostridium difficile*. *Clin Microbiol Infect.* (2008), 14(5) : 2-20.
140. RELLER M.E., LEMA C.A., PERL T.M., CAI M., ROSS T.L., SPECK K.A. et CARROLL K.C. Yield of stool culture with isolate toxin testing versus a two-step algorithm including stool toxin testing for detection of toxigenic *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol.* (2007), 45(11) : 3601-3605.
141. REYES R.C., JOHN M.A., AYOTTE D.L., COVACICH A., MILBURN S. et HUSSAIN Z. Performance of TechLab C. DIFF QUIK CHEK and TechLab C. DIFFICILE TOX A/B II for the detection of *Clostridium difficile* in stool samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* (2007), 59(1) : 33-37.
142. InVS, Institut national de veille sanitaire (consulté le 27/08/09). *Emergence d'infections digestives liées à Clostridium difficile de type 027, France, janvier à septembre 2006. Bilan au 19/09/2006.* http://www.invs.sante.fr/presse/2006/le_point_sur/clostridium_difficile_190906/index.html
143. BRAZIER J.S., MORRIS T.E. et DUERDEN B.I. Heat and acid tolerance of *Clostridium novyi* Type A spores and their survival prior to preparation of heroin for injection. *Anaerobe.* (2003), 9(3) : 141-144.

144. NOONE M., TABAQCHALI M. et SPILLANE J.B. *Clostridium novyi* causing necrotising fasciitis in an injecting drug user. *J Clin Pathol.* (2002), 55(2) : 141-142.
145. CASTIGLIONI B., GAUTAM A., CITRON D.M., PASCULLE W., GOLDSTEIN E.J., STROLLO D., JORDAN M. et KUSNE S. *Clostridium innocuum* bacteremia secondary to infected hematoma with gas formation in a kidney transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* (2003), 5(4) : 199-202.
146. DAVID V., BOZDOGAN B., MAINARDI J.L., LEGRAND R., GUTMANN L. et LECLERCQ R. Mechanism of intrinsic resistance to vancomycin in *Clostridium innocuum* NCIB 10674. *J Bacteriol.* (2004), 186(11) : 3415-3422.
147. MORY F., LOZNIEWSKI A., DAVID V., CARLIER J.P., DUBREUIL L. et LECLERCQ R. Low-level vancomycin resistance in *Clostridium innocuum*. *J Clin Microbiol.* (1998), 36(6) : 1767-1768.
148. CITRON D.M., MERRIAM C.V., TYRRELL K.L., WARREN Y.A., FERNANDEZ H. et GOLDSTEIN E.J. In vitro activities of ramoplanin, teicoplanin, vancomycin, linezolid, bacitracin, and four other antimicrobials against intestinal anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* (2003), 47(7) : 2334-2338.
149. PULVERER G., SCHÜTT-GEROWITT H. et SCHAAL K.P. Human cervicofacial actinomycoses: microbiological data for 1997 cases. *Clin Infect Dis.* (2003), 37(4) : 490-497.
150. RIEGEL P., RUIMY R., DE BRIEL D., PREVOST G., JEHL F., BIMET F., CHRISTEN R. et MONTEIL H. *Corynebacterium seminale* sp. nov., a new species associated with genital infections in male patients. *J Clin Microbiol.* (1995), 33(9) : 2244-2249.
151. RIEGEL P. et LEPARGNEUR J.P. Infection et fertilité : *Corynebacterium seminale* : point de vue du bactériologiste. *Andrologie* (2001), 11(3) : 155-159.
152. TAYLOR G.B., PAVIOUR S.D., MUSAAD S., JONES W.O. et HOLLAND D.J. 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.
153. MATHELIN C., RIEGEL P., CHENARD M.P., TOMASETTO C. et BRETTE J.P. Granulomatous mastitis and corynebacteria: clinical and pathologic correlations. *Breast J.* (2005), 11(5) : 357.
154. FUNKE G., PAGANO-NIEDERER M. et BERNAUER W. *Corynebacterium macginleyi* has to date been isolated exclusively from conjunctival swabs. *J Clin Microbiol.* (1998), 36(12) : 3670-3673.
155. FUNKE G., LAWSON P.A. et COLLINS M.D. *Corynebacterium riegellii* sp. nov., an unusual species isolated from female patients with urinary tract infections. *J Clin Microbiol.* (1998), 36(3) : 624-627.
156. PEEL M.M., PALMER G.G., STACPOOLE A.M. et KERR T.G. Human lymphadenitis due to *Corynebacterium pseudotuberculosis*: report of ten cases from Australia and review. *Clin Infect Dis.* (1997), 24(2) : 185-191.
157. COYLE M.B. et LIPSKY B.A. Coryneform bacteria in infectious diseases: clinical and laboratory aspects. *Clin Microbiol Rev.* (1990), 3(3) : 227-246.
158. WALLET F., LOIEZ C., RENAUX E., LEMAITRE N. et COURCOL R.J. Performances of VITEK 2 colorimetric cards for identification of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* (2005), 43 : 4402-4406.
159. MEUGNIER H., DAVIN-REGLI A., DE ROUGEMONT A., DAUWALDER O. et FRENEY J. Diagnostic moléculaire en bactériologie. *Précis de bactériologie clinique.* Paris, Editions Eska, 2007.

160. SONG Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*. (2005), 11 : 79-91.
161. BIMET F., CLERMONT D., BIZET C. La création d'une base de données à partir de spectres de spectrométrie de masse (MALDI-TOF) : intérêt des centres de ressources biologiques. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* (2009), 24(1) : 287-289.
162. CLAYDON M.A. MALDI-ToF-MS, a new and novel technique for studies of intact cells. *Anaerobe* (2000), 6 : 133-134.
163. DERUAZ D., RENAUD F. Techniques de chimie analytique appliquées à la bactériologie. *Précis de bactériologie clinique*. Paris, Editions Eska, 2007.
164. DORE J., NAZARET R., LOUCQ F., LUPE E., DERUAZ D. et RENAUD F.N.R. Etude taxonomique de quelques bactéries du genre *Corynebacterium* par la spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight) : répétitivité, reproductibilité. Mise en évidence d'une nouvelle espèce bactérienne. 2006, XII Colloque National de la Recherche dans les IUT, 1^{er} et 2 juin 2006, Brest (France).
165. FOX A. Mass spectrometry for species or strain identification after culture or without culture: past, present, and future. *J Clin Microbiol.* (2006), 44(8) : 2677-2680.
166. GIELEN J., ERHARD M., KALLOW W., KRÖNKE M. et KRUT O. Rapid pathogen identification by MALDI-TOF mass spectrometry/SARAMIS database in clinical microbiological routine diagnostics. 2007, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 31/03/2007, Munich (Allemagne).
167. GROSSE-HERRENTHEY A., MAIER T., GESSLER F., SCHAUMANN R., BÖHNEL H., KOSTRZEWA M. et KRÜGER M. Challenging the problem of clostridial identification with matrix-assisted laser desorption and ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Anaerobe* (2008), 14(4) : 242-249.
168. KEYS C.J., DARE D.J., SUTTON H., WELLS G., LUNT M., McKENNA T., McDOWALL M. et SHAH H. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infection, Genetics and Evolution* (2004), 4 : 221-242.
169. MOUSSAOUI W., BOUAKAZE C. et PREVOST G. Applications de la spectrométrie de masse MALDI-TOF à l'identification bactérienne. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* (2009), 24(1) : 293-302.
170. PREVOST G. Spectrométrie de masse et identification des micro-organismes. 2007, 8^{èmes} JNI, 13-15 juin, Dijon (France).
171. SCHAUMANN R., ROSENKRANZ C., SCHELLENBERGER W., RODLOFF C. et ESCHRICH K. Identification of *Clostridium* spp. by mass-spectrometric discrimination. 2008, Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 25-28 octobre 2008, Washington D.C. (Etats-Unis).
172. SHAH H.N., KEYS C.J., SCHMID O. et GHARBIA S.E. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and proteomics: a new era in anaerobic microbiology. *Clin Infect Dis.* (2002), 35(1) : 58-64.
173. STINGU C.S., RODLOFF A.C., JENTSCH H., SCHAUMANN R. et ESCHRICH K. Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS. *Oral Microbiol Immunol.* (2008), 23(5) : 372-376.
174. THOLOZAN J.L. et LORQUIN J. Spectrométrie de masse : principes, applications en biologie et microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* (2009), 24(1) : 282-286.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Liste des espèces revendiquées par la carte Vitek® 2 ANC

<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>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Corynebacterium ulcerans</i>
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Eggerthella lenta</i>
<i>Bacteroides stercoris</i>	<i>Eubacterium limosum</i>
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	<i>Fingoldia magna</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>Bacteroides vulgatus</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>Fusobacterium varium</i>
<i>Clostridium baratii</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Clostridium bifermentans</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>
<i>Clostridium butyricum</i>	<i>Microbacterium flavescens</i>
<i>Clostridium cadaveris</i>	<i>Parvimonas micra</i>
<i>Clostridium clostridioforme</i>	<i>Peptoniphilus asaccharolyticus</i>
<i>Clostridium difficile</i>	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
<i>Clostridium histolyticum</i>	<i>Prevotella bivia</i>
<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Prevotella buccae</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Prevotella disiens</i>
<i>Clostridium ramosum</i>	<i>Prevotella intermedia</i>
<i>Clostridium septicum</i>	<i>Prevotella melaninogenica</i>
<i>Clostridium sordellii</i>	<i>Prevotella oralis</i>
<i>Clostridium sporogenes</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>
<i>Clostridium subterminale</i>	<i>Propionibacterium granulosum</i>
<i>Clostridium tertium</i>	<i>Propionibacterium propionicum</i>
<i>Collinsella aerofaciens</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
	<i>Veillonella</i> spp

Espèces proches à considérer : *Actinomyces israelii/gerencseriae*, groupe *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium sporogenes/C.botulinum*, *Prevotella intermedia/P. nigrescens*

ANNEXE 2 : Composition de la carte Vitek® 2 ANC

Puits	Test	Abréviation
4	D-GALACTOSE	dGAL
5	Leucine ARYLAMIDASE	LeuA
6	ELLMAN	ELLM
7	Phenylalanine ARYLAMIDASE	PheA
8	L-Proline ARYLAMIDASE	ProA
10	L-Pyrrolydonyl-ARYLAMIDASE	PyrA
11	D-CELLOBIOSE	dCEL
13	Tyrosine ARYLAMIDASE	TyrA
15	Ala-Phe-Pro-ARYLAMIDASE	APPA
18	D-GLUCOSE	dGLU
20	D-MANNOSE	dMNE
22	D-MALTOSE	dMAL
28	SACCHAROSE/SUCROSE	SAC
30	ARBUTIN	ARB
33	N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE	NAG
34	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucoside	BGLUi
36	UREASE	URE
37	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-glucuronide	BGURi
39	BETA-GALACTOPYRANOSIDASE Indoxyl	BGALi
41	ALPHA-ARABINOSIDASE	AARA
42	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-galactoside	AGALi
43	BETA-MANNOSIDASE	BMAN
44	ARGININE GP	ARG
45	PYRUVATE	PVATE
51	MALTOTRIOSE	MTE
53	ESCULIN hydrolyse	ESC
54	BETA-D-FUCOSIDASE	BdFUC
55	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-N-acetyl-glucosamide	BNAGi
56	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-alpha-mannoside	AMANi
57	ALPHA-L-FUCOSIDASE	AIFUC
59	PHOSPHATASE	PHOS
60	L-ARABINOSE	IARA
61	d-Ribose 2	dRIB2
62	Phenylphosphonate	OPS
63	ALPHA-L-ARABINOFURANOSIDE	AARAF
64	D-XYLOSE	dXLY

D'après bioMérieux « Vitek® 2 Product systems information » (juin 2007)

ANNEXE 3 : Inventaire des tests additionnels proposés par la carte Vitek[®] 2 ANC

Test	Matériel requis (27) (non exhaustif)	Temps requis (27)
Ramifications	Colorants de Gram, microscope optique	quelques minutes
Extrémités effilées		
Catalase	H ₂ O ₂ (15 %)	quelques minutes
Fermentation d'hydrates de carbone ^a	Bouillon additionné de 1 % d'hydrate de carbone ou éventuellement galerie API 20 A [®]	au moins 24 h
Hydrolyse de l'esculine	Comprimé Esculine Hydrolyse (RD [®]) ou bouillon	4-24 h Au moins 24 h
Indole	Spot test : comprimé (RD [®]) Test en bouillon : milieu indole-nitrate	quelques minutes au moins 24 h
Uréase	Comprimé urée (RD [®])	4-24 h
Réduction des nitrates	Comprimé nitrate (RD [®]) ou bouillon indole-nitrate	24-48 h
Hydrolyse de la gélatine	Tube de gélatine ou éventuellement galerie API 20 A [®]	au moins 24 h
Lécithinase	Gélose au jaune d'oeuf	24-72 h
Lipase	Gélose au jaune d'oeuf	48 h-1 semaine

^a L-arabinose, D-cellobiose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, lactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, D-raffinose, L-rhamnose, saccharose, amidon, D-tréhalose, salicine, xylose, xylane

RD[®] : disponible en comprimé Rosco Diagnostica[®]

ANNEXE 4 : Comparaison des performances des systèmes commercialisés d'identification biochimique des bactéries anaérobies et des corynébactéries pour l'identification des taxons revendiqués par la carte Vitek® 2 ANC

Bactéries du genre *Bacteroides*

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :																					
	API 20 A®				Rapid ID 32 A®								RapID ANA II®		BD Crystal® ANR ID				M	Vitek® 2 ANC		
	59	60	62	63 ^a	69	70	73	75	76	77	78	80	85	86	78 ^b	78 ^c	89	90	92	104	105	106
<i>B. caccae</i>							100 (3)	62 (8)	67 (3) 100*	100 (3)		100 (1)		67 (3)				100 (2)		100 (3)	100 (3)	96 (98)
<i>P. distasonis</i>	40 (5)		(12)		89 (9)		100 (11)	83 (48)	100 (9)	25 (4) 75*	50 (6) 67*	60 (5) 80*	100 (10)	100 (19)	83 (6)	83 (6) 100*	100 (2)	50 (4)	(7)	100 (5)	100 (7)	98 (107)
<i>B. fragilis</i>	94 (49)	93 (15)	(32)	100 (18)	87 (24)		100 (12)	91 (736)	93 (28) 100*	96 (51) 98*	88 (17)	100 (10)	100 (25)	93 (28)	53 (17) 65*	94 (17)	100 (10)	75 (12)	(20)	100 (20)	97 (40)	98 (423)
<i>B. ovatus</i>	100 ^d (1)	(6)	(16)		60 (5)		45 (11) 100*	0 (112)	0 (11) 100*	20 (5) 100*	0 (1)	40 (5) 100*	10 (10)	3 (29)	0 (1) 100*	0 (1) 100*	60 (5) 100*	33 (3)	(7)	100 (5)	100 (8)	99 (72)
<i>B. stercoris</i>							100 (3)	33 (6)		100 (1)	0 (1)				0 (1) 100*	100 (1)					100 (1)	98 (45)
<i>B. thetaiotaomicron</i>	67 ^d (21)	(7)	(24)	100 ^d (2)	60 (10)		70 (10)	92 (193)	88 (17) 100*	71 (14)	53 (17) 65*	33 (6) 67*	100 (10)	92 (24)	23 (17) 53*	12 (17) 41*	100 (10)	43 (7)	(10)	93 (14)	90 (21)	95 (146)
<i>B. uniformis</i>	100 (1)	(1)	(15)		60 (5)		33 (9) 100*	0 (106)		0 (5) 60*	0 (5) 100*		40 (5)	29 (14)	80 (5) 100*	100 (5)	100 (3)	100 (5)	(2)	100 (3)	100 (6)	98 (51)
<i>B. vulgatus</i>	100 (4)	(6)	(17)		100 (7)		100 (11)	66 (71)	100 (5)	80 (5)	60 (5)	80 (5)	100 (5)	70 (27)	80 (5) 100*	20 (5) 40*	100 (4)	86 (7)	(8)	100 (5)	100 (13)	97 (118)
<i>Bacteroides</i> groupe <i>fragilis</i>	84 (81)		67 (116)		80 (60)		79 (70) 96*	73 (1280)	78 (73) 100*	78 (88) 90*	58 (52) 73*	69 (32) 87*	81 (65)	65 (144)	50 (52) 71*	58 (52) 73*	94 (34) 100*	70 (40)	63- 57^e (54)	98 (55)	97 (99)	97 (1060)
<i>B. ureolyticus</i>				0 (5)	0 (1)	100 (24)				100 (4)		100 (4)	100 (2)	100 (12)				100 (3)	100 (4)	100 (6)	100 (1)	100 (38)

Bactéries du genre *Fusobacterium*

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :																			
	API 20 A®				Rapid ID 32 A®						RapID ANA II®		BD Crystal® ANR ID				M	Vitek® 2 ANC		
	59	60	62	63 ^a	69	70	76	77	78	80	85	86	78 ^b	78 ^c	89	90	92	104	105	106
<i>F. mortiferum</i>	0 (3)		(2)		0 (1)	57 (7)	25 (4) 75*	100 (2)		0 (1)		67 (3)				100 (3)	(1)	100 (2)	100 (3)	91 (68)
<i>F. necrophorum</i>	0 ^t (8)	0 ^t (1)	(3)	100 ^t (4)	0 (2)	0 (27) 74*	0 (1) 100*	0 (3) 100*	0 (4) 25*		25 (4)	50 (4) 100*	50 (4) 100*		89 (9)	(6)	100 (3)	71 (7)	90 (50)	
<i>F. nucleatum</i>	0 ^t (1)	0 ^t (11)	(19)	100 ^t (13)	0 (13)	44 (48)	0 (3) 67*	0 (14) 100*	0 (5)	100 (6)	0 (6)	9 (11)	0 (5) 100*	100 (5)	100 (2)	100 (7)	(7)	92 (12) 100*	86 (7)	77 (35)
<i>F. varium</i>			(10)			29 (7) 100*	0 (2) 50*	0 (3) 67*	0 (1)			100 (3)	0 (1)	0 (1)	100 (1)	100 (4)	(1)	100 (2)		84 (45)
<i>Fusobacterium spp.</i>	0 (12)		30 ^g (37)		0 (16)	30 (89) 58*	10 (10) 70*	9 (22) 86*	0 (10) 10*			33 (21)	20 (10) 90*	70 (10) 90*		96 (23)	73 (15)	95 (19) 100*	82 (17)	87 (198)

Bactéries du genre *Prevotella*

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :															
	API 20 A [®]		Rapid ID 32 A [®]						RapID ANA II [®]		BD Crystal [®] ANR ID		M	Vitek [®] 2 ANC		
	59	63 ^a	69	70	76	77	78	80	85	86	78 ^{bc}	90	92	104	105	106
<i>P. bivia</i>	50 (2)		100 (6)	78 (85) 98*	100 (5)	100 (6)	100 (1)	89 (9) 100*	100 (25)	100 (7)	100 (1)	89 (9)	(13)	70 (10) 90*	86 (7)	88 (139)
<i>P. buccae</i>			0 (1)	97 (33)	100 (2)	75 (4) 100*			100 (11)	0 (1)			(7)	100 (5)	100 (3)	97 (71)
<i>P. disiens</i>				97 (31)	100 (8)			100 (3)	100 (2)			100 (1)	(9)	100 (4)		98 (51)
<i>P. intermedia</i>			75 (12)	98 (67)	50 (4) 75*	100 (6)	80 (5)	100 (1)	94 (16)	100 (2)	40 (5) 80*	0 (1)		80 (5)	67 (3)	89 (44)
<i>P. melaninogenica</i>	0 ^h (2)	100 (9)	100 (4)	0 (10) 30*	0 (1) 100*	75 (4) 100*		0 (1) 100*	100 (8)	0 (3)				83 (6)	50 (4)	87 (52)
<i>P. oralis</i> groupe	100 ^h (1)		100 (2)	11 (18) 94*	0 (3) 100*			0 (1)	67 (3)	14 (7)			(2)	100 (6)	100 (1)	88 (25)
<i>Prevotella</i> spp.			84 (25)	80 (244) 95*	74 (23) 96*	90 (20) 100*		80 (15) 93*	97 (65)	50 (20)			84 (31)	86 (36) 92*	78 (18)	91 (382)

Bactéries du genre *Clostridium*

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :																							
	API 20 A®					Rapid ID 32 A®							RapID ANA II®			BD Crystal® ANR ID				M	Vitek® 2 ANC			
	59	62	63 ^a	66	67	68	69	76	77	78	80	82	68	85	86	78 ^b	78 ^c	89	90	92	104	105	106	
<i>C. baratii</i>											100 (1)							86 (7)			100 (1)	97 (30)		
<i>C. bifermentans</i>	(5)	(4)						50 (2) 100*	100 (2)			100 (36)			100 (3)			100 (2)		(3)	0 (2)	0 (5)	19 (68)	
<i>C. butyricum</i>	(2)	(3)						33 ⁱ (3) 67*	100 ⁱ (6)	0 ⁱ (1)	83 ⁱ (6) 100*			80 (10)			100 (2)	100 (8)	(4)	0 (5) 0*	0 (1)	0 (66)		
<i>C. cadaveris</i>	(2)	(3)						100 (1)			100 (1)		100 (5)	100 (7)					(2)	100 (6)	100 (3)	97 (62)		
<i>C. clostridioforme</i>		(5)	0 (2)			40 (20)			0 (2)		100 (1)	100 (1)	50 (20)	100 (1)	64 (25)				100 (8)	(3)	100 (6)	50 (4)	80 (56)	
<i>C. difficile</i>	(2)		0 (1)	54 / 95 ^j (37)	95 ^j (88)		23 (30)	25 (4) 100*	0 (10) 100*	0 (1)	0 (1)	0 (1) 100*		67 (3)	50 (8)	100 (1)	100 (1)	100 (10)	87 (8)	(11)	35 (20) 85*	75 (4)	48 (98)	
<i>C. histolyticum</i>	(1)								100 (2)		50 (2) 100*												98 (52)	
<i>C. paraputrificum</i>	(1)							0 (2) 100*	0 (2) 100*		0 (1) 100*		100 (1)	50 (2)			100 (5)					100 (3)	100 (5)	95 (37)

Bactéries du genre *Clostridium* (suite)

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :																								
	API 20 A®					Rapid ID 32 A®								RapID ANA II®				BD Crystal® ANR ID				M	Vitek® 2 ANC		
	59	60	62	63 ^a	65	65	68	69	76	77	78	80	82	65	68	85	86	78 ^b	78 ^c	89	90	92	104	105	106
<i>C. perfringens</i>	82 (17)	100 (4)	(29)	100 (10)			46 (11)	100 (19)	100 (7)	100 (16)	100 (7)	100 (2)	100 (49)		91 (11)	100 (7)	100 (19)	100 (7)	71 (7)	100 (10)	100 (8)	(11)	100 (10)	100 (32)	98 (213)
<i>C. ramosum</i>			(6)				70 (20)	0 (1)	83 (6)	33 (6)	100 (1)	0 (1) 100*			100 (20)	100 (5)	100 (20)	0 (1) 100*	0 (1) 100*	0 (2) 100*	100 (7)	(6)	80 (5)	91 (11)	83 (48)
<i>C. septicum</i>									0 (1) 100*			100 (1)				100 (2)	100 (3)			0 (2) 100*	75 (8)	(8)	100 (1)	87 (8)	96 (79)
<i>C. sordellii</i>	(3)		(4)						100 (6)	100 (2)		100 (1)				100 (2)	100 (1)				100 (8)	(4)	100 (2)	0 (2)	99 (101)
<i>C. sporogenes</i>	(4)				100 ^k (4)	25 (4)			67 (3)	50 (4)	0 (1) 100*	100 (10)	100 (4)		0 (2)	0 (1)	0 (1)	0 (1) 100*	100 (4)	0 (7)		(4)	25 (4)	0 (2)	63 (117)
<i>C. subterminale</i>			(3)						0 (1) 100*	25 (4)		100 (2)								0 (2)				0 (1)	82 (35)
<i>C. tertium</i>	(4)							0 (1)	0 (5) 100*	75 (4)	0 (1)	100 (1)			0 (3)	100 (4)	100 (1)	0 (1)	100 (10)	100 (9)	(6)	83 (6)	71 (7)	94 (67)	
<i>Clostridium</i> spp.	72 ^l (43)		62 ^m (63)						58 (41)	60 (60)	73 (11)	96 (113)		78 (51)	81 (31)	83 (103)	82 (11)	54 (11)	88 (49)	86 (78)	71- 65 ^{en} (69)	64 (70)	79 (86)	77 (1129)	
									98*	90*	82*	100*					91*	73*	96*				84*		

Bacilles à Gram positif non sporulés anaérobies

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes ¹ :																			
	API 20 A [®]			Rapid ID 32 A [®]					RapID ANA II [®]				BD Crystal [®] ANR ID					Vitek [®] 2 ANC		
	59	60	63 ^a	69	76	77	78	81	81	85	86	87	78 ^b	78 ^c	81	89	90	104	105	106
<i>A. israelii</i> / <i>A. gerencseriae</i>			50 (2)	100 (2)	100 (2)	100 (1)	0 (8) 25*	100 (8)	25 (8)	100 (1)		0 (8)	25 (8) 37*	0 (8) 25*	88 (8)	0 (3)	78 (9)	100 (4)	50 (2)	100 (41)
<i>A. meyeri</i>						100 (1)	0 (2)	100 (5)	100 (5)		0 (2)	70 (10)	50 (2) 100*	100 (2)	0 (5)	67 (6) 100*	100 (6)	100 (1)	100 (2)	96 (51)
<i>A. naeslundii</i>				0 (2)			0 (7)	17 (12)	0 (12)		0 (1)	0 (16)	0 (7)	43 (7)	67 (12)		67 (9)	100 (1)		88 (64)
<i>Bifidobacterium</i> spp.		0 (1)		56 (9)	80 (5) 100*	100 (1)	80 (5)			67 (3)	67 (3)		60 (5)	20 (5)			100 (3)	100 (5)	50 (4)	98 (50)
<i>C. aerofaciens</i>			0 (1)																	100 (30)
<i>E. lenta</i>		100 (3)	100 (4)	100 (2)	0 (8) 100*	33 (3)	0 (1)			71 (7)	69 (13)		0 (1)	0 (1)			80 (5)	100 (11)	100 (9)	98 (61)
<i>E. limosum</i>		100 (1)	0 (1)		0 (1) 100*						33 (3)						100 (1)	100 (1)	100 (3)	100 (55)
<i>L. acidophilus</i>					0 (2) 50*		0 (3)			50 (2)	100 (1)		0 (3)	33 (3) 100*		100 (1)				97 (30)
<i>L. gasseri</i>																			100 (2)	100 (26)
<i>P. acnes</i>	87 (8)	90 (10)	100 (4)		100 (11)	100 (10)	80 (5)			91 (23)	96 (25)		60 (5) 80*	100 (5)			100 (10)	100 (20)	97 (35)	93 (174)
<i>P. granulosum</i>							0 (3)						0 (3)	0 (3)			100 (7)	33 (3)		100 (20)
<i>P. propionicum</i>					100 (1)		0 (4)						50 (4)	50 (4) 100*		100 (2)				84 (25)
BGP non sporulés		87 (15)	75 (12)	60 (15)	60 (30) 97*	87 (16)	21 (38) 26*			83 (36)	78 (50)		29 (38) 37*	37 (38) 53*		58 (12) 75*	88 (50)	96 (46)	93 (57)	95 (627)

Cocci anaérobies

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :																		
	API 20 A®			Rapid ID 32 A®						RapID ANA II®		BD Crystal® ANR ID				M	Vitek® 2 ANC		
	59	60	63 ^a	69	72	76	77	78	80	85	86	78 ^b	78 ^c	89	90	92	104	105	106
<i>F. magna</i>				0 (5)	96 (24)	100 (7)	100 (6)	50 (4)	100 (5)	100 (13)	96 (27)	75 (4) 100*	25 (4) 100*	100 (9)		(5)	100 (5)	100 (14)	95 (95)
<i>P. micra</i>				100 (2)	58 (19)	100 (4)	100 (4)	100 (1)	100 (2)	100 (6)	100 (20)	100 (1)	100 (1)	100 (1)			100 (10)	100 (7)	100 (81)
<i>P. asaccharolyticus</i>	100 (9)	100 (1)	100 (3)	60 ^o (5)	100 (25)	100 ^o (3)	86 (7)	100 (1)	96 (24)	100 (24)	86 (29)	0 (1) 100*	0 (1)	100 (4)	100 (3)	(4)	100 (4)		93 (58)
<i>P. anaerobius</i>				100 (4)	100 (20)	100 (6)	86 (7)	0 (5)	100 (12)	100 (7)	62 (24)	60 (5)	60 (5)	100 (1)	100 (4)	(10)	100 (5)	100 (3)	99 (81)
<i>S. saccharolyticus</i>	0 (3)	100 (3)								100 (1)	100 (3)								98 (50)
CGP anaérobies				56 (16)	90 (88)	100 (20)	92 (24)	36 (11)	98 (43)	100 (51)	86 (103)	64 (11) 82*	45 (11) 73*	100 (15)		82 ^p (22)	100 (24)	100 (24)	97 (365)
<i>Veillonella</i> spp.	100 (7)	100 (5)	100 (10)	33 (6)		87 (8) 100*	67 (3) 100*	70 (10)	100 (9)	100 (9)	64 (14)	30 (10) 80*	80 (10)	100 (1)	100 (2)		100 (5)	100 (6)	100 (99)

Corynébactéries

Taxons	Pourcentage d'identification correcte initiale (nombre de souches testées) et après tests complémentaires* avec les systèmes :						
	API Coryne®	Biolog® GP2 Microplate	RapID CB Plus®		Vitek® 2 ANC		
	110	113 : 4-24h	114	115	104	105	106
<i>A. pyogenes</i>	100 (5)	67-100 (3)	0 (5)		100 (1)	100 (2)	97 (64)
<i>A. haemolyticum</i>	100 (5)	100-40 (5)	91 (11)	0 (1)	100 (7)	100 (4)	99 (69)
<i>C. amycolatum</i>	0 (46) 100*	0-0 (7)	71 (14)	100 (4)	100 (5)	100 (2)	95 (117)
<i>C. diphtheriae</i>	25 (24) 100*	43-86 (7)	85 (13)		100 (8)	33 (3)	92 (163)
<i>C. jeikeium</i>	80 (10) 100*	9-41 (22)	100 (12)	100 (11)	100 (8)	100 (10)	99 (142)
<i>C. minutissimum</i>	0 (13) 100*	62-62 (8)	64 (11)	100 (11)	100 (4)		84 (31)
<i>C. pseudodiphtheriticum</i>	100 (6)	83-100 (6)	100 (11)		100 (5)	100 (9)	99 (92)
<i>C. striatum</i>	0 (13) 85*	0-8 (13)	100 (12)	0 (2) 100*	80 (5)	95 (20)	92 (89)
<i>C. ulcerans</i>	100 (6)	100-0 (3)	100 (3)		100 (5)	100 (2)	100 (54)
<i>C. urealyticum</i>	100 (13)	25-0 (4)	100 (18)	100 (1)	100 (6)	80 (5)	95 (99)
<i>Corynebacterium</i> spp. et <i>Arcanobacterium</i> spp.	35 (141) 99*	33-41 (78)	85 (110)	90 (30) 97*	98 (54)	93 (57)	95 (920)
<i>Microbacterium flavescens</i>							100 (78)

■ Espèce non revendiquée par la base de données du système

En rouge, taux d'identification correcte initiale du groupe bactérien supérieur ou égal à 95 %

En vert, taux d'identification correcte initiale du groupe bactérien supérieur ou égal à 90 %

M : Système MicroScan Rapid Anaerobe®

BGP : Bacilles à Gram positif

CGP : Cocci à Gram positif

^a incubation de la galerie API 20 A® de 48 heures

^b croissance bactérienne sur gélose Columbia

^c croissance bactérienne sur milieu Schaedler

^d souches identifiées *B. ovatus*/*B. thetaiotaomicron*

^e lecture visuelle (premier nombre) – lecture avec l'AutoScan-4® (deuxième nombre)

^f souches identifiées *F. necrophorum*/*F. nucleatum*

^g comprend les résultats d'identification de trois souches de *Fusobacterium gonidiaformans*

^h souches identifiées *P. melaninogenica*/*P. oralis*

ⁱ souches identifiées *C. butyricum*/*Clostridium beijerincki*

^j résultats après 48 heures d'incubation de la galerie API 20 A®

^k souches identifiées *C. sporogenes*/*Clostridium botulinum*

^l comprend les résultats d'identification d'une souche de *Clostridium innocuum* et d'une souche de *Clostridium novyi* A

^m comprend les résultats d'identification de six souches de *Clostridium innocuum*

ⁿ comprend les résultats d'identification de trois souches de *Clostridium tetani* et de quatre souches de *C. innocuum*

^o souches identifiées *Peptoniphilus asaccharolyticus*/*Peptoniphilus indolicus* par le système

^p comprend les résultats d'identification de trois souches de *Veillonella parvula*