



Université Lille 2
Droit et Santé

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2013

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Evaluation des performances du spectromètre de masse MALDI
TOF Microflex LT Bruker comparées à celles du spectromètre
Vitek MS Biomérieux et démarche d'accréditation.**

Présentée et soutenue publiquement le 10 avril 2013
Par *Cécile NOCON*

Jury

Président : Monsieur le Professeur R.COURCOL
Assesseurs : Monsieur le Professeur L.DUBREUIL
Madame le Professeur A.DECOSTER
Madame le Docteur A.VACHEE
Monsieur le Docteur C.CATTOEN

Sommaire

| | |
|---|-----|
| Introduction : | 12 |
| Première partie : Généralités | 14 |
| Prise en charge d'un prélèvement bactériologique au laboratoire : | 14 |
| I. Identification bactérienne : | 16 |
| A. Méthodes d'orientation : | 16 |
| B. Identification traditionnelle par étude du métabolisme bactérien : | 17 |
| C. Automates : | 19 |
| D. Autres méthodes : | 20 |
| E. Méthodes de recours : La biologie moléculaire | 23 |
| II. La spectrométrie de masse : | 27 |
| A. Principe de la méthode d'identification : | 27 |
| III. Démarche d'assurance qualité pour les laboratoires de bactériologie : l'accréditation COFRAC | 30 |
| Objectifs | 34 |
| Seconde partie : partie expérimentale | 35 |
| I. Matériels et méthodes : | 35 |
| A. Matériels : | 35 |
| B. Méthodes : | 51 |
| II. Résultats : | 58 |
| A. Validation de méthode : Qualification du spectromètre de masse BRUKER : | 58 |
| B. Comparaison des performances des spectromètres BIOTYPER et VITEK MS : | 71 |
| III. Comparaisons des automates BRUKER et BIOMERIEUX en terme de praticabilité: | 84 |
| A. La technique de dépôt : | 84 |
| B. La démarche qualité des analyses : | 87 |
| Discussion : | 88 |
| Conclusion : | 98 |
| Référence: | 100 |
| Annexes: | 105 |
| Index des figures et tableaux: | 147 |
| Liste des abréviations : | 148 |

Introduction :

Depuis des décennies, les micro-organismes potentiellement en cause dans les manifestations cliniques infectieuses étaient identifiés par des techniques traditionnelles basées sur l'étude du métabolisme bactérien. Ces techniques présentaient certains inconvénients tels que de nécessiter plusieurs heures de délai d'analyse ou encore de devoir disposer de suffisamment de matériel biologique issu des cultures pour être réalisées.

Les premières études de l'identification des micro-organismes par la méthode d'analyse MALDI TOF (*matrix-associated LASER desorption and ionisation, time of flight*) ont débuté dans les années 1990. L'avènement de systèmes informatiques plus performants et la constitution de base de données ont permis la commercialisation en 2008 des premiers systèmes d'identification de routine aux laboratoires d'analyses médicale.

La technologie MALDI TOF ne nécessite qu'une petite quantité de colonie des cultures du micro-organisme et une goutte de matrice pour réussir à réaliser l'identification bactérienne en quelques minutes et pour un coût modéré.

Une abondante littérature vante les résultats obtenus par cette technique. Les études relèvent que cette technique a prouvé sa pertinence d'analyse pour les bactéries d'identification de routine en laboratoire de bactériologie (1–12). De récentes études ont également démontré que la technique MALDI TOF était prometteuse pour l'identification des micro-organismes difficiles à identifier (13), des levures (3,14–18), des anaérobies (19–21) et des micro-organismes de culture fastidieuse (13,22).

La spectrométrie de masse MALDI TOF est une nouvelle technique qui révolutionne la microbiologie et qui devrait prochainement remplacer la plupart des systèmes d'identification traditionnels.

Le Centre Hospitalier de Roubaix est équipé d'un spectromètre de masse VITEK MS® (BIOMERIEUX) et réalise les identifications bactériennes de première intention depuis novembre 2011.

Le Centre Hospitalier de Valenciennes est équipé depuis octobre 2012 d'un spectromètre de masse MALDI TOF MICROFLEX LT® commercialisé par la société BRUKER. L'objet de ce travail est de comparer les performances de l'automate MICROFLEX LT® par rapport à celles de l'automate VITEK MS® commercialisé par la société BIOMERIEUX ainsi que d'étudier les performances et la robustesse de la méthode dans le cadre d'une démarche d'accréditation.

Première partie : Généralités

Prise en charge d'un prélèvement bactériologique au laboratoire :

Les infections bactériennes sont des pathologies humaines fréquentes.

Elles se rencontrent régulièrement que cela soit en médecine de ville ou lors d'hospitalisation.

Leur gravité peut être très variable, de la simple infection locale facile à maîtriser sur un plan clinique à des infections gravissimes telles que les bactériémies voire les chocs septiques, engageant dans ce cas le pronostic vital.

Elles peuvent atteindre tout type d'organe : la peau ou les muqueuses, le système urinaire, le système pulmonaire, le système digestif, ou plus profondes atteignant le système cardiovasculaire avec les endocardites, ou infiltrant le système ostéo-articulaire.

Les données cliniques et de la littérature ont permis de mettre en évidence, selon l'origine anatomique du prélèvement, la fréquence d'isolement des divers micro-organismes auxquels sont attribuées les manifestations infectieuses. (23).

Il ressort par exemple que les infections du système urinaire sont très fréquemment causées par des entérobactéries (23–25), ou encore que les infections iatrogènes et les infections du site opératoire sont souvent associées aux bactéries du genre staphylocoque (26–29).

Dans le cas des infections digestives, la flore anaérobie peut être responsable des manifestations cliniques ou bien n'être qu'associée au micro-organisme responsable de la symptomatologie. Le principal rôle du biologiste consiste en la discrimination des bactéries responsables des manifestations infectieuses au sein d'une flore normale endogène commensale (30).

Le processus de prise en charge des prélèvements bactériologiques au laboratoire peut se décomposer en 5 étapes (31,32):

-le prélèvement : il doit être adapté au type de micro-organisme suspecté (en fonction des données de la littérature et des manifestations cliniques) et acheminé dans un délai le plus court possible selon les pratiques du laboratoire.

-l'ensemencement : les milieux de culture (solides ou liquides) sont choisis en fonction du micro-organisme que l'on cherche à mettre en évidence. Il est donc pris en compte l'origine anatomique du prélèvement, le type de manifestation clinique, la nature du prélèvement (seringue, écouvillons...), mais également les exigences métaboliques et nutritionnelles des micro-organismes potentiellement impliqués.

-la culture : les milieux sont ensuite incubés dans des étuves à environ 35°C, sous CO₂ ou sous atmosphère anaérobie si la culture de la bactérie suspectée le nécessite. Le temps nécessaire à la culture est en général d'une douzaine d'heures avant que les colonies soient interprétables d'un point de vue morphologique.

-l'identification : l'orientation de l'identification de la bactérie se fait en fonction de l'aspect morphologique des colonies bactériennes et du type de milieu sur lequel elle se développe. Les milieux de cultures sur lesquels elle se développe, permettent de connaître certaines caractéristiques métaboliques du micro-organisme. L'aspect du micro-organisme à la coloration de GRAM oriente l'identification.

-l'antibiogramme : réalisé en milieu liquide ou solide. Il consiste à tester la capacité de croissance de la bactérie en présence de différentes molécules antibiotiques, afin de prédire la probabilité d'échec ou de succès thérapeutique de l'utilisation de ces molécules.

I. Identification bactérienne :

A. Méthodes d'orientation :

Après ensemencement du prélèvement, une culture du micro-organisme potentiellement en cause dans les manifestations infectieuses est obtenue. A partir d'une colonie des cultures de ce micro-organisme, une orientation permet de guider la démarche d'identification selon le type respiratoire de la bactérie (aérobie ou anaérobie, favorisée par l'incubation sous CO₂...) ainsi que selon ses caractères culturels et ses exigences (milieux de cultures sur lesquels elle parvient à se développer).

Ensuite 2 étapes permettent d'orienter l'identification :

1. *La coloration de GRAM :*

Elle permet de déterminer la morphologie (cocci ou bacille) et le type de paroi de la bactérie (Gram positif ou Gram négatif). Cependant, les résultats de ce test peuvent varier au sein d'une colonie pour un même microorganisme, en fonction de l'ancienneté de la culture, ou en raison d'altérations morphologiques des bactéries qui modifient leurs affinités tinctoriales. Ces différents paramètres peuvent rendre l'interprétation de ce test parfois délicate.

2. *Les tests rapides d'orientation :*

L'étude de l'aspect des colonies sur gélose ainsi que la capacité de croissance sur des milieux sélectifs, pouvant être complétée par l'observation de la mobilité entre lame et lamelle, fournissent des éléments d'orientation étiologique. La réalisation de tests rapides directement à partir des colonies bactériennes tels que l'oxydase et la catalase, oriente l'identification selon les caractéristiques du métabolisme bactérien.

B. Identification traditionnelle par étude du métabolisme bactérien :

1. Principe de fonctionnement des galeries d'identification :

Chaque espèce bactérienne possède des substrats préférentiels et exprime des caractéristiques métaboliques propres à son mode de vie. Ces caractères métaboliques définissent des groupes à la base de la taxonomie bactérienne.

Les industriels ont créé des galeries constituées de cupules remplies de substrats lyophilisés que l'on réhydrate par une suspension mono-bactérienne de concentration standardisée dans un bouillon prédéfini.

Après incubation d'une durée de 12 heures, la croissance bactérienne fournit un profil réactionnel que l'on peut lire de façon manuelle ou automatisée.

Pour aboutir à une identification, ce profil est ensuite comparé à une base de données du fournisseur qui a été établie à partir de souches de référence.

L'analyse automatisée fournit l'indice de confiance en pourcentage en fonction du degré de similitude entre le profil de la souche étudiée et celui de la souche de référence dont il se rapproche le plus.

Il faut être prudent quant à l'interprétation des résultats car la nature des milieux de culture peut influencer l'expression ou non des caractéristiques de la souche, et donc perturber l'analyse des caractères métaboliques.

Il faut également s'assurer de la concordance de l'identification avec les éléments d'orientation diagnostique.

2. Galeries d'identifications basées sur l'analyse du métabolisme bactérien :

Il faut disposer d'un isolat bactérien suffisant et respecter un délai de culture de 24-48h à 37°C avant la lecture.

La lecture est réalisée soit par mesure de la turbidimétrie qui est proportionnelle à la croissance bactérienne, soit par virage colorimétrique par la génération lors du métabolisme bactérien d'un substrat coloré.

A titre d'exemple, les galeries API® commercialisées par la société BIOMERIEUX sont une miniaturisation de ces techniques (figure 1).



Figure 1: exemple de galerie API®

3. Galeries d'identifications basées sur des tests enzymatiques :

Le temps d'incubation est de 4 à 6 heures.

Elles permettent un délai de lecture plus rapide en raison de l'absence de nécessité de culture puisqu'elles fonctionnent par détection de la présence ou de l'absence d'enzyme préexistant dans l'inoculum bactérien.

Ces galeries sont miniaturisées et commercialisées. Exemple : rapID® (BIOMERIEUX) (figure 2).



Figure 2: exemple de galerie rapID 32®

En revanche, il faut une quantité suffisante de colonies bactériennes car elles nécessitent un inoculum plus important.

C. Automates :

1. Supports d'identifications automatisées :

L'analyse et la lecture des tests biochimiques peuvent aussi être automatisées.

Des appareils travaillant en milieu liquide (exemple : Vitek2 ® BIOMERIEUX, BD PHOENIX®) permettent à partir d'une suspension bactérienne standardisée, d'automatiser et d'optimiser les étapes d'inoculation, d'incubation, de lecture et d'interprétation des tests.

Selon les résultats des tests d'orientation, le laboratoire choisit la « carte » (figure 3) d'identification la plus adaptée et qui regroupe la majorité des tests nécessaires à une identification précise de la bactérie. Par comparaison des résultats obtenus à la base de données informatisée de l'automate, le logiciel propose une identification avec un score de fiabilité.

Cette technique est actuellement la plus utilisée en pratique courante.

Elle tend cependant à être supplantée par la spectrométrie de masse qui permet, en particulier dans les laboratoires ayant une forte activité, de rendre dans un délai plus rapide et avec une bonne sensibilité les résultats des identifications bactériennes (2,6,7,10,12,33).

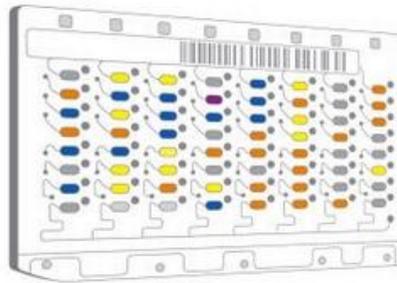


Figure 3: exemple de carte VITEK 2

D. Autres méthodes :

1. *Technique d'agglutination :*

L'identification bactérienne peut également se faire en recherchant certains antigènes spécifiques de l'espèce. Le principe est basé sur une réaction d'agglutination fonctionnant grâce à un anticorps spécifique contenu dans le réactif réagissant vis-à-vis d'antigènes de surface de la bactérie à identifier.

La technique nécessite une culture primaire afin d'obtenir des colonies du micro-organisme à identifier. Les colonies sont mises en contact avec le réactif contenant les anticorps spécifiques d'une espèce. Dans le cas où les anticorps spécifiques reconnaissent les antigènes bactériens, il se produit alors une réaction d'agglutination.

Seules certaines espèces sont identifiables par cette méthode. Par exemple il existe dans le commerce des kits pour identification de *Streptococcus pneumoniae*, des espèces groupables du genre *Streptococcus*, de *Staphylococcus aureus* (figure 4), des légionelles....

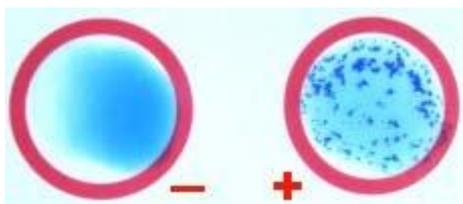


Figure 4: Test d'agglutination d'un *Staphylococcus*.

Il est à préciser que ce principe d'agglutination permet également de réaliser le typage de certaines souches déjà identifiées, en général dans un but épidémiologique tel que le typage des méningocoques, des salmonelles ou de *Listeria* par exemple.

2. Technique de diagnostic rapide immuno-chromatographique:

La séquence d'analyse bactériologique classique des prélèvements se déroulant avec examen microscopique suivi d'une mise en culture puis enfin d'une identification, constitue la majorité des méthodes bactériologiques réalisées au laboratoire. Cependant cette séquence de travail demande plusieurs jours et pour certaines infections graves, dans lesquelles le délai de mise en place d'une antibiothérapie efficace est crucial, l'identification rapide de la bactérie responsable présente un intérêt majeur. De même, dans le cas de bactéries de culture fastidieuse et délicate, ces tests rapides constituent un moyen de diagnostic particulièrement intéressant.

Plusieurs techniques permettant de rechercher des antigènes bactériens spécifiques directement sur le prélèvement sont actuellement commercialisées.

Les tests commercialisés sont généralement basés sur des techniques immuno-enzymatiques ou d'agglutination ou de tests immuno-chromatographiques.

En pratique de routine en laboratoire de biologie médicale, les dépistages urinaires à la recherche d'antigène spécifique de *Streptococcus pneumoniae* et/ou de *Legionella*

pneumophila directement sur les urines du patient (34), ou encore la recherche des toxines de *Clostridium difficile* directement sur les selles diarrhéiques se sont généralisés (35). Ils sont très simples d'utilisation et permettent d'identifier très rapidement la bactérie responsable (quelques dizaines de minutes).

Dans le cas d'une technique basée sur un test immuno-chromatographique, le principe est basé sur la migration de microparticules le long d'une membrane. L'échantillon est déposé à l'une des extrémités de la bande de test. L'échantillon va migrer le long de la membrane par capillarité et, s'il contient le micro-organisme recherché, les antigènes du micro-organisme seront alors immobilisés par l'interaction antigène-anticorps et révélés à l'endroit spécifique de la bande test où sont fixés des anticorps spécifiques de l'espèce. La réponse obtenue est qualitative (oui/non)(figure 5).

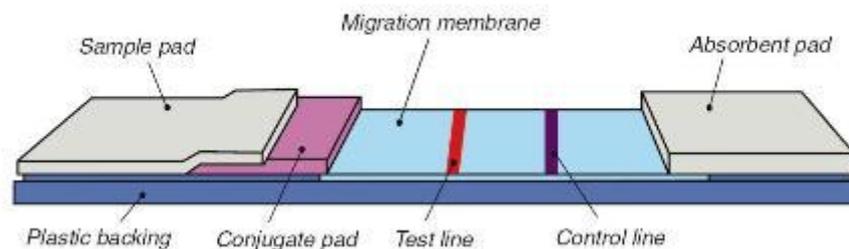


Figure 5: schématisation d'une bandelette de test immunochromatographique. Test rapid INDICIA BIOTECHNOLOGY

E. Méthodes de recours : La biologie moléculaire

Il arrive que malgré la mise en place des techniques d'identifications sus citées il ne soit pas possible d'obtenir un diagnostic de certitude.

Il est alors nécessaire de recourir à des techniques longues et coûteuses et donc limitées à certains laboratoires et à certaines recherches. Cependant, certaines techniques en « kit » se développent et sont désormais accessibles à tous les laboratoires.

1. Recherche de matériel génétique bactérien dans un prélèvement bactériologique:

De la même façon que pour les diagnostics rapides par techniques immunochromatographique, il est possible de réaliser un diagnostic moléculaire directement à partir du prélèvement. Des techniques de PCR recherchant spécifiquement des gènes bactériens dans l'échantillon primaire ont été développées (36,37).

On peut citer la recherche de *Bordetella pertussis* directement sur aspiration nasopharyngée, qui est actuellement la méthode la plus utilisée pour le diagnostic de la coqueluche, ou encore la réalisation de PCR à la recherche de *Staphylococcus aureus* directement à partir de prélèvements ostéo-articulaires (à titre d'exemple le système GeneXpert® Cepheid) (38,39).

La PCR constitue par ailleurs la seule alternative pour mettre en évidence des bactéries impossibles à cultiver.

Certaines techniques de dépistage, réalisées directement sur le prélèvement, sont basées sur la recherche d'ARN 16S bactérien. En cas de dépistage positif, ces techniques peuvent être complétées par amplification et séquençage pour identification du micro-organisme impliqué.

Ces techniques de biologie moléculaire permettent généralement un diagnostic en quelques heures mais nécessitent toutefois un laboratoire équipé, un personnel formé et restent coûteuses pour certaines d'entre elles.

Elles constituent un outil diagnostique intéressant et performant et devraient encore se développer. Cependant, ces techniques restent limitées sur un certain nombre de points, notamment des performances variables d'un test à l'autre, et le fait que ces techniques ne permettent pas d'obtenir la souche bactérienne et donc de réaliser un antibiogramme si besoin.

2. Identification à partir d'une culture bactérienne :

a. Le séquençage de l'ARN16S :

A partir d'une souche isolée en culture, les méthodes de biologie moléculaire permettent une identification précise de l'espèce bactérienne par amplification spécifique de l'ADN bactérien (13,40–43)(36,40,41). Le gène le plus souvent utilisé est le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S spécifique des bactéries. Il comporte des régions communes à toutes les bactéries mais également des régions variables uniques et propres à chaque espèce.

Les amorces de PCR sont donc créées à partir des séquences communes et le séquençage qui en découle est caractéristique de l'espèce.

La technique est basée sur l'incorporation à l'échantillon contenant le germe à identifier d'une séquence d'amorce universelle (courte chaîne de nucléotide complémentaire de la séquence d'ADN connue à amplifier) qui se fixe en amont de la zone d'intérêt à séquencer. Cette amorce permet l'accrochage de l'enzyme de synthèse qu'est l'ADN polymérase.

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre de succession des nucléotides composant la séquence ADN. Pour cela lors de la synthèse d'ADN par l'ADN polymérase sont ajoutés des desoxyribonucléotides dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) auxquels sont mélangés des nucléotides particuliers : les didesoxyribonucléotides ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par quatre fluorochromes différents.

Lorsque l'ADN polymérase incorpore un ddNTP, la synthèse du brin s'arrête car l'incorporation d'un nouvel dNTP est impossible. L'incorporation aléatoire de ddNTP permet

d'obtenir des fragments d'ADN de taille variable. Le séquenceur sépare les fragments d'ADN obtenus selon leurs tailles par chromatographie et détecte la fluorescence.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un électrophorégramme (figure 6).

Le gène est amplifié et ensuite comparé à des bases de données permettant d'obtenir l'identification de la bactérie au rang de genre ou de façon plus précise au rang de l'espèce en fonction du pourcentage d'homologie de celui-ci avec la souche de la base de données.

Il est également possible d'utiliser une combinaison d'amorces afin d'obtenir une identification plus discriminante.

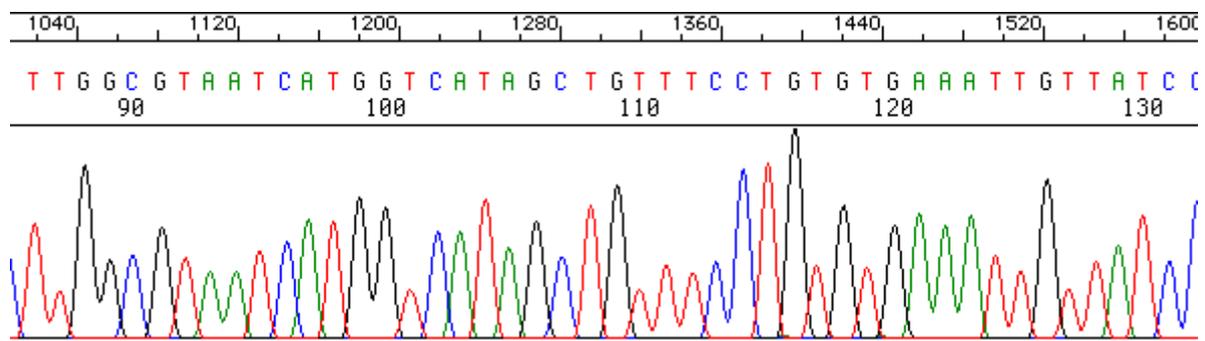


Figure 6: exemple d'électrophoregramme.ead.univ-angers.fr

b. Puce à ADN :

Le principe de fonctionnement d'une puce à ADN est de fixer par hybridation les fragments spécifiques de la souche testée avec une séquence spécifique complémentaire de celle-ci qui est fixée sur un support (figure 7).

La multiplication des sondes sur une petite surface comme une membrane de nylon permet de tester simultanément plusieurs séquences spécifiques d'espèce et d'obtenir ainsi l'identification de la souche testée.

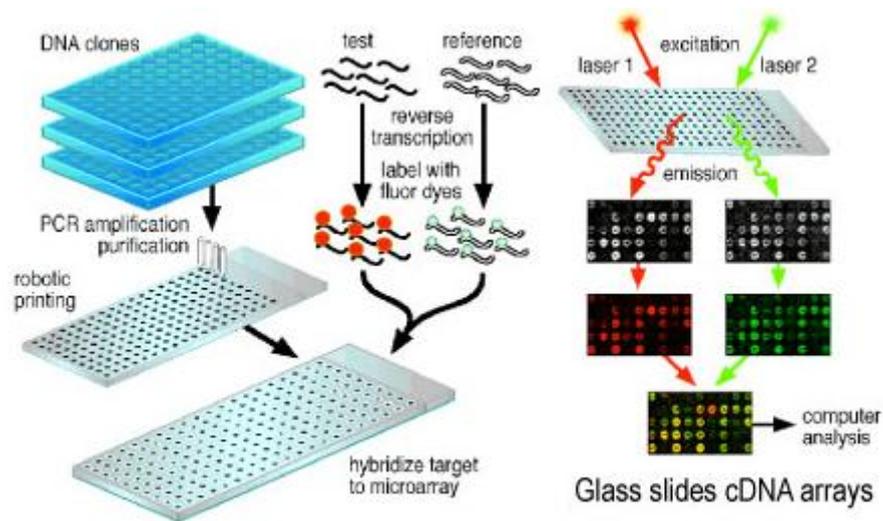


Figure 7: illustration du fonctionnement des puces ADN.

II. La spectrométrie de masse :

A. Principe de la méthode d'identification :

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix-associated LASER desorption and ionisation, time of flight*) (44) est une technique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules par mesure de leur « temps de vol » (proportionnel à leur masse et à leur charge).

Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

Le spectromètre de masse comporte une source d'ionisation (le laser) suivie d'un analyseur qui sépare les ions produits selon leur rapport m/z , d'un détecteur qui compte les ions, et enfin d'un système informatique pour traiter le signal.

Le résultat obtenu est un ensemble de pics ou spectre de masse (figure 8) représentant les rapports m/z des ions détectés selon l'axe des abscisses et l'intensité relative de ces ions selon l'axe des ordonnées.

Ce spectre de masse peut alors être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil et semble spécifique d'espèce.

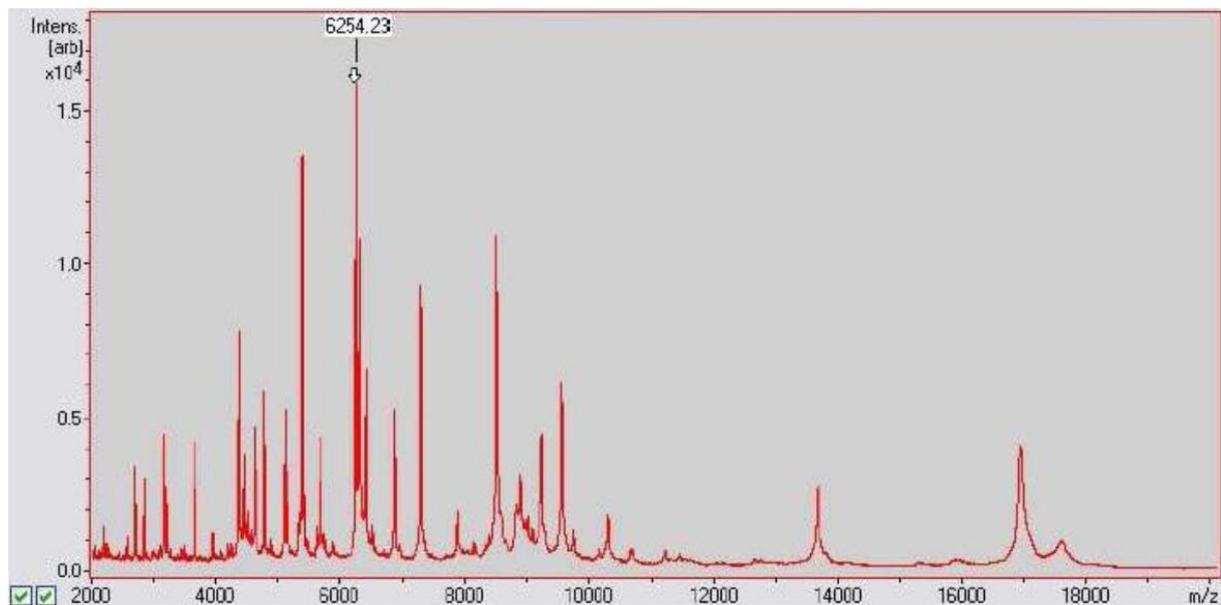


Figure 8: exemple de spectre (*E.coli*)

1. Appareillage : le spectromètre de masse

L'appareillage est constitué schématiquement de 4 parties (figure 9):

Une chambre d'ionisation associée à une source de type laser à azote, permettant de générer des ions en phase gazeuse.

Un analyseur de type « TOF » (time of flight) constitué d'un tube libre de tout champ magnétique, permettant la séparation des ions après une phase d'accélération.

Un détecteur de particules permettant la réception et la transformation du courant ionique en un courant électrique, puis sa représentation sous forme d'un spectre de masse.

Une unité informatique comportant les logiciels d'acquisition, de traitement et de comparaison des spectres obtenus à sa base de données.

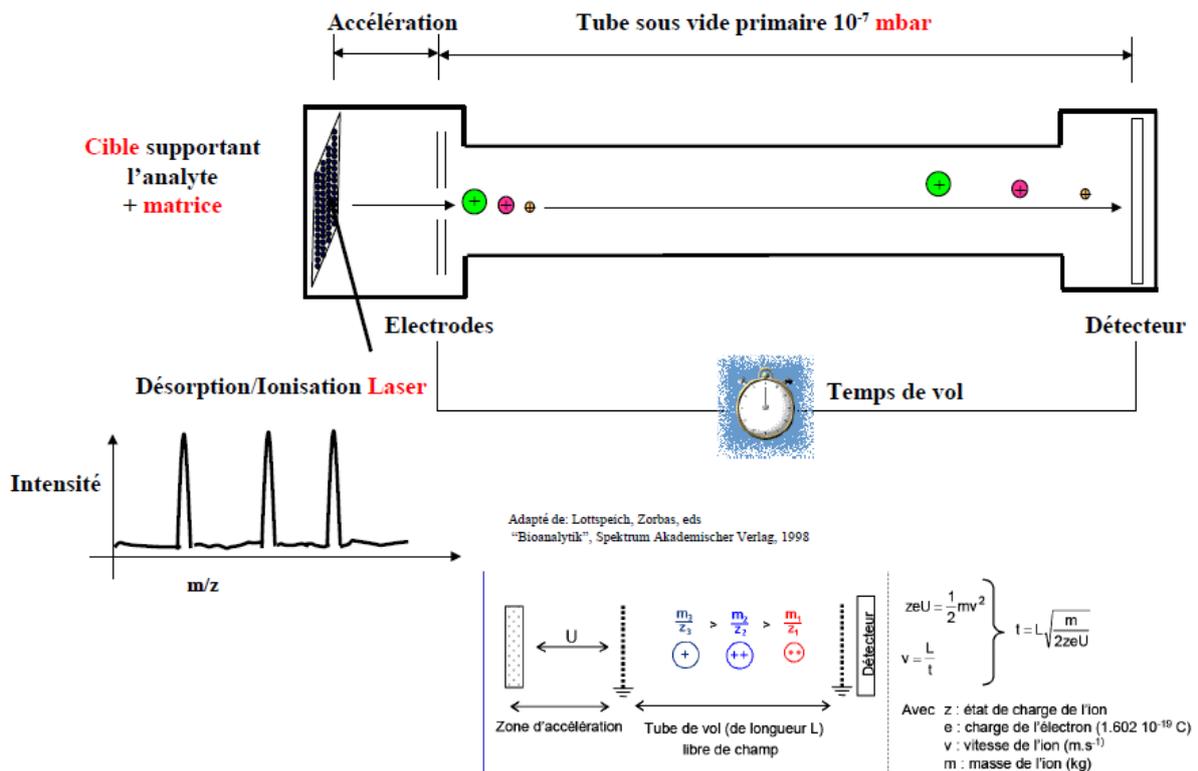


Figure 9: schématisation du principe MALDI TOF (BRUKER)

2. Processus analytique

Le processus peut se résumer en 3 étapes :

-l'ionisation :

Le frottis cocrystallisé avec la matrice permet la diffusion homogène du rayonnement de la source d'ionisation (dans notre cas d'un faisceau laser à azote).

Les molécules de matrice absorbent l'énergie transmise par le laser sous forme de photons UV, s'excitent et s'ionisent.

-la séparation des ions :

L'énergie absorbée par la matrice provoque sa dissociation et sa désorption.

Les molécules de matrice ionisées transfèrent leur charge à l'échantillon.

L'expansion de la matrice entraîne l'échantillon au sein de la phase gazeuse dense où il finira de s'ioniser.

Les composés ionisés issus des protéines bactériennes vont être accélérés par un champ électrique dans une colonne, avant de pénétrer dans un tube de vol, libre de tout champ permettant de séparer les molécules selon leur rapport m/z .

-la détection :

Celle-ci est réalisée grâce à un multiplicateur d'électrons. Le signal est amplifié par la formation d'électrons secondaires à l'aide de tubes en verre dopés au plomb (dynode).

Lorsqu'un composé ionisé entre dans un canal et percute sa paroi, il provoque l'émission de plusieurs électrons qui sont accélérés par la tension de polarisation. Les électrons émis vont à leur tour frapper la paroi et provoquer l'émission d'autres électrons.

Ainsi, plus la quantité d'ions de rapport m/z est importante, plus le nombre d'électrons secondaire est important et plus l'intensité du pic de même rapport m/z est importante.

Les pics enregistrés sont représentés sous la forme d'un spectre, spécifique d'espèce.

Ce spectre de masse peut alors être comparé aux milliers de spectres de référence contenus dans la base de données de l'appareil.

III. Démarche d'assurance qualité pour les laboratoires de bactériologie : l'accréditation COFRAC

La biologie médicale est un élément central du parcours de soins des patients, déterminant pour environ 60% des diagnostics, et un élément fondamental du suivi des pathologies et des thérapeutiques.

L'ordonnance n° 2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale est la référence législative qui s'applique à tous les laboratoires de biologie médicale français. La réforme de la biologie médicale est l'aboutissement d'études de l'inspection générale des affaires sociales. La réforme entraîne la nécessité d'une traçabilité de la qualité des examens de biologie médicale réalisés et comporte deux mesures phares :

-la médicalisation : le but étant de réaffirmer le rôle du biologiste médicale au sein du parcours de soins.

-l'accréditation : démarche qui permet de s'assurer que les laboratoires d'analyses médicales ont mis en place une organisation optimale et sont titulaires d'une compétence prouvée pour la réalisation des examens de biologie médicale.

L'accréditation est obligatoire depuis le vote de la loi « Hopital, patients, santé et territoire ». Elle vise à garantir la qualité et est fondée sur les normes européennes ISO 15189 et ISO 22870.

L'accréditation est obtenue par l'approbation du COFRAC (Comité Français d'Accrédiation) qui est chargé de définir les exigences et d'évaluer la mise en œuvre des procédures.

Il existe plusieurs types de portées d'accréditations : les portées A et les portées B. Les différentes portées d'accréditations sont de flexibilité croissante et doivent être adaptées aux besoins du laboratoire.

De manière générale, il existe les portées A, pour lesquelles le laboratoire est accrédité sur des méthodes normalisées. En fonction du type de portées A1, A2 ou A3, le laboratoire peut de manière croissante obtenir la capacité d'adapter des méthodes normalisées et de les mettre en œuvre sans évaluation préalable. Ainsi que de mettre en œuvre toute méthode basée sur un principe déjà évalué.

Dans le cadre d'une portée B, le laboratoire a la nécessité de démontrer qu'il est compétent pour adapter et développer des méthodes dans le cadre d'une portée générale définie. Le laboratoire accrédité en portée B pourra mettre en œuvre toute méthode entrant dans le cadre de la portée générale définie, sans nécessité de réévaluation par un auditeur COFRAC de ses compétences.

Dans le cadre de la démarche d'accréditation, l'une des possibilités est d'assurer une portée flexible standard A pour l'intégration de l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® du fournisseur BRUKER dans le cas du fonctionnement du laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier de Valenciennes. La validation de méthode selon une portée flexible standard A consiste en une vérification sur site pour s'assurer que les performances annoncées et souhaitées sont atteintes dans les conditions de travail du laboratoire de bactériologie.

Dans le cadre du dossier de validation des performances de la méthode, les paramètres à vérifier sont :

| Paramètre à vérifier | Bibliographie | Vérification sur site Portée A |
|--|---------------|-----------------------------------|
| Spécificité | Oui | Non |
| Sensibilité | Oui | Non |
| Contamination | Oui | Oui |
| Stabilité réactifs | Oui | Non |
| Robustesse | Oui | Non |
| Comparaison/tech réf | Oui | Non |
| Comparaison/ tech utilisée au laboratoire | Oui | Oui, si possible |

La validation de méthode de cette analyse qualitative est très solidement consolidée par la littérature. De nombreuses publications bibliographiques témoignent en faveur de la fiabilité et de la pertinence d'analyse du spectromètre de masse (1,2,6–8,11,12,20,33,45).

Dans le cadre du dossier de validation il est nécessaire de maîtriser les risques selon la méthode des « 5M » liés à (46,47) (figure 10):

- La main d'œuvre : les modalités de maîtrise sont assurées par la formation et l'habilitation du personnel technique.
- Le matériel : les maintenances ont été programmées et sont réalisées périodiquement par le fournisseur, ainsi que l'entretien des cibles selon le protocole établi, permettant d'encadrer ce risque.
- Le milieu : le risque est limité par le respect des conditions d'environnement (température ambiante, humidité, empoussièrement...) recommandées par le fournisseur.
- La matière : les réactifs préconisés par le fournisseur et l'étude de l'impact des milieux de culture, ainsi que le choix des colonies, permettent d'atteindre cet objectif.

- La méthode : la rédaction de procédures sur la technique d'utilisation, de fonctionnement et la conduite à tenir dans le cadre de l'interprétation des résultats ont été réalisées. La validation de méthode est encadrée par la réalisation de contrôles de qualité internes et la participation à des contrôles de qualité externes.

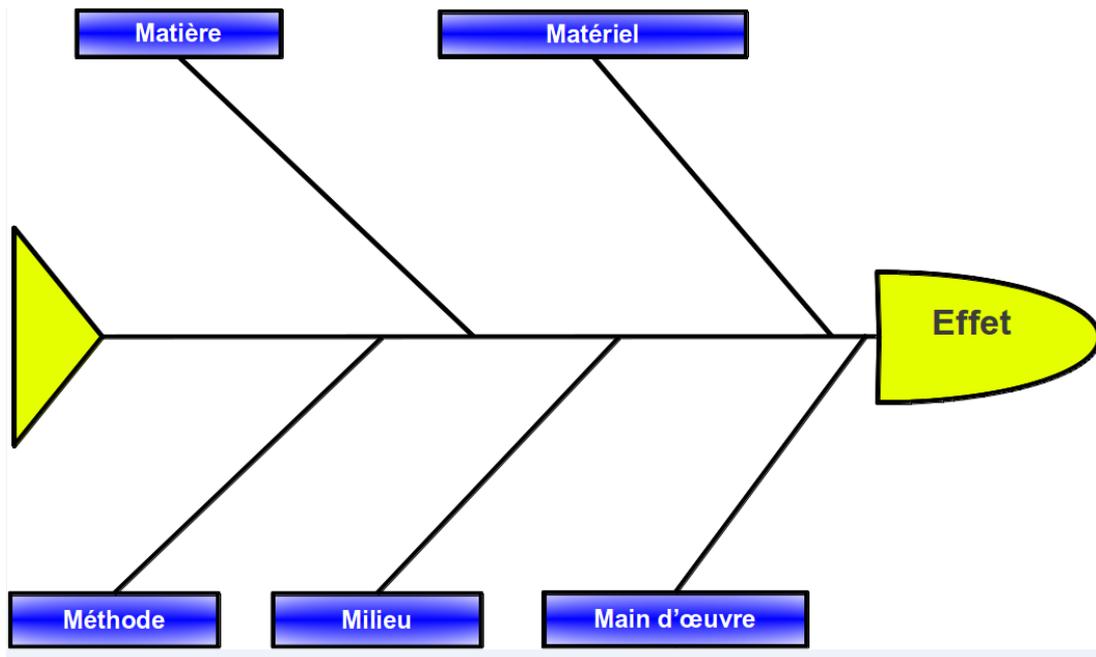


Figure 10: diagramme d'Ishikawa.

Objectifs

Dans ce travail, le premier objectif a été d'évaluer la validation de méthode de l'identification bactérienne par la technique de spectrométrie de masse par un travail en double au long d'une période de deux semaines, dans le cadre de la démarche d'accréditation. Les identifications par les méthodes traditionnelles (VITEK 2® BIOMERIEUX, galeries API®, géloses chromogènes CPS, agglutinations STREPTEX) ont été réalisées en parallèle par la technique de spectrométrie de masse afin de s'assurer de la concordance des résultats. La démarche a été approfondie par l'évaluation de la robustesse de la méthode en étudiant la concordance d'identification en fonction de différents milieux de cultures et en fonction du vieillissement des colonies du micro-organisme.

Dans une seconde partie, le deuxième objectif de ce travail a été d'évaluer la pertinence d'identification ainsi que les performances et la facilité d'utilisation des systèmes BIOTYPER MICROFLEX LT®(BRUKER) et VITEK MS® (BIOMERIEUX), sur les sites respectifs du Centre Hospitalier de Valenciennes et du Centre Hospitalier de Roubaix. Afin de déterminer le système le plus adapté à l'identification bactérienne et mycologique de routine en laboratoire. Les performances ont été dans un premier temps évaluées vis-à-vis d'une bibliothèque de souches d'identification de routine dans les laboratoires de bactériologie, puis dans un second temps vis-à-vis d'une collection de souches de *Streptococcus pneumoniae* en raison des difficultés que présente le genre Streptocoque du fait de la forte similitude des compositions protéiques. Les performances des deux automates ont ensuite été évaluées vis-à-vis d'une collection de souches de référence (souches de contrôles de qualité externe et souches ATCC) d'identification plus rare et plus difficile en bactériologie.

L'impact de la réduction du délai de rendu des résultats et les conséquences clinico-biologique seront évoquées.

Seconde partie : partie expérimentale

I. Matériels et méthodes :

A. Matériels :

1. Le spectromètre de masse *Microflex LT BIOTYPER (BRUKER)*® :

Le système MICROFLEX LT® se présente en deux éléments : une partie automate et une partie unité informatique (figure 11).

L'automate est d'un encombrement réduit qui permet son positionnement sur une paillasse de travail. Il se compose d'une source d'ionisation de type LASER à azote, d'une tour qui contient le « tube de vol » et d'un détecteur de type TOF qui permet l'acquisition des signaux.

L'unité informatique permet le traitement des signaux représentés sous forme de spectre et effectue la comparaison à la base de donnée BRUKER via le logiciel BIOTYPER RTC®.



Figure 11: spectromètre de masse BRUKER et son unité informatique.

L'enregistrement de la séquence d'analyse se fait via le logiciel InfectioMaldi® (INFOPARTNER) qui assure la connexion au système informatique du laboratoire et aux automates VITEK 2® pour la réalisation des antibiogrammes. La station d'acquisition du logiciel InfectioMaldi® représente le plan de plaque, afin d'y créer le projet de travail avec la séquence des différents éléments à identifier. Lorsque le travail a été rédigé, le logiciel MALDI BIOTYPER RTC® permettait d'importer le projet de la séquence d'analyse en fonction de leurs positions sur la plaque dans l'automate. Le logiciel MALDI BIOTYPER IVD®, exigé dans le cadre de la démarche qualité a été installé au court du mois de mars 2013.

La plaque se compose de 96 puits. Elle peut être réutilisable ou jetable. Il à été choisi d'utiliser des plaques réutilisables au Centre Hospitalier de Valenciennes (figure 12).

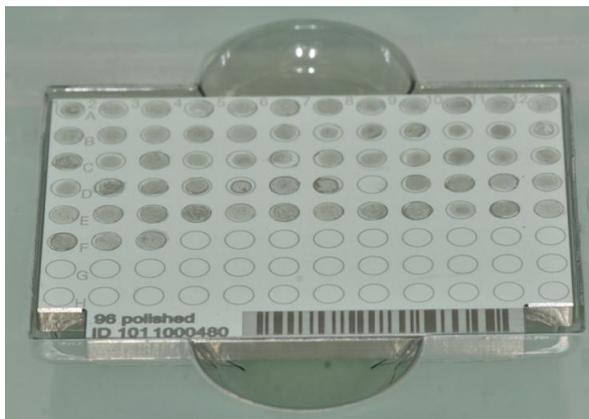


Figure 12: exemple de plaque de l'automate BRUKER.

Un contrôle de qualité lié à chaque projet a été instauré. Il consiste à déposer 1,2µl de solution BTS sur une cible qui sera après séchage recouverte de matrice. Le BTS est composé d'une souche d'*Escherichia coli* ATCC DH5α auquel sont ajoutées deux protéines de haut poids moléculaire, permettant à l'automate d'effectuer sa calibration sur une plage allant de 4 à 17 kDA.

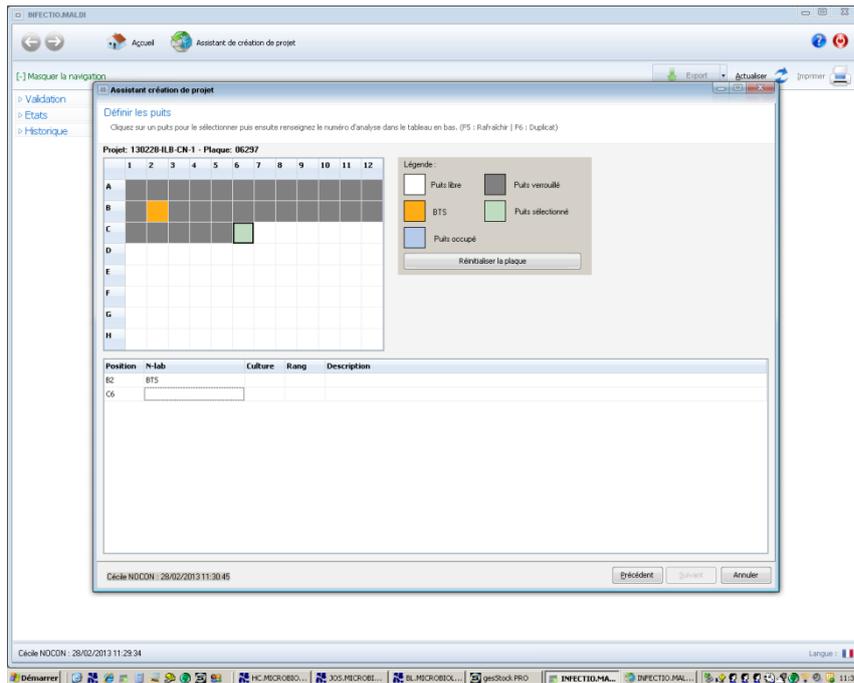


Figure 13: interface InfectionMaldi® lors de la création de projet.

a. Acquisitions des données et identifications

Le logiciel BIOTYPER RTC® compare le spectre obtenu avec les spectres de références de la base de données. Le résultat de l'identification apparaît sous la forme d'un score de corrélation entre le spectre obtenu et le spectre de référence le plus proche identifié. L'analyse nécessite l'acquisition de 240 spectres minimum pour obtenir un résultat.

Les résultats font intervenir deux paramètres, tout d'abord le score représenté par +++, ++, + ou – ainsi qu'une couleur (figure 14), puis la cohérence à l'espèce ou au genre selon des lettres A, B ou C (figure 15).

Le critère de cohérence à l'espèce est influencé par la notion de répétabilité de l'identification proposée. La répétabilité repose sur le nombre de choix d'espèces identiques proposées pour l'identification du micro-organisme parmi les dix spectres les plus similaires à celui d'intérêt.

L'identification peut être retenue au rang de l'espèce malgré un score inférieur à 2, si 7 profils minimum correspondent à la même espèce.

| Score | Description | Symbole | Couleur |
|-----------------|---|---------|---------|
| 2,300 ... 3,000 | Forte probabilité d'identification à l'espèce | +++ | Vert |
| 2,000 ... 2,299 | Identification du genre sécurisée, identification probable à l'espèce | ++ | Vert |
| 1,700 ... 1,999 | Identification probable au genre | + | Jaune |
| 0,000 ... 1,699 | Degré de confiance insuffisant pour l'identification | - | Rouge |

Figure 14: tableau interprétatif des scores de corrélation.

| Catégorie | Description |
|-----------|--|
| A | Cohérence à l'espèce : le profil de référence ayant le score le plus élevé est classé en vert. les autres profils verts sont de la même espèce que la première. Les profils suivants jaunes sont au moins du même genre que le premier. |
| B | Cohérence au genre : le profil de référence ayant le score le plus élevé est classé en vert ou jaune. Les profils de score inférieur en vert ou jaune appartiennent au même genre que le score le plus haut. Les conditions de cohérence à l'espèce ne sont pas remplies. |
| C | Pas de cohérence : Aucune cohérence à l'espèce ou au genre (Vérifier les synonymies des noms ou les mélanges d'espèces). |

Figure 15: tableau interprétatif de la cohérence d'analyse.

La condition *sine qua non* pour identifier une espèce est qu'au moins un spectre de celle-ci figure dans la base de données.

2. Le spectromètre de masse VITEK MS (BIOMERIEUX)® :

Le spectromètre de masse VITEK MS® se présente également en deux éléments : une partie automate et une partie informatique (figure 16).

L'automate est volumineux et doit être posé directement au sol. L'accès à ses côtés latéraux doit rester disponible afin de pouvoir y accéder lors des interventions de maintenance. Il se compose d'une chambre d'ionisation, d'une source d'ionisation (laser à azote), d'un tube de vol et d'un détecteur de type TOF.

L'unité informatique adjointe permet le traitement des données. La comparaison du spectre obtenu aux spectres de références de la base de données est effectuée par le logiciel MYLA®.



Figure 16: spectromètre de masse VITEK MS® et son unité informatique.

La préparation des échantillons est réalisée sur une station d'acquisition à partir du logiciel MYLA® de BIOMERIEUX (figure 17).



Figure 17: organisation de la paillasse de travail pour une analyse VITEK MS®.

Dans la partie « ID de la cible » il faut scanner le code barre de la plaque de dépôt. Le logiciel affiche alors la représentation de la plaque avec les emplacements disponibles pour analyse (figure 18).



Figure 18: interface de création MYLA®.

La plaque est composée de 3 parties de 16 emplacements (soit 48 puits) organisés autour d'un point de dépôt central où il faut déposer la souche d'*Escherichia coli* ATCC8739 « fraîche » de 18 à 24 heures qui sert de contrôle de qualité et qui est déposée de façon centrale par la même technique que celle de la réalisation des dépôts des souches à analyser. Quatre plaques peuvent être introduites simultanément sur le support de plaque qui sera introduit dans la chambre d'analyse de l'automate (figure 19).



Figure 19: support de plaque VITEK MS®.

a. Acquisitions des données et identifications

Le logiciel MYLA® compare le spectre obtenu avec sa base de données et calcule un score de corrélation sur la réalisation de 100 profils. 30 profils constituent le minimum acceptable pour réaliser la comparaison du profil obtenu avec ceux de la base de données.

Les résultats font intervenir deux paramètres, le degré de confiance ou score en pourcentage (figure 20) et le niveau de confiance affiché par des icônes de formes et de couleurs différentes (figure 21).

| score | degré de confiance |
|------------------------|---|
| 99,9 à 60 % | bonne identification |
| <60 % | faible probabilité d'identification |
| absence de pourcentage | nombre de profils ou de pics insuffisants |

Figure 20: tableau interprétatif du score d'identification.

| niveau de confiance | |
|---------------------|---|
| bonne |  |
| à résoudre |  |
| absence |  |

Figure 21: tableau interprétatif du niveau de confiance d'identification.

3. *Autres méthodes d'identifications :*

a. L'automate VITEK 2 (BIOMERIEUX) ®:

Le VITEK 2® identifie les bactéries et les levures à partir de l'analyse de leurs profils métaboliques d'utilisation de différents substrats biochimiques, par comparaison aux profils de souches de référence d'identification connue.

L'identification résulte d'une lecture colorimétrique en cinétique de chaque cupule réactionnelle.

Les niveaux de fiabilité d'identification existants sont : excellent, très bonne, bonne, acceptable, faible discrimination, peu concluante, non identifié.

Les cartes utilisées sont :

-GN : pour les micro-organismes à GRAM négatifs.

-GP : pour les *staphylococcus*, *streptococcus*, *entérocooccus*, certains autres germes à GRAM positifs

-YST : pour les levures.

-ANC : pour les anaérobies, corynébactéries, microaérophiles, lactobacilles.

-NH : pour *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Eikenella corrodens*, *Gardenerella vaginalis*.

b. Les galeries d'identifications :

Les galeries d'identifications fonctionnent selon l'étude des caractéristiques métaboliques de la bactérie. Chaque cupule contient un substrat avec lequel la bactérie va réagir ou non selon son métabolisme. Les cupules sont remplies avec une suspension bactérienne de densité prédéfinie et dans un bouillon recommandé par le fournisseur. Un délai d'incubation est nécessaire selon les recommandations du fournisseur.

Les galeries utilisées dans l'étude sont :

- RapidID 32 STREP® (BIOMERIEUX): pour les Streptocoques,
- RapidID Ana® (BIOMERIEUX): pour les bactéries anaérobies,
- Rapid ID 32 GN® (BIOMERIEUX): pour les bactéries GRAM négatifs,
- Api NH® (BIOMERIEUX): pour *Neisseria* et *Haemophilus*,
- Api 50 CH® (BIOMERIEUX): comprend des tests métaboliques pour l'identification d'autres bactéries dont il n'existe pas de galeries spécifiques,
- Api Campy® (BIOMERIEUX): pour les Campylobacters,
- Api Coryne® (BIOMERIEUX): pour les Corynebacteries,

c. Autres systèmes d'identifications :

Les autres systèmes d'identification utilisés dans cette étude ont été :

- STREPTEX® : pour identification par agglutination des streptocoques.

- gélose chromogène : production de substrat coloré en fonction du métabolisme bactérien caractéristique d'une espèce permettant son identification. Les géloses chromogènes utilisées dans cette étude ont été les géloses CPS® (BIOMERIEUX) dans le cadre de la mise en cultures des prélèvements urinaires.

4. Bibliothèques de souches

a. Les souches issues de l'identification de routine au Centre Hospitalier de Valenciennes

Les 252 souches retenues ont été issues de l'isolement bactérien en routine du laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier de Valenciennes au cours d'une période de deux semaines (tableau 1). Les souches d'identifications plus rares en bactériologie qui n'ont pas été isolées au cours de cette période, mais qui présentent un intérêt clinique majeur, ont été recueillies au sein de souches de collection et de souches ATCC que possède le laboratoire de Valenciennes. Cette bibliothèque de souches a été constituée dans le but de la validation de la mise en production du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®.

| Souches | Nombre de souches |
|---------------------------------------|-------------------|
| Enterobacteries: | |
| <i>Citrobacter braakii</i> | 2 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 3 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 2 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 4 |
| <i>Enterobacter hormaechei</i> | 1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 |
| <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| <i>Hafnia alvei</i> | 4 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 10 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 3 |
| <i>Morganella morganii</i> | 4 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 9 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 1 |
| <i>Providencia stuartii</i> | 2 |
| <i>Raoultella panticola</i> | 1 |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> | 2 |
| <i>Salmonella sp</i> | 2 |
| <i>Shigella boydii</i> | 1 |
| <i>Shigella flexneri</i> | 1 |
| <i>Shigella sonnei</i> | 2 |
| <i>Serratia marcescens</i> | 3 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 3 |
| Bacilles non fermentants: | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 2 |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> | 1 |
| <i>Pseudomonas fluorescens 2</i> | 1 |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 8 |
| <i>Acinetobacter Iwoffii</i> | 2 |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | 1 |
| Autres souches GRAM négatives: | |
| <i>Achromobacter xylosoxydans</i> | 1 |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | 1 |
| <i>Campylobacter coli</i> | 1 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | 1 |
| <i>Delftia acidovorans</i> | 1 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 3 |

| Souches | Nombre de souches |
|------------------------------------|-------------------|
| Staphylocoques: | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 12 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | 3 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 6 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 4 |
| <i>Staphylococcus hominis</i> | 1 |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | 1 |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | 1 |
| Streptocoques: | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 9 |
| <i>Streptococcus grp.A</i> | 1 |
| <i>Streptococcus grp.C</i> | 1 |
| <i>Streptococcus grp.G</i> | 4 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 6 |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | 1 |
| <i>Streptococcus anginosus</i> | 2 |
| <i>Streptococcus bovisII</i> | 1 |
| <i>Streptococcus constellatus</i> | 2 |
| <i>Streptococcus gallolyticus</i> | 1 |
| <i>Streptococcus gordonii</i> | 1 |
| <i>Streptococcus oralis</i> | 3 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | 2 |
| Enterocoques: | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 9 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 2 |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | 1 |
| Anaérobies: | |
| | |
| <i>B. thetaiotaomicron</i> | 1 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 4 |
| <i>Bacteroides ureolyticus</i> | 1 |
| <i>Clostridium difficile</i> | 10 |
| <i>Clostridium innocuum</i> | 1 |
| <i>Clostridium ramosum</i> | 1 |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 1 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> | 1 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | 1 |
| <i>Propionibacterium avidum</i> | 1 |

| | | | |
|---------------------------------------|---|--------------------------------|------------|
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 3 | <i>Propionibacterium acnes</i> | 7 |
| <i>Helicobacter pylori</i> | 1 | <i>Ps anaerobius</i> | 1 |
| <i>Legionella pneumophila</i> | 2 | <i>Ps asaccharolyticus</i> | 1 |
| <i>Legionella spp</i> | 3 | <i>Veillonella sp</i> | 1 |
| <i>Moraxella osloensis</i> | 1 | | |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 1 | Levures: | |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 | <i>Candida parapsilosis</i> | 1 |
| Autres souches GRAM positives: | | <i>Candida kefyr</i> | 1 |
| <i>Actinomyces sp</i> | 1 | <i>Rhodotorula sp.</i> | 1 |
| <i>Actinomyces turicensis</i> | 1 | <i>Candida krusei</i> | 1 |
| <i>Aerococcus viridans</i> | 2 | | |
| <i>Aerococcus urinae</i> | 2 | TOTAL | 252 |
| <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> | 1 | | |
| <i>Bacillus sp</i> | 2 | | |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 2 | | |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | 2 | | |
| <i>Dermabacter hominis</i> | 1 | | |
| <i>Micrococcus luteus</i> | 1 | | |
| <i>Paenibacillus sp.</i> | 1 | | |
| <i>Trueperella bernardiae</i> | 1 | | |

Tableau 1: bibliothèque de souche issue du CH Valenciennes

b. Les souches issues de l'identification de routine au Centre Hospitalier de Roubaix

Le panel des 272 souches d'identification courante correspond à un échantillon représentatif des bactéries et levures identifiées sur 3 mois au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier de Roubaix (tableau 2). Il est constitué à partir de prélèvements d'urines, d'hémocultures, de biopsies, d'abcès, de leucorrhées, provenant de patients hospitalisés ou en ambulatoire au cours de la période de juin 2012 à octobre 2012 (figure 22). Cette bibliothèque de souches a été constituée afin d'évaluer les performances générales d'identification des spectromètres BIOTYPER MICROFLEX LT® (BRUKER) et VITEK MS® (BIOMERIEUX) en routine.

| Souche | Nombre de souches | Souche | Nombre de souches |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------------------------|-------------------|
| Enterobactéries: | | Streptocoques: | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 3 | <i>Streptococcus mitis/oralis</i> | 4 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 6 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 6 |
| <i>Escherichia coli</i> | 24 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 19 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 3 | <i>Streptococcus bovis</i> | 2 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 9 | <i>Streptococcus constellatus</i> | 1 |
| <i>Morganella morganii</i> | 3 | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 16 | <i>Streptococcus parasanguinis</i> | 1 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 6 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 6 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 10 | <i>Streptococcus salivarius</i> | 2 |
| <i>Raoultella ornitholytica</i> | 2 | Enterocoques: | |
| <i>Salmonella Typhi</i> | 1 | <i>Enterocoque faecalis</i> | 15 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 | <i>Enterocoque faecium</i> | 8 |
| Bacilles non fermentant: | | Staphylocoques: | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 32 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 13 |
| Autres souches GRAM négatives | | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2 |
| <i>Gardnarella vaginalis</i> | 7 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 3 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 8 | Autres souches GRAM positives: | |
| <i>Kingella kingae</i> | 1 | <i>Corynebacterium striatum</i> | 1 |
| <i>Legionnelle</i> | 13 | <i>Micrococcus spp</i> | 1 |
| <i>Moraxella catarrhalis</i> | 1 | Levures: | |
| <i>Pasteurella multocida</i> | 1 | <i>Candida albicans</i> | 15 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 | <i>Candida glabrata</i> | 3 |
| Anaérobies: | | Total général | |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> | 1 | | 272 |
| <i>BGN anaérobie</i> | 1 | | |

Tableau 2: bibliothèque de souches d'identification courante issue du Centre Hospitalier de Roubaix.

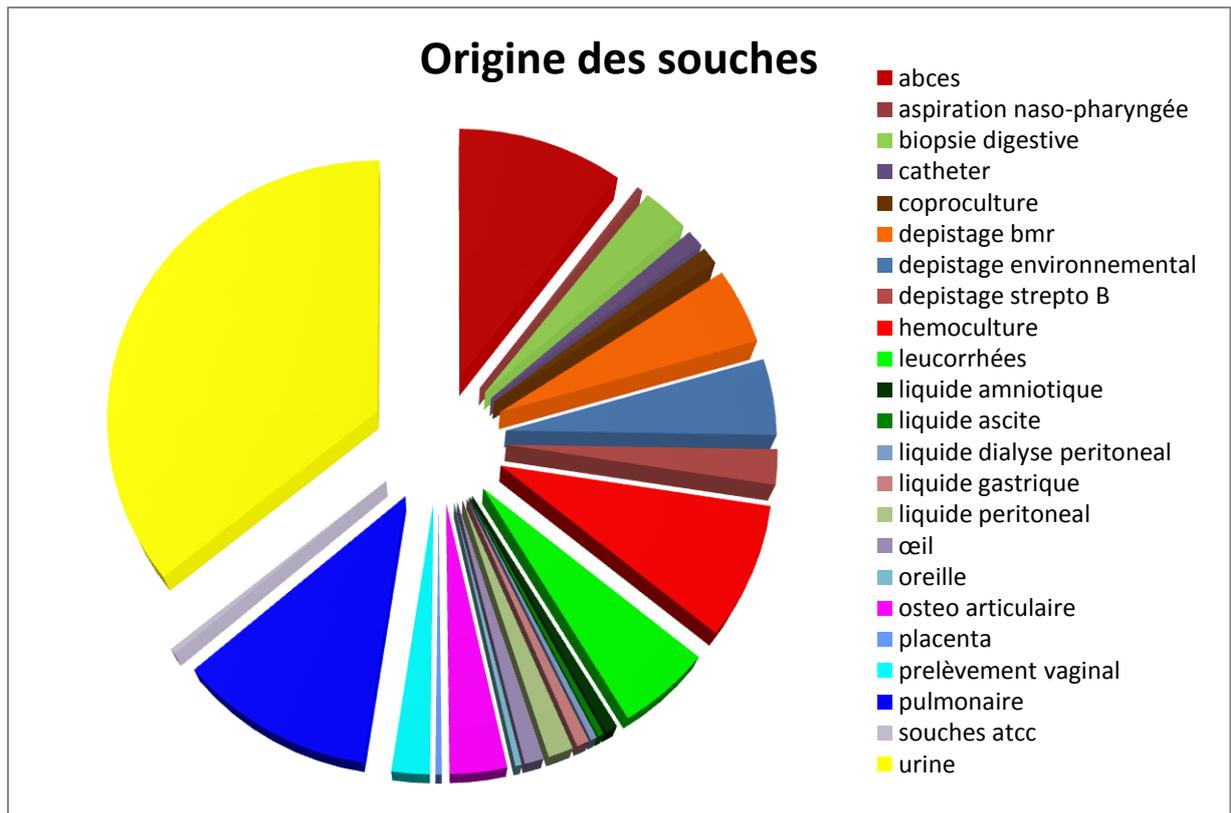


Figure 22: origine des souches issue du Centre Hospitalier de Roubaix.

c. Bibliothèque de souches de *Streptococcus pneumoniae* :

La bibliothèque de souches de *Streptococcus pneumoniae* correspond à des pneumocoques conservés au cours d'une étude prospective menée au long de l'année 2009. Les souches sont issues de l'isolement à partir de prélèvements bactériologiques sur les patients hospitalisés au Centre Hospitalier de Roubaix lors de cette période. La bibliothèque se compose de 48 souches identifiées par le type de bactérie et le numéro de dossier patient auquel elles correspondent (tableau 4). Le but expérimental de cette bibliothèque de souches de *Streptococcus pneumoniae* a été d'évaluer les performances des automates BIOTYPER MICROFLEX LT® (BRUKER) et VITEK MS® (BIOMERIEUX) par rapport à des souches dont le matériel protéique est très proche au sein du genre *Streptococcus*.

| | référence | | |
|----|---------------------------|--|--------------------------------|
| 1 | <i>S.pneumoniae</i> 11012 | | 25 <i>S.pneumoniae</i> 49275 |
| 2 | <i>S.pneumoniae</i> 12473 | | 26 <i>S.pneumoniae</i> 497 |
| 3 | <i>S.pneumoniae</i> 14300 | | 27 <i>S.pneumoniae</i> 51195 |
| 4 | <i>S.pneumoniae</i> 15494 | | 28 <i>S.pneumoniae</i> 51247 |
| 5 | <i>S.pneumoniae</i> 17526 | | 29 <i>S.pneumoniae</i> e 51450 |
| 6 | <i>S.pneumoniae</i> 20706 | | 30 <i>S.pneumoniae</i> 51570 |
| 7 | <i>S.pneumoniae</i> 23968 | | 31 <i>S.pneumoniae</i> 51711 |
| 8 | <i>S.pneumoniae</i> 24115 | | 32 <i>S.pneumoniae</i> e 51943 |
| 9 | <i>S.pneumoniae</i> 26447 | | 33 <i>S.pneumoniae</i> 52035 |
| 10 | <i>S.pneumoniae</i> 30346 | | 34 <i>S.pneumoniae</i> 52040 |
| 11 | <i>S.pneumoniae</i> 38013 | | 35 <i>S.pneumoniae</i> 52690 |
| 12 | <i>S.pneumoniae</i> 38987 | | 36 <i>S.pneumoniae</i> e 53748 |
| 13 | <i>S.pneumoniae</i> 39100 | | 37 <i>S.pneumoniae</i> 53752 |
| 14 | <i>S.pneumoniae</i> 40503 | | 38 <i>S.pneumoniae</i> 57810 |
| 15 | <i>S.pneumoniae</i> 41028 | | 39 <i>S.pneumoniae</i> 62930 |
| 16 | <i>S.pneumoniae</i> 41472 | | 40 <i>S.pneumoniae</i> 64951 |
| 17 | <i>S.pneumoniae</i> 43945 | | 41 <i>S.pneumoniae</i> 70879 |
| 18 | <i>S.pneumoniae</i> 44128 | | 42 <i>S.pneumoniae</i> 727 |
| 19 | <i>S.pneumoniae</i> 44210 | | 43 <i>S.pneumoniae</i> 75568 |
| 20 | <i>S.pneumoniae</i> 44565 | | 44 <i>S.pneumoniae</i> 78578 |
| 21 | <i>S.pneumoniae</i> 44817 | | 45 <i>S.pneumoniae</i> 84351 |
| 22 | <i>S.pneumoniae</i> 46841 | | 46 <i>S.pneumoniae</i> 87020 |
| 23 | <i>S.pneumoniae</i> 48034 | | 47 <i>S.pneumoniae</i> 88640 |
| 24 | <i>S.pneumoniae</i> 49217 | | 48 <i>S.pneumoniae</i> 89149 |

Tableau 3: Bibliothèque de souches de *S.pneumoniae*.

d. Bibliothèque de souches de collection d'identification plus délicate

La bibliothèque de souches d'identification plus délicate en bactériologie a été constituée de souches ATCC et de souches issues de contrôle de qualité externe (contrôle du CTCB : Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en biologie clinique). Elle se compose de souches bactériennes, dermatophytiques et mycologiques d'identification occasionnelle en bactériologie de routine (tableau 5). Les performances des automates sur ces souches d'identification plus délicate ont été testées.

| | souches |
|----|---|
| 1 | <i>Enterococcus saccharolyticus</i> 430761 |
| 2 | <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> 33389 |
| 3 | <i>Enterobacter aerogenes</i> 13048 |
| 4 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228 |
| 5 | <i>Staphylococcus aureus</i> 976 |
| 6 | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 19424 |
| 7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9721 |
| 8 | <i>Neisseria lactamica</i> 23970 |
| 9 | <i>Oligella urethralis</i> 17466 |
| 10 | <i>Enterococcus faecalis</i> 29212 |
| 11 | <i>Kocuria kristinae</i> 752 |
| 12 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> 7070 |
| 13 | <i>Enterococcus casseliflavus</i> 700327 |
| 14 | <i>Listeria monocytogenes</i> 751 |
| 15 | <i>Staphylococcus sciuri</i> 29061 |
| 16 | <i>Candida lusitaniae</i> 7444 |
| 17 | <i>Streptococcus equi</i> 4307 |
| 18 | <i>Proteus vulgaris</i> 6380 |
| 19 | <i>Candida parapsilosis</i> 2201 |
| 20 | <i>Acinetobacter baumannii</i> 747 |
| 21 | <i>Klebsiella oxytoca</i> 70032 |
| 22 | <i>Shigella sonnei</i> 2593 |
| 23 | <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> 1325 |
| 24 | <i>Staphylococcus aureus</i> 977 |
| 25 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 1766 |
| 26 | <i>Enterobacter cloacae</i> 700323 |
| 27 | <i>Trichosporon mucoides</i> 204094 |
| 28 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1744 |
| 29 | <i>Candida albicans</i> 14053 |
| 30 | <i>Candida glabrata</i> 29501 |
| 31 | <i>Oligella ureolytica</i> 435941 |
| 32 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> 7501 |
| 33 | <i>Haemophilus influenzae</i> 90071 |
| 34 | <i>Candida utilis</i> 49501 |
| 35 | <i>Candida krusei</i> 62581 |
| 36 | <i>Eikenella corrodens</i> 11521 |
| 37 | <i>Streptococcus salivarius</i> ssp <i>thermophilus</i> 192581 |
| 38 | <i>Kloeckere japonica</i> 58370 |
| 39 | <i>Clostridium sporogenes</i> 45550 |

Tableau 4: bibliothèque de souches de collection.

B. Méthodes :

1. Validation de méthode du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT® au Centre Hospitalier de Valenciennes :

- a. Evaluation des performances du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT® comparée aux techniques d'identifications traditionnelles dans le cadre de la mise en production :

Dans le cadre de la démarche d'accréditation, il est nécessaire de s'assurer de la cohérence et de la concordance des résultats de la technique mise en place par rapport aux techniques d'identification traditionnellement utilisées avant la mise en production du nouvel automate. Le travail a consisté à réaliser en double les identifications des bactéries issues des prélèvements de routine au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier de Valenciennes durant une période de deux semaines. Les bactéries de routine ont généralement été identifiées par la méthode VITEK 2® BIOMERIEUX. Les bactéries d'identification plus délicate ont été, selon les pratiques du laboratoire, identifiées par galeries d'identification, ou des méthodes d'agglutinations. Certaines souches ont été issues d'une collection de souche de référence pour lesquelles la concordance des résultats d'identification par la technologie MALDI TOF a été vérifiée.

- b. Evaluation de la robustesse de la méthode :

Il nous a paru nécessaire de compléter la démarche de validation de méthode du spectromètre BIOTYPER par l'étude de la robustesse de la méthode en fonction de contrainte d'analyse se présentant au laboratoire du Centre Hospitalier de Valenciennes.

Dans un premier temps, il a été étudié l'influence du milieu de culture (BCP, gélose chromogène, gélose au sang, gélose au sang et acide nalidixique ANC) puisque la méthode du fournisseur n'est pas validée pour l'ensemble des milieux de cultures utilisé au laboratoire.

Dans un second temps, il a été évalué l'influence de la durée d'incubation et du vieillissement des cultures sur les résultats d'identifications (cultures inférieures à 8h, 18-24h, 48h, 72h et cultures ayant séjourné +4°C pendant 24h).

2. Comparaison des performances du spectromètre Microflex LT BIOTYPER de BRUKER aux performances du spectromètre VITEK MS de BIOMERIEUX :

Dans le but de comparer les performances des différents systèmes, les bibliothèques de souches ont été soumises à identification dans des conditions d'analyses comparables (temps de culture de la souche, un seul dépôt d'analyse puis un second en cas d'échec...). Les résultats des identifications ont été analysés selon leurs concordances au rang de l'espèce, puis au rang de genre sur les différents automates.

Les résultats des performances d'identifications ont été analysés selon le test de McNEMAR, adapté à la comparaison de séries appariées, avec un score significatif retenu de $p = 0,05$.

Le degré de concordance des identifications a été analysé selon les valeurs du coefficient Kappa. Le coefficient Kappa permet d'estimer la qualité de l'accord « réel » entre deux jugements qualitatifs (l'accord observé résultant de la somme d'une composante aléatoire et d'une composante d'accord « véritable »). Le degré d'accord peut être évalué comme : excellent, bon, modéré, médiocre, mauvais ou très mauvais (figure 23).

| Degré de l'accord | Kappa |
|-------------------|-----------|
| excellent | >0,81 |
| bon | 0,61-0,80 |
| modéré | 0,41-0,60 |
| médiocre | 0,21-0,40 |
| mauvais | 0,0-0,2 |
| très mauvais | <0,0 |

Figure 23: valeurs d'interprétation du coefficient Kappa.

a. Comparaison vis-à-vis de la bibliothèque de souches de routine :

Les performances de l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® ont été comparées à celle de l'automate VITEK MS® sur une collection de 262 souches de routine. Les performances des automates de spectrométrie de masse ont été évaluées en termes de pertinence d'identification ainsi qu'en termes de facilité d'utilisation. Cette bibliothèque de souches a été constituée afin d'évaluer les performances générales d'identification de ces spectromètres en routine.

b. Comparaison vis-à-vis de la bibliothèque de souches de *Streptococcus pneumoniae* :

Cette bibliothèque se compose de 48 souches de Pneumocoques.

Le but expérimental de cette bibliothèque de souches de *Streptococcus pneumoniae* a été d'évaluer les performances des automates BIOTYPER MICROFLEX LT® (BRUKER) et VITEK MS® (BIOMERIEUX) par rapport à des souches dont le matériel protéique est très proche au sein du genre Streptocoque.

c. Comparaison vis-à-vis de la bibliothèque de souches de collection :

Les performances des automates sur ces souches d'identification plus délicate ont été testées. Cette bibliothèque a permis d'évaluer les performances d'identification face à des souches plus rarement rencontrées en laboratoire de bactériologie, mais également d'explorer une partie de l'exhaustivité des bases de données de chacun des fournisseurs.

3. Méthodes d'utilisation des automates :

a. Préparations des échantillons pour analyse par MALDI TOF

Les souches sont conservées à -20°C par méthodes cryobilles (CRYOBANK MAST DIAGNOSTICS). Les souches ont été repiquées en culture sur des milieux non sélectifs :

principalement une gélose sang (sang de cheval 5% OXOID®) et gélose chocolat PVX® (BIOMERIEUX) pour les germes exigeants.

Les cultures ont ensuite été incubées à 37°C pendant 15 à 18 heures avant dépôt des colonies pour analyse. Les bactéries dont la croissance est facilitée par l'incubation sous CO₂ ont été placées dans l'étuve spécifique.

b. Méthode d'utilisation du BIOTYPER MICROFLEX LT® de BRUKER :

Les souches à analyser sont déposés à l'aide d'un objet stérile, sous la forme d'un fin frottis sur les puits successifs, recouvert par 1 µL de matrice de CHCA (figure 24, 25, 26). Dans le cas de l'analyse d'une souche de levure, il est nécessaire de précéder le dépôt de matrice par le dépôt préalable d'acide formique. Il n'est pas nécessaire de préciser lors du dépôt si la souche à identifier et suspectée être d'origine bactérienne ou mycologique.

Un contrôle de qualité BTS constitué d'une souche d'*Escherichia coli* doit être déposé à chaque projet.

La matrice pouvant être mise en une seule fois, il est possible de déposer toutes les souches rapidement les unes à la suite des autres (figure 27). Après séchage, la plaque est introduite dans l'appareil afin d'y être analysée (figure 28, 29).

Une étape supplémentaire d'extraction protéique de la bactérie peut être réalisée par dépôt d'acide formique sur le puit, préalablement au dépôt de matrice sur l'échantillon. L'extraction protéique a pour but de lyser la paroi cellulaire du micro-organisme et ainsi de faciliter la co-cristallisation et la mise en suspension des protéines bactériennes. Le résultat attendu est une sensibilisation de la technique MALDI TOF par réduction des pics de bruit de fond et augmentation de la reproductibilité.

Le logiciel BIOTYPER RTC® permet l'importation du projet d'analyse et la réalisation de la séquence d'identification.



Figure 24: oranisn du plan de travail lors de la réalisation des dépôts.



Figure 25: sélection d'une colonie d'intérêt.

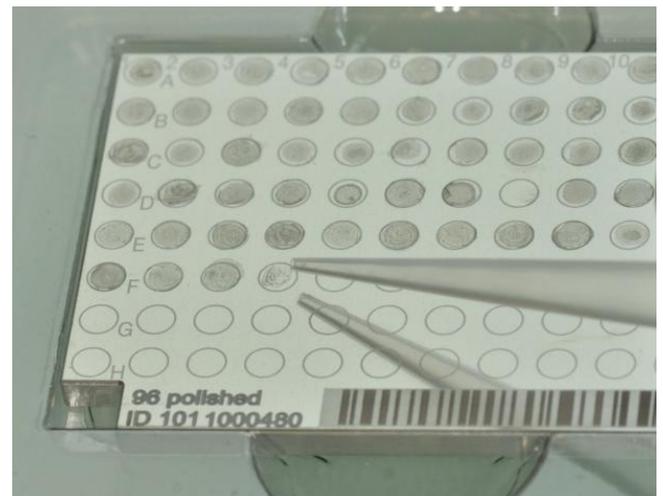


Figure 26: réalisation d'un fin frottis de la colonie à l'aide d'un cône de pipette.

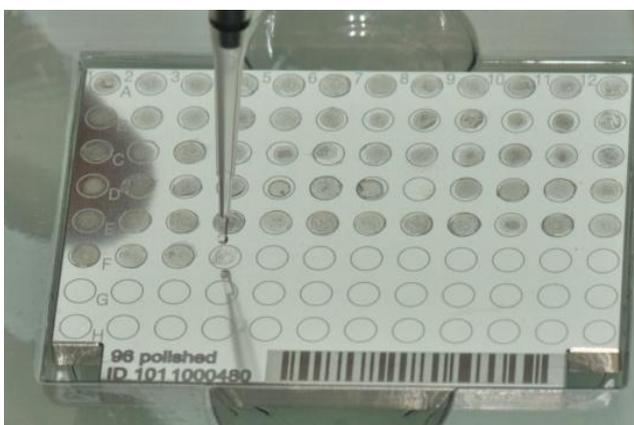


Figure 27: application d'une goutte de matrice CHCA.



Figure 28: séchage de la plaque de dépôt.

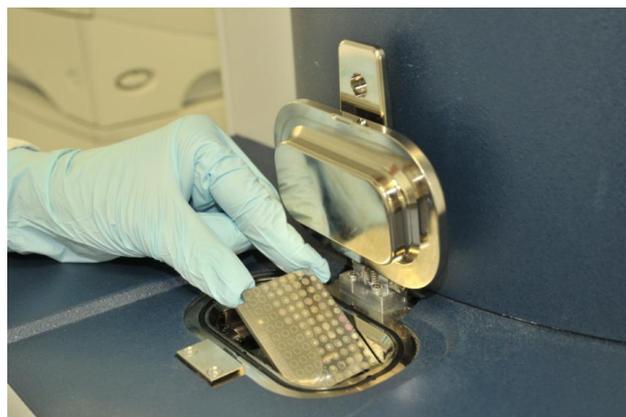


Figure 29: insertion de la plaque dans la chambre de l'automate.

L'automate réalise le vide dans la chambre d'analyse et il est alors possible de lancer la séquence d'identification.

c. Méthode d'utilisation du VITEK MS® de BIOMERIEUX

Après réalisation au point de dépôt central d'un fin frottis de la souche d'*Escherichia coli* ATCC8739 « fraîche » de 18-24 heures de culture qui sert de contrôle de qualité, les souches à analyser sont ensuite déposées selon la méthode « smear » dite de dépôt direct. La colonie est étalée grâce à une öse en un très fin frottis sur l'emplacement dédié (figure 30).

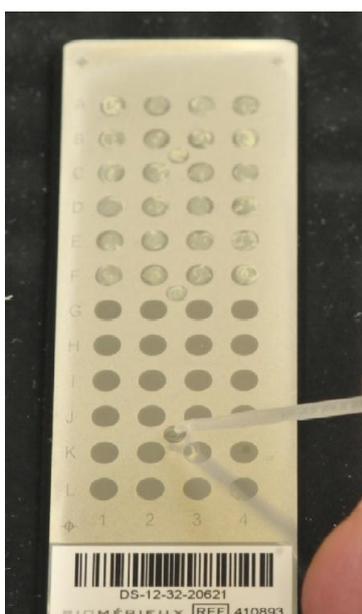


Figure 30: dépôt du contrôle de qualité sur plaque BIOMERIEUX.



Figure 31: dépôt de matrice

Ensuite, et ce de façon immédiate, il faut ajouter à cet étalement la matrice CHCA afin que l'échantillon et la matrice co-cristallisent à l'air libre (figure 31). Dans le cas d'identification de levure, une solution d'acide formique doit être réalisée de façon immédiate puis sera complétée après séchage de matrice.

Il faut inscrire l'identification de l'échantillon à tester dans la zone « ID Echantillon » et préciser d'emblée s'il s'agit de l'analyse d'une souche bactérienne ou bien d'une souche mycologique. En effet, le spectre obtenu n'est pas comparé à la même base de données selon qu'il s'agit d'une bactérie ou d'une levure.

Une fois que les dépôts successifs des échantillons à analyser ont été réalisés, les données de la plaque doivent être transférées à l'automate de spectrométrie de masse.

La plaque est ensuite introduite dans le spectromètre de masse pour analyse (figure 32).



Figure 32: insertion du support de plaque dans l'automate VITEK MS®.

II. Résultats :

A. Validation de méthode : Qualification du spectromètre de masse BRUKER :

1. Validation de méthode du BIOTYPER au centre hospitalier de Valenciennes

Conformément aux exigences du COFRAC, le Centre Hospitalier de Valenciennes a comparé les identifications du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT® (BRUKER) aux identifications obtenues par les techniques habituelles du secteur, afin de valider la concordance des résultats avant mise en production. La réalisation en parallèle des identifications de bactériologie issues du fonctionnement de routine pendant un délai de deux semaines a été étudiée.

Les souches moins fréquentes qui ne se sont pas présentées lors de ce délai, mais qui présentent un intérêt clinique majeur, ont été testées à partir de souches de collection.

Afin de permettre la mise en production, la concordance attendue entre les techniques est de l'ordre de 95% selon les données de la littérature (1,10–12,22).

L'ensemble des résultats est disponible en annexe 1.

Le résumé des résultats est présenté dans le tableau 5.

Tableau 5: corrélation identification traditionnelle et identification MALDI TOF

| | Nombres de souches | Concordance au genre | Pourcentage de corrélation au genre | Concordance à l'espèce | Pourcentage de corrélation à l'espèce | Incorrectes au genre | Incorrectes à l'espèce | Absence d'identification |
|--------------------------------|--------------------|----------------------|-------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------|------------------------|--------------------------|
| ATCC | 12 | 12 | 100,00% | 12 | 100,00% | | | |
| Entérobactéries | 77 | 73 | 94,81% | 68 | 88,31% | 4 | 9 | |
| Staphylocoques | 27 | 27 | 100,00% | 27 | 100,00% | | | |
| Streptocoques | 31 | 30 | 96,77% | 27 | 87,10% | | 4 | 1 |
| Enterocoques | 14 | 14 | 100,00% | 12 | 85,71% | | 2 | |
| Bacilles non fermentants | 24 | 24 | 100,00% | 22 | 91,67% | | 2 | |
| Autres souches à GRAM négatifs | 10 | 10 | 100,00% | 10 | 100,00% | | | |
| Autres souches à GRAM positifs | 9 | 9 | 100,00% | 9 | 100,00% | | | |
| Anaérobies | 18 | 18 | 100,00% | 18 | 100,00% | | | |
| Légionelles | 5 | 5 | 100,00% | 5 | 100,00% | | | |
| | | | | | | | | |
| TOTAL | 227 | 222 | 97,80% | 210 | 92,51% | 4 | 9 | 1 |

Tableau 6: réalisation en parallèle des identifications de routine sur les automates Bruker et Vitek 2.

| souches | Nombres de souches | identifications concordantes au genre | identifications concordantes à l'espèce | identifications incorrectes à l'espèce | identifications incorrectes au genre | remarques |
|-------------------------------|--------------------|---------------------------------------|---|--|--------------------------------------|--|
| ATCC | 12 | 12 | 12 | | | ATCC700323 <i>E. hormaechei</i> identifié comme <i>E. cloacae</i> |
| <i>Citrobacte sp</i> | 7 | 7 | 7 | | | 3 espèces |
| <i>Enterobacter sp</i> | 10 | 10 | 10 | | | souches <i>E.aerogenes</i> et groupe <i>E. cloacae</i> |
| <i>Escherichia</i> | 13 | 13 | 13 | | | |
| <i>Hafnia</i> | 4 | 4 | 4 | | | |
| <i>Klebsiella sp</i> | 12 | 12 | 12 | | | 2 espèces |
| <i>Morganella</i> | 4 | 4 | 4 | | | |
| <i>Proteus sp</i> | 10 | 10 | 10 | | | 2 espèces |
| <i>Providencia sp</i> | 2 | 2 | 2 | | | |
| <i>Raoultella sp</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | | Spectres très similaires pour les deux espèces |
| <i>Salmonella sp</i> | 4 | 4 | 0 | | | Identification au genre uniquement |
| <i>Shigella sp</i> | 4 | 0 | 0 | | 4 | Identification sous <i>E. coli</i> |
| <i>Serratia sp</i> | 3 | 3 | 3 | | | |
| <i>Yersinia sp</i> | 3 | 3 | 3 | | | |
| <i>S. aureus</i> | 10 | 10 | 10 | | | |
| SCN | 16 | 16 | 16 | | | 1 souche <i>S.warneri</i> identifiée après extraction |
| <i>Micrococcus sp</i> | 1 | 1 | 1 | | | |
| <i>Strepto group.</i> | 14 | 14 | 14 | | | |
| SNH | 12 | 12 | 9 | 3 | | 3 souches <i>S.oralis</i> identifiées en <i>S.pneumoniae</i> |
| <i>S. pneumo</i> | 5 | 4 | 4 | 1 | | 1 souche muqueuse ne donnant pas de pic |
| <i>Enterococcus sp</i> | 10 | 10 | 10 | | | |
| <i>Aerococcus sp</i> | 4 | 4 | 2 | 2 | | 2 souches correctes au genre, espèce à vérifier : <i>A.sanguinicola</i> absente du thésaurus Vitek |
| <i>P. aeruginosa</i> | 5 | 5 | 5 | | | |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 4 | 4 | 4 | | | |
| <i>Acinetobacter sp.</i> | 10 | 10 | 8 | 2 | | 2 souches de <i>A.pittii</i> non vérifiables (absente des thésaurus Vitek et Api) |
| <i>Divers non fermentants</i> | 5 | 5 | 5 | | | |
| <i>Haemophilus sp</i> | 6 | 6 | 6 | | | |
| <i>Moraxella sp</i> | 2 | 2 | 2 | | | |
| <i>Campylobacter sp</i> | 2 | 2 | 2 | | | |
| <i>Corynebacteries</i> | 4 | 4 | 4 | | | |
| <i>Corynéformes</i> | 5 | 5 | 5 | | | |
| <i>Bacteroides sp</i> | 6 | 6 | 6 | | | |
| <i>Clostridium difficile</i> | 10 | 10 | 10 | | | |
| <i>Clostridium sp</i> | 2 | 2 | 2 | | | |
| <i>Legionella sp</i> | 5 | 5 | 5 | | | |
| Total : | 227 | 222 | 210 | 9 | 4 | |

La comparaison montre une concordance pour 210 souches sur 227 au rang de l'espèce et pour 222 sur 227 au rang de genre. Les pourcentages de corrélation des identifications par les deux techniques sont de 97,80% au rang de genre et de 92,51% au rang de l'espèce.

L'obtention d'une corrélation au rang de l'espèce légèrement inférieure aux données de la littérature s'explique par l'inclusion de souches de Shigelles qui sont des limites déjà démontrées par le fournisseur. Le résultat des corrélations obtenues si l'on exclue les résultats d'identifications des Shigelles sont de 99,55% au genre et de 94,17% à l'espèce, ce qui concorde pleinement avec les données de la littérature.

L'analyse des discordances a révélée une exhaustivité beaucoup plus importante de la base de données BRUKER que les bases de données disponibles avec les techniques usuelles.

Tout d'abord, les discordances mises en évidence ont porté sur les résultats d'identifications des entérobactéries :

- *Enterobacter hormaechei* a été identifié en tant qu'*Enterobacter cloacae* à un score de 2,287. *Enterobacter cloacae* à été identifié pour une souche en tant qu'*Enterobacter kobei* à un score de 2,1 et en tant qu'*Enterobacter asburiae* à un score de 2,121 pour une autre souche.

- *Raoultella panticola* (selon la méthode VITEK2) à été identifié au score de 2,373 en tant que *Raoultella ornithinolytica*.

- les souches de *Salmonella Typhi* ont été identifiées uniquement en tant que *Salmonella spp* par la base de données BRUKER et il est donc nécessaire de procéder à des tests de typage pour connaître précisément l'identification de ces souches. Ces résultats ont été volontairement limités par le fournisseur au rang de genre en raison de l'appartenance de ses souches aux bactéries de « classe de risque 3 ». La classe de risque 3 regroupe les micro-organismes qui présente un risque sanitaire grave. La manipulation de ces souches nécessite un personnel formé et une vaccination (si elle existe).

Une base de données étendue, comprenant les bactéries de classe 3 est disponible auprès du fournisseur, mais l'utilisateur doit faire la démarche supplémentaire de sa demande.

- seules 4 identifications ont été incorrectes correspondant aux souches de *Shigella* qui possède un matériel génétique très proche de *Escherichia coli* et qui ne peuvent être distinguées distinctement par la technique de spectrométrie de masse.

Ce problème étant également connue du fournisseur, il est précisé que la distinction est impossible.

Ensuite, l'analyse des discordances pour les Staphylocoques n'a montré qu'un échec d'identification d'une souche de *Staphylococcus warneri* par l'obtention de score de confiance insuffisant (1,499 et 1,626). L'identification a pu être réalisée après une extraction.

Au sein du genre Streptocoque :

- une absence de résultat a été obtenue pour une souche de *Streptococcus pneumoniae*. Cette souche présentait la caractéristique d'être très muqueuse. Ceci caractérise une difficulté technique liée à la réalisation d'un dépôt d'analyse de qualité.

- un germe *Streptococcus bovisII* à été identifié comme étant un *Streptococcus equinus* au score de 2,207.

- il à été constaté trois erreurs d'identifications portant sur trois souches de *Streptococcus mitis* et de *Streptococcus oralis* qui ont été identifiées en tant que *Streptococcus pneumoniae* à des scores de 2,202 avec notion de répétabilité (7 identifications proposées étaient pneumocoque), 1,843 et 2,167.

Une discordance a été constatée entre les résultats d'identifications portant sur une souche d'*Enterococcus*. Le résultat fourni par l'automate VITEK 2 a été *Enterococcus gallinarum* alors que le résultat fourni par l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® a été *Enterococcus faecium*. La réalisation d'une galerie Api 20 STREPT® et la résistance de la souche à l'Imipénème ont permis de conforter l'analyse du spectromètre en faveur d'une souche d'*Enterococcus faecium*. Une souche d'*Aerococcus viridans* a été rendue en tant qu'*Aerococcus sanguinicola*. Cette discordance se justifie par **l'absence du thésaurus VITEK de l'espèce *Aerococcus sanguinicola*.**

Ensuite les résultats de la comparaison des identifications du spectromètre BIOTYPER avec la méthode traditionnelle pour l'identification des bacilles GRAM négatifs non fermentant ont révélé :

-une souche de *Pseudomonas putida* identifiée en *Pseudomonas monteilii* au score de 2,079 et une souche de *Pseudomonas fluorescence2* identifiée en *Pseudomonas synxanthis* au score de 2,062.

-il a également été mis en évidence deux souches d'*Acinetobacter baumannii* pour lesquelles l'identification du BIOTYPER a été *Acinetobacter pitii* à des scores de 2,153 et de 2,419. Cette discordance se justifie également par **l'absence du thésaurus VITEK de l'espèce *Acinetobacter pitii*.**

La comparaison portant sur les souches à GRAM positifs a révélé une difficulté d'identification d'une souche de *Bacillus sp.* L'analyse de cette souche a eu comme résultat dans un premier temps *Clostridium halophilum* au score de 1,858, puis lors d'un deuxième passage *Bacillus cereus* au score de 1,789.

Enfin la dernière difficulté d'identification observée porte sur une souche de *Dermabacter hominis* ayant bien été rendue également en tant que *Dermabacter hominis* par l'analyse BIOTYPER MICROFLEX LT® mais au score insuffisant de 1,591 avec une répétabilité de quatre choix identiques. Le fait qu'il n'existe que quatre spectres de référence dans la base de données, rend impossible la validation de l'identification selon les critères de répétabilité du fournisseur.

La corrélation des résultats ayant été au vu de ces résultats évaluée comme bonne, l'identification en première intention par la méthode de spectrométrie de masse a été retenue.

2. Evaluation de la robustesse de la méthode en fonction de l'âge des cultures :

Lors du week end, seules les analyses urgentes sont prises en charges. Il est donc fréquent que les colonies issues des cultures des prélèvementsensemencés le vendredi soir ou les veilles de jours fériés ne soient identifiées que le lundi. Il s'est alors écoulé un délai de culture de 48-72h. Afin de permettre la continuité de la réalisation de ces analyses, le laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalier de Valenciennes a testé la concordance et la stabilité des résultats d'identifications par MALDI TOF dans le temps pour répondre principalement à deux situations.

La première est la réalisation des identifications dans un délai court inférieur à 12 heures de pousse des cultures. Cette situation se produit principalement dans le cas de la prise en charge des prélèvements d'hémocultures et de prélèvement de liquide céphalo-rachidien (dans le cadre de suspicion de méningite bactérienne), pour lesquels le laboratoire tente de fournir une réponse d'identification la plus rapide possible au service afin de permettre au clinicien de cibler l'antibiothérapie nécessaire.

La seconde situation se rencontre lors de la prise en charge des analyses qui ne sont pas réalisées en garde. Afin de permettre la continuité de prise en charge des prélèvements non traités en garde, il est apparu nécessaire d'évaluer la stabilité d'identification d'une même culture sur plusieurs jours (24h, 48h, 72h). La démarche de vérification de la robustesse en fonction de l'âge des cultures a consisté à comparer les résultats et les scores de ces identifications à celle de référence, établie à 18-24h de pousse.

La méthode d'identification du spectromètre de masse se base sur une analyse du profil protéique des constituants du micro-organisme. On peut supposer que le micro-organisme à identifier nécessite un délai suffisant de culture avant d'exprimer l'ensemble de ses caractéristiques métaboliques et protéiques. Ainsi une tentative trop précoce pourrait être infructueuse ou présenter un risque plus élevé d'identification erronée.

De la même façon, un temps de culture trop long ou des conditions de conservation de la culture non appropriées, peuvent faire suspecter une altération des caractéristiques du micro-organisme et ainsi craindre un risque d'identification erronée.

Les résultats de ces tests sont consignés dans le tableau 7 :

Tableau 7: robustesse d'identification selon l'âge des cultures.

| milieu | germe | Score d'identification selon l'âge des cultures | | | | |
|--------|--------------------------|---|--------|-------|-------|---------------|
| | | <12h | 18-24h | 48h | 72h | 24h+24h à 4°C |
| BCP | <i>E.coli</i> | 2.262 | 2.233 | 2.264 | 2.285 | 2.292 |
| | <i>P.mirabilis</i> | 2.479 | 2.56 | 2.582 | 2.427 | 2.444 |
| | <i>K.pneumoniae</i> | 2.415 | 2.443 | 2.449 | 2.452 | 2.391 |
| | <i>E.cloacae</i> | 2.191 | 2.306 | 2.397 | 2.279 | 2.449 |
| | <i>P.aeruginosa</i> | 2.399 | 2.339 | 2.312 | 2.181 | 2.422 |
| | <i>A.baumannii</i> | 2.248 | 2.441 | 2.354 | 2.167 | 2.365 |
| | <i>E.faecalis</i> | 2.375 | 2.37 | 2.41 | 2.401 | 2.392 |
| | <i>E.faecium</i> | 2.359 | 2.496 | 2.398 | 2.428 | 2.343 |
| SG | <i>S.aureus</i> | 2.379 | 2.391 | 2.194 | 2.383 | 2.421 |
| | <i>S.epidermidis</i> | 1.985 | 2.128 | 2.025 | 2.062 | 1.875 |
| | <i>S.pyogenes</i> | 2.25 | 2.273 | 2.418 | 2.375 | 2.402 |
| | <i>S.agalactiae</i> | 2.21 | 2.319 | 2.269 | 2.116 | 2.353 |
| | <i>str non groupable</i> | 2.358 | 2.32 | 2.43 | 2.317 | 2.535 |

La concordance des identifications à été de 100% pour les entérobactéries, les bacilles non fermentant, les entérocoques, les staphylocoques et les streptocoques testés avec un score d'identification qui restait supérieur à 2. On constate même une relative stabilité des scores pour une même espèce.

Sauf pour la souche *Staphylococcus epidermidis* utilisée afin de tester la stabilité des staphylocoques coagulase négative, pour lequel le score précoce ainsi que le score après 24 heures à 4°C sont intermédiaires entre 1.7 et 2 et ne permettent en principe qu'une identification au rang de genre.

Cependant, pour ce germe, la reproductibilité d'identification au temps inférieur à 12 heures et au temps de 24h+24h à 4°C permettait selon les indications du fournisseur de fournir une identification au rang de l'espèce.

3. Evaluation de la robustesse de la méthode en fonction du milieu de culture :

La technologie MALDI TOF est validée, selon les critères du fournisseur, pour l'identification de micro-organisme ayant effectué leur croissance sur des milieux de culture non sélectifs.

La sélection de croissance de certaines bactéries par l'ajout d'agents inhibiteurs, tels que par exemple des antibiotiques, fait suspecter une pression de sélection s'exerçant également sur le développement du micro-organisme mis en évidence. Cette bactérie peut alors ne pas présenter, suite à cette pression de sélection, l'ensemble de ses caractéristiques métaboliques et protéiques. Ne correspondant alors plus totalement au spectre de référence de son espèce, il existe un risque d'aboutir à une identification absente ou erronée.

Il a été réalisé un test de reproductibilité d'identification du même micro-organisme en fonction de sa croissance sur différents milieux de cultures.

Les milieux de cultures ont été choisis en raison de la pertinence de leurs ensemencements selon l'origine anatomique et la nature du prélèvement.

Par exemple : les bactéries responsables d'infections urinaires peuvent être le plus fréquemment des entérobactéries, mais également des Streptocoques, des Entérocoques...

Afin de les mettre en évidence, les milieux de cultures préconisés pour l'ensemencement d'une urine sont une gélose chromogène CPS que l'on a mis en parallèle avec l'identification à partir d'une gélose BCP (milieu relativement pauvre d'un point de vue nutritionnel qui convient à la culture des bacilles à Gram négatifs) et la gélose de référence qu'est la gélose sang (non sélective).

Les résultats de ces tests sont consignés dans le tableau suivant :

Tableau 8: robustesse en fonction du milieu de culture.

| germes | Milieux de cultures | | | |
|--------------------------|----------------------------|-------|-------|-------|
| | BCP | CPS | SG | CAP |
| <i>E.coli</i> | 2.257 | 2.441 | 2.384 | |
| <i>P.mirabilis</i> | 2.572 | 2.535 | 2.63 | |
| <i>K.pneumoniae</i> | 2.41 | 2.482 | 2.538 | |
| <i>E.cloacae</i> | 2.249 | 2.249 | 2.337 | |
| <i>P.aeruginosa</i> | 2.4888 | 2.591 | 2.439 | |
| <i>A.baumannii</i> | 2.268 | 2.449 | 2.469 | |
| <i>S.aureus</i> | 2.358 | 2.345 | 2.398 | 2.42 |
| <i>S.epidermidis</i> | 2.003 | 2.072 | 2.084 | 2.112 |
| <i>S.pyogenes</i> | | | 2.34 | 2.491 |
| <i>S.agalactiae</i> | | | 2.407 | 2.407 |
| <i>str non groupable</i> | | | 2.352 | 2.23 |
| <i>E.faecalis</i> | 2.505 | 2.499 | 2.561 | 2.56 |
| <i>E.faecium</i> | 2.438 | 2.469 | 2.573 | 2.559 |

Il n'a pas été mis en évidence de différence significative sur la qualité de l'identification du germe en fonction des différents milieux de culture. Tous les scores d'identification

permettent selon les recommandations du fournisseur de confirmer ces identifications au rang d'espèce.

4. Maitrises des risques :

Dans le cadre du dossier de validation COFRAC afin d'obtenir l'accréditation de la méthode pour la réalisation des analyses, il est nécessaire de maîtriser les risques. Les paramètres à prendre en compte et leurs modalités de prise en charge figure dans le tableau 9.

Tableau 9: maitrise des risques, paramètres et modalités de prise en charge.

| MAITRISE DES RISQUES | | |
|--|---|--|
| Données d'entrée | Points critiques à maîtriser | Modalités de maîtrise |
| Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs : | Colonies bactériennes : pureté Qualité du dépôt bactérien sur la cible Qualité du dépôt de la matrice | Formation et habilitation des techniciens. |
| Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) : | Le cas échéant : extraction | Formation et habilitation |
| Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements. | Formation et habilitation des techniciens | Formation à l'installation des techniciens par la firme sur site. Formation plus pointue d'un référent sur site. Compagnonnage pour les nouveaux arrivants Formation conforme aux procédures et instructions du Centre Hospitalier de Valenciennes et réalisée selon une trame d'habilitation et d'évaluation des connaissances. Traçabilité de l'ensemble des formations Bilan de l'utilisation du système à 4 mois présenté à l'équipe avec diaporama. |

MAITRISE DES RISQUES

| Données d'entrée | Points critiques à maîtriser | Modalités de maîtrise |
|--|---|--|
| <p>Conditions ambiantes requises (ex : température, organisation des locaux, éclairage,...) :</p> | <p style="text-align: center;">Température</p> <p style="text-align: center;">Empoussièremment</p> | <p style="text-align: center;">Sonde d'ambiance (température du local)</p> <p style="text-align: center;">Situation de l'automate hors courant d'air</p> |
| <p>Référence du réactif (référence fournisseur, version) :</p> | <p style="text-align: center;">Réactifs et consommables fournis par la firme BRUKER</p> <p style="text-align: center;">Réactifs autres firmes</p> | <p style="text-align: center;">Réactifs stockés et utilisés selon les recommandations du fournisseur.</p> <p style="text-align: center;">Réactifs achetés chez d'autres fournisseurs validés par BRUKER</p> <p style="text-align: center;">Gestion des stocks tracée sur logiciel GStock®</p> |
| <p>Matériau de références (témoins) :</p> | <p style="text-align: center;">Calibration et Contrôle interne</p> <p style="text-align: center;">CIQ</p> <p style="text-align: center;">CEQ</p> | <p>Passage systématique d'un calibrant (BTS comportant des protéines de haut PM)</p> <p>Passage systématique d'un contrôle interne fourni par le fabricant (BTS comportant une souche d'<i>E.coli</i>)</p> <p>Passage quotidien d'une souche ATCC de <i>P.aeruginosa</i> avec relevé et suivi des scores obtenus (vérification d'une dérive éventuelle su laser).</p> <p>Souches de CIQ passées selon le programme défini dans l'instruction du laboratoire (Contrôles internes de qualité en bactériologie)</p> <p>Participation au programme de CEQ (CTCB) défini selon l'instruction du laboratoire (Contrôles externes de qualité en bactériologie) avec rendu des identifications réalisées avec cette technologie.</p> |
| | | |

MAITRISE DES RISQUES

| Données d'entrée | Points critiques à maîtriser | Modalités de maîtrise |
|--|---|--|
| <p>Equipements :</p> | <p>Spectromètre de masse « MALDI BIOTYPER » (BRUKER)</p> | <p>Instruction pour l'utilisation de l'appareil et des logiciels (MALDI).</p> <p>Contrat de maintenance établi avec le fournisseur.</p> <p>Mise en place d'une télémaintenance.</p> <p>Mise en place d'un cahier de vie de l'automate.</p> |
| <p>Exigences métrologiques (définir les paramètres critiques)</p> | <p>Cibles réutilisables en inox (BRUKER)</p> | <p>Nettoyage et contrôle visuel des cibles selon recommandations du fournisseur avec procédure de nettoyage écrite et traçabilité.</p> <p>Contrôle de la justesse des données selon l'instruction du laboratoire</p> |
| <p>Exigences informatiques spécifiques</p> | <p>Logiciel IVD du BIOTYPER</p> <p>Logiciel assurant la connexion avec le SIL et les VITEK : Infectio-Maldi® (Info Partner)</p> | <p>Critères de validation technique basés sur le score et la répétabilité définis dans l'instruction MALDI.</p> <p>Validation biologique systématique des résultats avec connaissance des CQI et des scores.</p> |

B. Comparaison des performances des spectromètres BIOTYPER et VITEK MS :

1. Performances selon la bibliothèque de souches d'identification de routine :

Un panel de 272 souches d'identification courante en bactériologie de routine à été recueilli au cours des mois de juin à octobre 2012 au Centre Hospitalier de Roubaix.

Cette collection de souches à été soumise à l'identification des deux systèmes dans des conditions analytiques similaires (temps d'incubation, milieu de culture...).

L'ensemble des résultats est disponible en annexe 2.

Le résumé des résultats est présenté dans le tableau 10 :

Tableau 10:synthèse des performances VITEK MS® et BIOTYPER MICROFLEX LT®

| | | Vitek MS | | | | |
|--|-------------------|------------------------------------|--|----------------------------------|--|--------------------------|
| <i>Souche</i> | Nombre de souches | identification correcte à l'espèce | pourcentage d'identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | pourcentage d'identification correcte au genre | absence d'identification |
| <i>Enterobactéries:</i> | 84 | 76 | 90,48% | 81 | 96,43% | 3 |
| <i>Bacilles non fermentants:</i> | 18 | 17 | 94,44% | 17 | 94,44% | 0 |
| <i>Autres bactéries à GRAM négatifs</i> | 32 | 20 | 62,50% | 23 | 71,88% | 3 |
| <i>Anaérobies:</i> | 2 | 1 | 50,00% | 1 | 50,00% | 1 |
| <i>Streptocoques:</i> | 43 | 37 | 86,05% | 40 | 93,02% | 3 |
| <i>Enterocoques:</i> | 23 | 20 | 86,96% | 22 | 95,65% | 1 |
| <i>Staphylocoques:</i> | 50 | 49 | 98,00% | 50 | 100,00% | 0 |
| <i>Autres bactéries à GRAM positifs:</i> | 2 | 2 | 100,00% | 2 | 100,00% | 0 |
| <i>Levures:</i> | 18 | 16 | 88,89% | 17 | 94,44% | 1 |
| Total général | 272 | 238 | 87,50% | 253 | 93,01% | 12 |
| | | Biotyper | | | | |
| <i>Souche</i> | Nombre de souches | identification correcte à l'espèce | pourcentage d'identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | pourcentage d'identification correcte au genre | absence d'identification |
| <i>Enterobactéries:</i> | 84 | 77 | 91,67% | 81 | 96,43% | 3 |
| <i>Bacilles non fermentants:</i> | 18 | 16 | 88,89% | 18 | 100,00% | 0 |
| <i>Autres bactéries à GRAM négatifs</i> | 32 | 27 | 84,38% | 27 | 84,38% | 0 |
| <i>Anaérobies:</i> | 2 | 1 | 50,00% | 1 | 50,00% | 1 |
| <i>Streptocoques:</i> | 43 | 34 | 79,07% | 43 | 100,00% | 0 |
| <i>Enterocoques:</i> | 23 | 22 | 95,65% | 22 | 95,65% | 1 |
| <i>Staphylocoques:</i> | 50 | 43 | 86,00% | 47 | 94,00% | 3 |
| <i>Autres bactéries à GRAM positifs:</i> | 2 | 2 | 100,00% | 2 | 100,00% | 0 |
| <i>Levures:</i> | 18 | 17 | 94,44% | 18 | 100,00% | 0 |
| Total général | 272 | 239 | 87,87% | 259 | 95,22% | 8 |

Tableau 11: comparaison des performances BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS®.

| Souches | Nombres de souches | VITEK MS | | | BIOTYPER | | |
|------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| | | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| <i>BGN anaérobie non identifié</i> | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| <i>Branhamella catarrhalis</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Candida albicans</i> | 15 | 14 | 14 | 1 | 15 | 15 | 0 |
| <i>Candida glabrata</i> | 3 | 2 | 3 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 3 | 2 | 3 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 6 | 6 | 6 | 0 | 5 | 5 | 1 |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 3 | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 9 | 4 | 7 | 2 | 7 | 8 | 1 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 15 | 14 | 14 | 1 | 14 | 14 | 1 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 8 | 6 | 8 | 0 | 8 | 8 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> | 24 | 24 | 24 | 0 | 24 | 24 | 0 |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Gardnarella vaginalis</i> | 7 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | 8 | 8 | 8 | 0 | 8 | 8 | 0 |
| <i>Kingella kingae</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 6 | 6 | 6 | 0 | 6 | 6 | 0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 16 | 15 | 15 | 1 | 16 | 16 | 0 |
| <i>Legionella sp</i> | 13 | 8 | 11 | 2 | 13 | 13 | 0 |

| Souches | Nombres de souches | VITEK MS | | | BIOTYPER | | |
|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| | | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification |
| <i>Micrococcus spp</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Morganella morganii</i> | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 | 3 | 0 |
| <i>Pasteurella multocida</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 6 | 5 | 6 | 0 | 6 | 6 | 0 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 10 | 10 | 10 | 0 | 10 | 10 | 0 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 | 16 | 16 | 0 | 16 | 16 | 0 |
| <i>Raoultella ornitholytica</i> | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| <i>Salmonelle</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 32 | 32 | 32 | 0 | 29 | 30 | 2 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 13 | 13 | 13 | 0 | 12 | 13 | 0 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2 | 1 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 3 | 3 | 3 | 0 | 1 | 2 | 1 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | 19 | 16 | 16 | 3 | 18 | 19 | 0 |
| <i>Streptococcus bovis</i> | 2 | 2 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| <i>Streptococcus constellatus</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| <i>Streptococcus mitis</i> | 4 | 2 | 4 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| <i>Streptococcus parasanguinis</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Streptococcus pyogènes</i> | 6 | 6 | 6 | 0 | 3 | 6 | 0 |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 0 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| TOTAL | 272 | | | | | | |

Sur les 272 souches de la collection, 257 ont été interprétables. Au rang de l'espèce, l'analyse en parallèle des résultats d'identifications correctes montre un score de 217 identifications identiques sur 257 souches. Une absence de résultat d'identification dans 7 cas sur les deux automates. Le spectromètre de masse VITEK MS® a fourni par 15 fois une identification alors que le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT® n'a pas donné de résultats. Le spectromètre de BIOTYPER MICROFLEX LT® a quant à lui fourni une identification dans 18 autres cas dans lesquels le spectromètre VITEK MS® n'avait pas donné de résultats.

L'analyse de ces scores par un test de Mc NEMAR a permis de mettre en évidence une absence de différence significative entre les deux méthodes avec un score p de 0,7277 (p<0,05) (tableau 12).

| | | VITEK MS identification à l'espèce | | | |
|--|--------------------|------------------------------------|------------------|-------|-------------|
| | | résultat incorrect | résultat correct | total | pourcentage |
| BRUKER identification à l'espèce | résultat incorrect | 7 | 15 | 22 | 8,6 |
| | résultat correct | 18 | 217 | 235 | 91,4 |
| | total | 25 | 232 | 257 | |
| | pourcentage | 9,7 | 90,3 | | |

| | |
|-----------------|---------------|
| Difference | 1,17% |
| 95% CI | -3,51 to 5,62 |
| Significativité | P = 0,7277 |

Tableau 12: différence de performances au rang d'espèce.

La réalisation avec ces données d'un test Kappa via l'utilisation du logiciel Graphpad® à montré un résultat de Kappa = 0,228, ce qui est un score équivalent à « bon ».

Le nombre de corrélation de résultats attribués à la chance était de 214,3 soit 83,38% des observations et le nombre de corrélation « réelle » a été de 224 soit 87,16%. L'intervalle de confiance à 95% de Kappa a été 0,046 à 0,409.

La corrélation entre les résultats des deux automates au rang d'espèce peut d'après le test Kappa être considérée comme bonne.

Au rang de genre, une identification semblable a été retrouvée dans 242 cas sur 257 et une absence concomitante d'identification à été retrouvée dans un seul cas.

Le spectromètre de masse BRUKER a fourni une identification au rang de genre correcte dans 10 cas pour lesquels le spectromètre de masse BIOMERIEUX a fait défaut, alors qu'à l'inverse le spectromètre BIOMERIEUX n'a fourni que dans 4 cas une identification face à l'absence de résultats du spectromètre BRUKER.

Au vu de l'effectif de 257 souches, **cette différence n'a pas été significative avec un score $p = 0,1796$ ($p < 0,05$) (tableau 13).**

| | | VITEK MS identification au genre | | | |
|--------------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------|-------|-------------|
| | | résultat incorrect | résultat correct | total | pourcentage |
| BRUKER identification au genre | résultat incorrect | 1 | 10 | 11 | 4,3 |
| | résultat correct | 4 | 242 | 246 | 95,7 |
| | total | 5 | 252 | 257 | |
| | pourcentage | 1,9 | 98,1 | | |

| | |
|-----------------|---------------|
| Difference | 2,33% |
| 95% CI | -0,88 to 4,53 |
| Significativité | P = 0,1796 |

Tableau 13: différence de performance d'identification au rang du genre.

La réalisation d'un test Kappa à permis de retrouver un score de Kappa = 0,101, ce qui est un score considéré comme faible. Le nombre de concordance attribué à la chance a été de 241,4 soit 93,94% des souches et le nombre de corrélations « réelle » a été de 243 soit 94,55%. L'intervalle de confiance à 95% était de -0,123 à 0,324.

Il n'y a donc pas de différence significative entre les identifications des deux automates au rang de genre. Toutefois la corrélation entre les résultats des deux automates a été

faible. Le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT® ayant fourni plus d'identifications correctes que le VITEK MS.

L'analyse des discordances a portée en premier lieu sur la famille des entérobactéries. Tout d'abord, les discordances constatées sur le genre *Enterobacter*.

Les résultats d'identification d'*Enterobacter cloacae* ont par deux fois (une fois sur l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® et une fois sur l'automate VITEK MS®) rendus *Enterobacter asburiae* ou *Enterobacter kobei*.

Sur les neuf souches d'*Enterobacter cloacae* disponibles dans la bibliothèque, une souche s'est révélée être un *Escherichia coli* lors de l'identification sur les deux automates. Il s'agit probablement d'une erreur lors de l'isolement de la souche à partir de la culture primaire et de la mise en cryobilles de colonies bactériennes correspondant à *Escherichia coli* et non *Enterobacter cloacae*. Les résultats de ces identifications n'ont donc pas été pris en compte.

Ensuite l'identification d'une souche de *Raoultella ornithinolytica* a été rendue *Raoultella planticola* par l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® tandis que l'autre souche de *Raoultella ornithinolytica* de la bibliothèque a été identifiée comme *Klebsiella oxytoca* par l'automate VITEK MS®.

Enfin une souche ayant été identifiée *Citrobacter freundii* par la méthode Vitek 2® (BIOMERIEUX) et par le spectromètre VITEK MS®, a été identifiée de façon erronée en tant que *Citrobacter braakii* par l'analyse de la base de données BRUKER.

Dans un deuxième temps, les discordances d'analyses du genre Staphylocoque.

Une souche de *Staphylococcus aureus* a été contaminée par une souche de *Staphylococcus epidermidis*. Une culture de *Staphylococcus aureus* a été contaminée par une

souche d'*Acinetobacter baumannii*. **L'obtention d'identification ne concordant pas avec le résultat attendu doit faire éliminer la présence d'une contamination.** Cette hypothèse est plus aisément étayée dans le cas de l'analyse du logiciel BIOTYPER RTC®, car il est possible de consulter les résultats pour lesquels les degrés de fiabilité sont les plus forts. L'obtention de résultats se présentant sous une forme panachée de l'espèce attendue d'après les tests d'orientations et d'une autre espèce, font évoquer un défaut de pureté de la souche qu'il n'est parfois pas évident de constater sur une culture primaire du prélèvement.

Le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT® a produit des résultats discordants lors de l'identification d'une souche de *Staphylococcus epidermidis*. Les résultats ont dans un premier temps sur une culture de 24 heures rendu, lors de deux passages différents, les identifications de *Staphylococcus hominis* puis de *Staphylococcus haemolyticus* à des scores de 2,025 et de 2,023.

Face à cette discordance la souche a été à nouveau isolée en quartiers. L'identification sur BIOTYPER MICROFLEX LT® de ces réisolements a fourni dans les quatre cas *Staphylococcus epidermidis*, comme initialement suspecté.

Troisièmement, la comparaison de performances des automates sur les souches de bacilles GRAM négatifs non fermentant a mis en évidence par deux fois l'identification par le spectromètre de masse BIOTYPER d'*Acinetobacter pittii* alors que ces souches avaient été identifiées *Acinetobacter baumannii* par le spectromètre de masse VITEK MS. **Ces discordances se justifient par l'absence de spectre de référence correspondant à *Acinetobacter pittii* dans la base de données VITEK MS.**

L'analyse de l'identification des souches de *Gardnarella vaginalis* n'a été possible que dans deux cas en raison de l'absence de culture suite à la conservation des souches en Cryobilles.

L'identification de treize souches de légionelles sur les deux appareils a montré que l'automate VITEK MS® n'est pas parvenu à une identification dans deux cas de souches de *Legionella bozemanii* et qu'il a fourni dans les onze autres cas l'identification de *Legionella pneumophila*. Il s'agit d'une identification erronée de *Legionella pneumophila* dans trois cas correspondant en réalité à des souches de *Legionella bozemanii* et *Legionella dumofii*.

Enfin la comparaison des performances portant sur le genre *Streptococcus* s'est révélée être l'objet des plus nombreuses discordances, en particulier dans le cas des identifications réalisées par le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®.

Tout d'abord dans le cas des six souches de *Streptococcus pyogenes*, deux ont été identifiées comme *Streptococcus dysgalactiae* par l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® et une souche s'est vue proposer comme identification la plus probable *Streptococcus castoreus* avec un score supérieur à celui de *Streptococcus pyogenes* également proposé.

Ensuite les deux souches de *Streptococcus bovis* ont été identifiées, pour l'une en *Streptococcus equi* par le spectromètre VITEK MS® et *Streptococcus lutetiensis* par le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®, et pour l'autre identifiée en *Streptococcus gallolyticus* sur les deux automates.

Une souche de *Streptococcus salivarius* a été identifiée *Streptococcus parasanginis* par analyse de la base de données BRUKER.

L'ensemble des souches de *Streptococcus mitis* ont été identifiées à tort *Streptococcus pneumoniae* par l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT®. Une souche de *Streptococcus mitis* a été identifiée de façon erronée comme *Streptococcus parasanginis* par l'automate VITEK MS®.

Il s'est également produit à l'inverse qu'une souche de *Streptococcus pneumoniae* ait été identifiée comme *Streptococcus parasanguinis* par le spectromètre de masse VITEK MS®.

Enfin *Streptococcus oralis* a été identifié comme *Streptococcus peroris* par la méthode BRUKER et comme *Streptococcus parasanguinis* par la méthode BIOMERIEUX.

Concernant les levures, pas de discordances. A noter qu'une souche initialement identifiée en tant que *Candida glabrata* s'est révélée être une erreur d'isolement lors de la constitution de la bibliothèque et être en réalité une souche de *Candida albicans*.

2. Performance vis-à-vis de la collection de *Streptococcus pneumoniae* :

Tableau 14: comparaison des résultats VITEK MS® et BIOTYPER MICROFLEX LT® vis à vis des Pneumocoques.

| Nombres de souches | VITEK MS | | | BRUKER SM | | |
|------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification |
| 46 | 39 | 40 | 6 | 44 | 45 | 0 |
| Pourcentage d'identification | 84,78% | 86,96% | | 95,65% | 97,83% | |

Les performances des deux spectromètres de masse évaluées selon une collection de 46 *Streptococcus pneumoniae* ont révélé une concordance d'identification correcte au rang de l'espèce pour 36 souches sur 46. Il n'y a jamais eu d'absence d'identification concomitante sur les deux automates, **ce qui oriente les absences d'identification vers une mauvaise qualité de dépôts.**

Les absences d'identification ont été constatées 9 fois dans le cas du spectromètre de masse VITEK MS®. Une seule souche n'a pas été identifiée dans le cas du spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT®. **Le score de performance a été de p=0,0215 ce qui est une différence significative (p<0,05) des performances d'identifications des automates**

VITEK MS ET BIOTYPER MICROFLEX LT vis-à-vis des souches de *Streptococcus pneumoniae* (tableau 15).

Ceci est à prendre en considération dans la mesure où le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT® aurait tendance à rendre de façon excessive l'identification *Streptococcus pneumoniae* face à des souches de genre Streptocoque.

L'ensemble des résultats est disponible en annexe 3.

| | | identification VITEK MS | | | |
|-----------------------|--------------------|-------------------------|------------------|-------|-------------|
| | | résultat incorrect | résultat correct | total | pourcentage |
| identification BRUKER | résultat incorrect | 0 | 1 | 1 | 2,2 |
| | résultat correct | 9 | 36 | 45 | 97,8 |
| | total | 9 | 37 | 46 | |
| | pourcentage | 19,6 | 80,4 | | |

| | |
|-----------------|--------------|
| Difference | 17,39% |
| 95% CI | 2,39 à 21,63 |
| Significativité | P = 0,0215 |

Tableau 15: score de différence de performance d'identification pour les pneumocoques.

La réalisation d'un test Kappa a permis d'évaluer la corrélation des identifications. Le score est de Kappa = -0,041, ce qui signifie qu'il n'y a pas de corrélation entre les résultats des identifications des deux automates. La concordance de résultats observés par chance à été de 36 soit 78,26% des tests et la concordance « réelle » a été de 36,4 soit 79,11%. L'intervalle de confiance à 95% était de -0,115 à 0,033. Ce résultat amène à suspecter l'existence d'un biais d'identification de l'un des deux spectromètres.

3. Performances vis-à-vis de la collection de souches de contrôles de qualités (ATCC) :

La comparaison des performances des spectromètres BIOTYPER® et VITEK MS® (tableau 16) par rapport aux résultats obtenus sur la bibliothèque de souches ATCC a montré une absence d'identification concomitante dans trois cas. Une concordance d'identification dans 32 cas sur 39 souches.

Le spectromètre BIOTYPER® a fourni trois fois une identification correcte tandis que le spectromètre VITEK MS® était en défaut de fournir un résultat. A l'inverse, le spectromètre VITEK MS® a montré un résultat d'identification correcte face à un échec d'identification du spectromètre BIOTYPER®.

L'ensemble des résultats est disponible en annexe 4.

Tableau 16: comparaison VITEK MS ET BRUKER vis à vis de souches de collections.

| Nombres de souches | vitek | | | bruker | | |
|--------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------|
| | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | identification absente | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | identification absente |
| 39 | 33 | 37 | 2 | 35 | 37 | 2 |
| Pourcentage | 84,62% | 94,87% | | 89,74% | 94,87% | |

| | | identification VITEK MS | | | |
|-----------------------|--------------------|-------------------------|------------------|-------|-------------|
| | | résultat incorrect | résultat correct | total | pourcentage |
| identification BRUKER | résultat incorrect | 3 | 1 | 4 | 10,3 |
| | résultat correct | 3 | 32 | 32 | 89,7 |
| | total | 6 | 33 | 39 | |
| | pourcentage | 15,4 | 84,6 | | |

| | |
|-----------------|----------------|
| Difference | 5,13% |
| 95% CI | -6,27 to 10,13 |
| Significativité | P = 0,6250 |

Tableau 17: score de différence de performance d'identification d'une collection de souches ATCC

La réalisation d'un test Kappa rapporte un score de Kappa = 0,544. Ce score est à considérer comme « moyen ». Le nombre de concordance d'événements observé par chance a été de 30,2 soit 77,51%. Le nombre de concordance « réelle » a été de 35 soit 89,74% des événements. L'intervalle de confiance à 95% était de 0,135 à 0,935. **Il n'a donc pas été mis de différence significative d'identification entre les deux automates et la corrélation des résultats est moyenne** (tableau 17).

La comparaison de performances sur l'identification de souche ATCC a révélé une difficulté d'identification du spectromètre VITEK MS® sur les souches de *Kocuria kristinae*, de *Proteus vulgaris* et d'*Enterobacter cloacae*. Les identifications fournies pour ces souches ont été correctes, mais avec un degré de confiance « moyen » avec des scores de cinquante pour cent de probabilité.

Le spectromètre de masse BIOTYPER a quant à lui montré une difficulté d'identification pour une souche d'*Oligella ureolytica* pour laquelle le score a été de 1,883 avec absence du critère de reproductibilité car une seule identification proposée correspondait à l'espèce de la souche.

Enfin les deux automates ont été en échec face à une souche de *Clostridium sporogenes* ainsi que face à une souche de *Kloeckere japonica* pour lesquelles le nombre de pics a été insuffisant.

Les deux automates ont fourni des identifications erronées pour une souche de *Shigella sonnei* en fournissant les résultats d'*Escherichia coli*, comme l'on pouvait s'y attendre, puisque les deux espèces sont très proches et ne peuvent être distinguées à l'heure actuelle par la technique MALDI TOF.

III. Comparaisons des automates BRUKER et BIOMERIEUX en terme de praticabilité:

A. La technique de dépôt :

Le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT® fonctionne, au Centre Hospitalier de Valenciennes, avec des plaques métalliques réutilisables brossées ou non et présentant 96 puits de dépôt. Il est également disponible un mode de fonctionnement avec des plaques jetables.

La technique de dépôt est appelée « smear », elle consiste à déposer une colonie de la culture bactérienne sur la surface du puits en un fin frottis. Une fois le dépôt sec, il faut alors le recouvrir par une goutte de 1 µl de matrice qui va permettre l'ionisation de l'échantillon.

Une deuxième étape de séchage est nécessaire, pour ensuite pouvoir introduire la plaque dans l'automate afin de l'analyser.

La matrice vendue sous forme lyophilisée doit être reconstituée chaque semaine par l'ajout de 250 µl de solution OS. Les cristaux d'HCCA doivent être dissous à l'aide d'un Vortex afin d'obtenir une solution claire.

Elle doit ensuite être conservée à température ambiante à l'abri de la lumière.

Le spectromètre de masse VITEK MS® fonctionne avec des plaques jetables lisses de 48 puits organisés en 3 groupes de 16 autour du contrôle de qualité centrale, dont la calibration est indispensable en début ainsi qu'en fin de série afin d'obtenir des identifications.

Le compartiment d'analyse peut accueillir 4 plaques en même temps.

La technique de dépôt est également celle de la technique « smear ». Cependant il est préconisé sur cet automate de recouvrir immédiatement le frottis par 1µl de matrice CHCA afin que les deux éléments co-cristallisent.

Une fois les dépôts secs, il est possible d'introduire la plaque dans l'automate afin de réaliser les analyses.

Ces deux méthodes sont simples à réaliser et d'apprentissage facile. L'habilitation du personnel technique à la réalisation des différentes étapes se réalise sans difficultés. Mais bien que relativement similaires, ces deux méthodes présentent certaines particularités.

Premièrement, au point de vue des plaques de dépôts : l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT® fonctionnant à l'aide de plaques réutilisables nécessite une étape de nettoyage des plaques régulière et rigoureuse.

Un mauvais nettoyage des plaques pourrait être à l'origine d'une contamination des nouveaux échantillons à identifier.

Une difficulté rencontrée à titre d'exemple, au Centre Hospitalier de Valenciennes, a porté sur le problème d'une interférence de la matière des gants utilisés lors du nettoyage des plaques qui provoquait des difficultés lors du dépôt de matrice. Celle-ci se dispersait jusque sur les puits voisins et faisait craindre d'obtenir des identifications erronées en raison de contamination inter-prélèvement.

A contrario, les plaques jetables du spectromètre VITEK MS® pouvant présenter un défaut isolé qui poserait un problème d'identification seront simplement jetées et remplacées.

En revanche les plaques jetables se révèlent plus coûteuses à utilisation égale que les plaques réutilisables dont l'entretien n'est pas très onéreux.

Il est à remarquer également que les puits de dépôts des plaques jetables sont d'un diamètre plus petit que les puits des plaques du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®. La réalisation d'un fin frottis est alors plus délicate et demande d'avantage de dextérité.

Deuxièmement, dans la méthode de l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT®, la possibilité de réaliser l'ensemble des dépôts de la plaque de manière consécutive puis de déposer ensuite la matrice s'avère être un gain de temps lors de la manipulation, alors que la recommandation de dépôt de matrice sur l'échantillon frais afin qu'il y ait co-cristallisation dans la méthode du spectromètre VITEK MS® est plus longue.

Cependant cette seconde méthode évite probablement plus facilement le risque de contamination de la matrice par le changement systématique de cône à chaque dépôt, alors que l'utilisateur dépose de façon consécutive la matrice sur les différents puits dans l'autre méthode.

Troisièmement, la matrice peut également être cause d'interférence. Disponible sous forme prête à l'emploi pour le spectromètre VITEK MS®, elle se conserve un mois au frais et à l'abri de la lumière après ouverture, tandis que la matrice du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT® doit être reconstituée (l'étape de reconstitution pouvant être source d'erreur) et ne se conserve qu'une semaine.

Quatrièmement, la rapidité de réalisation des analyses varie en fonction des automates.

L'automate devant préalablement faire le vide, celui-ci est plus rapidement réalisé sur le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®. Bien que dans le cas du spectromètre VITEK MS l'étape de vide soit réalisée pour d'avantage de cibles. Ce paramètre dépend de

l'organisation de travail du laboratoire qui doit de préférence grouper les analyses afin d'optimiser le temps de travail.

B. La démarche qualité des analyses :

Le spectromètre de masse VITEK MS® interagit directement avec la station d'acquisition MYLA®. Le logiciel MYLA® permet de plus de communiquer directement les identifications validées par l'opérateur à l'automate VITEK 2® de chez BIOMERIEUX pour la réalisation des antibiogrammes. BIOMERIEUX fournit un système global de solution à la prise en charge des analyses au laboratoire.

L'automate requiert le passage d'une souche *E.coli* ATCC de 18-24h de culture afin de se calibrer avant et à la fin de chaque séquence d'acquisition. Si cette souche n'est pas correctement identifiée il n'est pas possible d'obtenir une identification pour les 16 puits qui en dépendent.

Une bonne organisation est importante afin d'optimiser le matériel car pour une seule identification il est nécessaire de déposer un contrôle. Et donc l'ensemble des 15 puits vides restant ne sera plus utilisable.

Chez le fournisseur BRUKER, le logiciel InfectioMaldi® est également disponible afin de préparer le plan de la plaque de travail, de le transmettre au spectromètre, et de transmettre les identifications validées à l'automate de réalisation des antibiogrammes.

Un seul puits peut être analysé indépendamment en le plaçant à la suite des autres accompagné de son contrôle.

Discussion :

L'adoption de la spectrométrie de masse par les laboratoires de bactériologies révolutionne les pratiques d'identification bactérienne.

L'objet de cette étude a été dans un premier temps, dans le cadre de la démarche d'accréditation, d'évaluer la mise en production du spectromètre de masse BRUKER au Centre Hospitalier de Valenciennes. Puis dans un second temps, d'évaluer la robustesse de la méthode en fonction de différents milieux de cultures et en fonction de l'âge des colonies bactériennes. Enfin, de réaliser une comparaison de performances entre les spectromètres de masse BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS®.

Dans le cadre de l'évaluation des conditions requises de la mise en place d'une portée flexible standard A pour la validation de méthode du spectromètre BRUKER au Centre Hospitalier de Valenciennes, les résultats de la comparaison des identifications obtenues par le spectromètre de masse, avec les identifications obtenues par les méthodes traditionnellement utilisées au laboratoire, ont révélé une **bonne corrélation au rang de genre (97,80%) et au rang de l'espèce (92,51%)**.

Les résultats des identifications réalisées en fonction de l'âge des cultures montrent que les conditions de validation d'un résultat selon les critères du fournisseur sont remplies. On constate l'obtention de scores d'identification supérieurs à 2 et une stabilité des scores de confiance dans le temps. Les résultats des identifications réalisées en fonction de différents milieux de cultures ne montrent pas de différence significative sur la qualité d'identification du micro-organisme.

Dans le cadre de la comparaison de performances entre les spectromètres BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS®, il n'a **pas été mis en évidence de différences significatives** au rang de genre ($p=0,1796$) et au rang de l'espèce ($p=0,7277$), dans le cadre d'une utilisation de routine.

La comparaison de performances vis-à-vis de souches de *Streptococcus pneumoniae* amène en revanche à suspecter l'existence d'un biais d'identification du spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®.

Il en résulte la nécessité d'établir des conduites à tenir. L'apposition d'un disque d'optochine sur les antibiogrammes des isolats identifiés en tant que *Streptococcus pneumoniae* demeure une bonne technique d'orientation.

Enfin, il n'a pas été mis en évidence de différence significative de performances d'identification au rang de l'espèce des automates, vis-à-vis de l'ensemble des souches de références ($p=0,6250$).

Les difficultés d'identification rencontrées au cours de l'étude ont porté d'une part sur la réalisation d'un dépôt d'analyse de qualité et d'autre part sur les paramètres des bases de données.

Les difficultés rencontrées dans le cadre de la réalisation d'un dépôt bactérien de qualité ont porté sur la morphologie des colonies. Face à des colonies d'aspects muqueux, il est difficile de déposer l'isolat en un fin frottis. La réalisation d'un deuxième dépôt a permis de résoudre la majorité des absences d'identification.

Le choix des colonies d'intérêt est également un élément déterminant dans la qualité de l'identification. Plusieurs difficultés rencontrées ont été causées par un défaut de pureté, une contamination par un autre micro-organisme de l'isolat d'intérêt.

Ces difficultés techniques mettent en avant l'importance de l'intervention humaine dans la réalisation de ces analyses. **La formation et l'habilitation du personnel technique à maîtriser cette nouvelle technologie est d'une importance capitale dans la démarche de maîtrise des risques.**

Les difficultés rencontrées sur les paramètres des bases de données ont porté sur la mise en défaut de la base de données de la méthode traditionnelle, face à une **plus grande exhaustivité de la base de données disponible avec la spectrométrie de masse**. Cependant, face à cette finesse d'analyse, il est important de ne pas méconnaître les limites de la base de données du spectromètre et de la technologie MALDI TOF.

La base de données du fournisseur BRUKER contenait 4700 spectres de références permettant l'identification d'environ 2280 espèces lors de la réalisation de l'étude. La base de données du fournisseur BIOMERIEUX permettait l'identification de 575 espèces. Alors que la méthode d'identification traditionnelle la plus largement utilisée en routine correspondant ici à la méthode VITEK 2 contient un peu plus de 330 espèces.

Les discordances ont été constatées dans les identifications de certaines entérobactéries principalement au sein d'un même sous groupe d'espèce.

En premier lieu au sein du genre *Enterobacter*., *Enterobacter cloacae* à été identifié comme *Enterobacter asburiae* ou encore comme *Enterobacter kobei*. *Enterobacter hormaechei* a quant à lui été identifié en temps qu'*Enterobacter cloacae* par le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®.

Ces discordances peuvent se justifier dans la mesure où toutes ces espèces appartiennent au *Complexe Enterobacter cloacae*. Les différences entre ces espèces sont faibles d'un point de vue métabolique et de leurs profils de résistance aux antibiotiques. La conduite à tenir clinique ne serait pas modifiée face à l'identification de ces différentes espèces. De plus, la

base de données ne contient qu'un seul spectre correspondant à *Enterobacter hormaechei*, cet élément affaiblit la probabilité d'une identification correcte, puisque le critère de répétabilité recommandé par le fournisseur (pouvant être très utile dans le cas de germe difficile) n'est alors pas atteignable.

En deuxième lieu, les discordances portant sur les identifications des souches du genre *Raoultella*. Une souche de *Raoultella planticola* a été identifiée en *Raoultella ornithinolytica* par le spectromètre BRUKER et inversement une souche de *Raoultella ornithinolytica* a quant à elle été identifiée *Raoultella planticola*. Le spectromètre de masse VITEK MS® a fourni l'identification de *Klebsiella oxytoca* pour cette souche de *Raoultella ornithinolytica*. Ces discordances résultent de l'étroite parenté entre ces espèces qui pour certains auteurs ne justifie pas la réalisation d'une distinction entre les espèces de *Raoultella planticola* et de *Raoultella ornithinolytica* (48). Le genre *Raoultella* n'était auparavant pas distinct de celui de *Klebsiella* toujours en raison de cette étroite parenté et lors d'identification par des méthodes traditionnelles, il est plausible de mettre en évidence une souche de *Raoultella planticola* en temps que *Klebsiella oxytoca*.

En troisième lieu, une souche de *Citrobacter freundii* a été identifiée en *Citrobacter braakii* par le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®. Là encore il existe une très forte similitude entre ces espèces en raison de l'appartenance de *Citrobacter braakii* au complexe de *Citrobacter freundii*.

Quatrièmement, il a été constaté que le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT® fournissait face à l'identification de *Salmonella Typhi* le résultat de *Salmonelle sp*, alors que la base de données BRUKER possède des spectres de référence

correspondant à *Salmonella enterica* et *Salmonella enterica* Typhimurium. Ceci s'explique par le classement de *Salmonella Typhi* en bactérie de classe de risque 3. Les bactéries de classe de risque 3 pouvant présenter un risque sanitaire pour la population, le fournisseur BRUKER a fait le choix de limiter l'identification au rang de genre. Une base de données étendue, comprenant les bactéries de classe 3 est disponible auprès du fournisseur, mais l'utilisateur doit faire la démarche supplémentaire de sa demande.

Enfin, les **deux systèmes d'identifications ont été incapables d'identifier les souches de *Shigella* de façon correcte**. Les résultats des identifications ont été *Escherichia coli* de façon erronée mais pourtant avec un degré de confiance suffisant pour accepter théoriquement l'identification au rang d'espèce. La composition protéique de ces bactéries étant trop proche. Leur distinction est impossible en l'état actuel par la technique de spectrométrie de masse. Cette limite est connue des fournisseurs et il est donc associé à chaque identification du germe *Escherichia coli* un message d'alerte visant à prévenir de cette impossibilité de différenciation. **Cette incapacité de distinction nécessite la mise en place de conduite à tenir face aux prélèvements pouvant contenir des souches entéropathogènes**. Au centre Hospitalier de Valenciennes, les identifications des bactéries issues des coprocultures ne sont pas réalisées par la méthode de spectrométrie. Toutefois dans ce type de prélèvement, le spectromètre peut être utile dans la discrimination des micro-organismes non pathogènes.

Des discordances pour les bacilles non fermentants ont été également mises en évidence.

Tout d'abord, les souches d'*Acinetobacter baumannii* ont été rendus toutes deux en *Acinetobacter pitii* selon l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT®. *Acinetobacter pitii* appartient au groupe *Acinetobacter baumannii complex* et en est très proche phylogénétiquement. De plus *Acinetobacter pitii* est absent du thésaurus VITEK (base de donnée VITEK 2® et VITEK MS®) et API32 GN®, ce qui ne permet pas de connaître un

autre résultat d'identification par la technique usuelle du laboratoire qu'est le VITEK2®. Cependant, la réalisation des antibiogrammes de ces souches a permis de retrouver un profil généralement plus sensible que le profil d'*Acinetobacter baumannii*, ce qui concorde avec les données de la littérature (49).

Ensuite, les souches du genre *Pseudomonas* ont également été l'objet de discordances. De la même façon que pour les autres souches, il s'agit de discordances dans un même groupe. *Pseudomonas putida* a été identifié en temps que *Pseudomonas monteii*, qui appartient au groupe *Pseudomonas putida* et une souche de *Pseudomonas fluorescens* a été identifié comme *Pseudomonas syneonthis*, appartenant également au groupe *Pseudomonas fluorescens*.

Les plus grandes discordances se sont produites dans les identifications des Streptocoques.

Principalement par les identifications à tort par le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT® de souches de *Streptococcus mitis* ou de *Streptococcus oralis* qui sont rendues *Streptococcus pneumoniae* avec un score de confiance au rang de l'espèce et une répétabilité complète. Toutes ces souches appartiennent au groupe des Streptocoques oraux. Elles étaient résistantes à l'optochine, ce qui permettait par ce test simple de mettre en évidence ces erreurs. **La conduite à tenir face à des bactéries identifiées comme *Streptococcus pneumoniae* mais qui n'en présentent pas les caractéristiques morphologiques doivent être testées vis-à-vis de l'optochine.**

Les discordances ont également été constatées pour des souches de *Streptococcus pyogenes* qui ont été identifiées *Streptococcus dysgalactiae* par le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT®. Les tests d'agglutination ont pourtant bien confirmés l'appartenance au groupe A de la classification de Lancefield des souches.

L'identification de la souche *Streptococcus bovis* a été proposée comme *Streptococcus equinus* par le spectromètre BIOTYPER MICROFLEX LT®. Après analyse de la base de données, il a été constaté qu'il n'existe pas de spectre de référence correspondant à *Streptococcus bovis*, la dénomination de la société BRUKER étant *Streptococcus equinus* (plus actuelle et plus précise) puisque ces deux dénominations correspondent à un même groupe d'espèce appartenant au groupe D de la classification de Lancefield. Il n'y a donc pas d'erreur d'identification. Les identifications portant sur un isolat de *Streptococcus bovis* ont eu pour résultat *Streptococcus gallolyticus* sur les deux automates. Ces résultats d'identifications s'expliquent par la forte similitude des profils de ces espèces qui appartiennent également au groupe D de la classification de Lancefield.

De même, la faible sensibilité de la technique MALDI TOF dans le cas de l'identification des Streptocoques est probablement à l'origine de l'identification en *Streptococcus salivarius* d'un *Streptococcus parasanguinis* qui appartient également au groupe des Streptocoques oraux.

Ces difficultés d'identification sont connues des fournisseurs qui sont confrontés à la limite actuelle de la technique en raison de la très forte similitude de profil des spectres entre les espèces de Streptocoques, du fait d'un matériel protéique très similaire.

Il est suspecté des difficultés d'identification des Staphylocoques coagulase négative (SCN).

Une même souche ayant été identifiée par deux fois comme *Staphylococcus epidermidis* sur l'automate VITEK MS® est apparue comme *Staphylococcus hominis* sur l'automate BIOTYPER MICROFLEX LT®, puis lors d'un 2eme essai sur un nouveau spot comme *Staphylococcus haemolyticus*. Craignant une souche de pureté douteuse, des réisolements ont été effectués, et ces mêmes souches ont été identifiées comme *Staphylococcus epidermidis*.

Les principales limites de l'étude menée dans ce travail sont tout d'abord **l'absence de méthode de référence. Il eut fallu une méthode moléculaire** permettant une interprétation objective des discordances ayant été constatées.

On peut également relever la notion de **variabilité inter opérateur** dans la qualité de réalisation des dépôts et du choix des colonies d'intérêts, ce qui toutefois est un élément concret de l'utilisation de routine du spectromètre.

La notion de **contamination de certaines souches** présente également une limite dans le cadre de l'interprétation des performances des automates qui ne sont pas affectées de la même manière en fonction des différents dépôts réalisés.

Enfin, la méthode de conservation en Cryobilles des souches, n'a pas permis la reprise de culture des *Gardnarella vaginalis* et de souches anaérobies.

L'avènement de la spectrométrie de masse en bactériologie médicale est une avancée majeure dans la réalisation des identifications bactérienne. Les critères fournis par la société BRUKER encadre les conditions de validation d'un résultat.

Il ne faut cependant pas méconnaître que les bases de données des fournisseurs ne sont pas totalement exhaustives et qu'il n'est donc pas possible d'identifier tous les micro-organismes.

L'analyse des discordances qui ont été mises en évidence, amène a suggérer une certaine prudence quant aux résultats des identifications proposées. Il est nécessaire de rester dans une démarche cohérente avec les éléments d'orientations réalisés en routine dans le cadre d'une analyse bactériologique, de garder un esprit critique vis-à-vis des résultats et selon la concordance de l'identification et de l'antibiogramme obtenu, ainsi que de bien connaître les limites de l'identification par la technique de spectrométrie de masse MALDI TOF.

L'ensemble de ces résultats concourt à l'élaboration de procédure et de conduite à tenir face aux résultats proposés par l'automate.

Il n'est actuellement pas possible de s'affranchir par exemple des tests d'agglutination afin de déterminer à quel groupe appartiennent des colonies de streptocoque. L'apposition d'un disque d'optochine sur les milieux de culture des prélèvements contenant potentiellement *Streptococcus pneumoniae* demeure une bonne technique d'orientation. La réalisation des identifications bactériennes des micro-organismes de coprocultures pose le problème de l'impossibilité d'identification de *Shigella*, et donc la nécessité de contrôle par une autre méthode d'identification des germes pour lesquels le spectromètre de masse a identifié une souche d'*Escherichia coli*.

Les résultats obtenus dans cette étude concordent avec les données de la littérature.

La comparaison de l'identification par la technique MALDI TOF par rapport aux techniques traditionnellement utilisées au laboratoire montre une corrélation au rang de genre de 97,80% et au rang d'espèce de 92,51%.

Ces résultats sont comparables à ceux des études de :

- Saffert RT et al.(1) qui montrent une corrélation à l'espèce de 93% des isolats de routine,
- Bengali et al. (45)qui montre une concordance de 94,7% des identifications,
- Seng P et al. (10)qui révèle une corrélation à l'espèce de 84,1% et de 95,4% au genre,
- Bizzini A et al. (8) qui révèle une corrélation de 93,2% à l'espèce et de 98,5% au genre
- Neville SA et al. (12)qui montre une corrélation à l'espèce de 85% et au genre de 96%.

De façon similaire à l'étude de Martigny et al, (2) la comparaison de performances des spectromètres BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS® réalisé dans ce travail ne révèle pas de différence significative entre les deux automates.

D'un point de vue clinico-biologique, la technique MALDI TOF a permis de diminuer le délai d'identification bactérienne et présente ainsi un intérêt clinique majeur. Grâce à la diminution du délai diagnostic, une antibiothérapie ciblée peut être mise en place, ainsi une diminution de la mortalité serait permise. Par exemple, dans le cas des prélèvements d'hémocultures ou de liquide céphalo-rachidien, une identification du micro-organisme pour un délai inférieur à 8 heures de cultures est maintenant réalisable.

L'utilisation d'antibiothérapie large spectre pourrait ainsi être réduite et l'impact sur l'écologie bactérienne ralentirait l'émergence de bactérie multi résistante (7,8,10,33).

Conclusion :

La spectrométrie de masse MALDI TOF présente un intérêt majeur dans l'identification bactérienne et mycologique de routine.

Les performances de cette technique d'identification qui ont été vérifiées au cours de ce travail révèlent une corrélation au rang de l'espèce dans plus de 90% des cas et une corrélation au rang de genre dans plus de 95% des cas, dans le cadre de l'identification des germes isolés lors de l'activité de routine d'un laboratoire de bactériologie. Il ressort de cette comparaison de méthodes que les discordances mises en évidence résultent dans la majorité des cas d'une plus grande finesse d'analyse de la méthode de spectrométrie de masse. En effet la base de données disponible avec cette nouvelle technologie est beaucoup plus exhaustive que les bases de données disponibles avec les méthodes d'identifications traditionnelles. La réalisation de tests permettant d'être discriminatifs entre les identifications proposées par les différentes méthodes oriente dans la majorité des cas vers la veracité de l'identification proposée par la spectrométrie de masse.

La corrélation des résultats entre les automates de spectrométrie de masse BIOTYPER MICORFLEX LT® et de spectrométrie de masse VITEK MS® à été bonne. La vérification de la robustesse de la méthode en fonction du milieu de culture du micro-organisme ainsi qu'en fonction du vieillissement des colonies bactériennes n'a pas mise en évidence de difficulté d'identification selon les critères de validation recommandés par la société BRUKER.

Sur le plan clinico-biologique, la connaissance plus précoce de l'identification bactérienne peut permettre une réaction plus rapide sur l'adaptation de l'antibiotique à la souche pathogène de par la connaissance des phénotypes de résistances naturelles de certaines espèces ou de leurs virulences.

Les perspectives de développement de cette technique sont nombreuses et les études réalisées semblent encourageantes. Le délai d'identification des septicémies pourrait être encore réduit par la réalisation d'une identification directement à partir du bouillon de cultures des hémocultures (50–53). Il semble également possible de détecter directement sur des colonies bactériennes la présence de facteurs de virulence tels que la toxine de Penton Valentin PVL chez *Staphylocoque aureus* (54,55)(56) ou encore le profil de résistance à certains antibiotiques lié à la présence d'une pénicillinase, d'une carbapénèmase ou d'une BLSE (bêtalactamase à spectre étendu) (57–62).

L'arrivée du spectromètre de masse MALDI TOF pour l'identification bactérienne dans les laboratoires de bactériologie est une avancée majeure et les perspectives d'adaptation de cette méthode afin d'apporter des diagnostics précis, fiables et plus précoces sont encourageantes. De nouvelles études seront cependant nécessaires afin de s'assurer de la pertinence de l'application de ces techniques en bactériologie de routine et afin de permettre d'assurer la qualité des analyses réalisées.

Références:

1. Saffert RT, Cunningham SA, Ihde SM, Monson Jobe KE, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometer to BD Phoenix Automated Microbiology System for Identification of Gram-Negative Bacilli[∇]. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):887-892.
2. Martiny D, Busson L, Wybo I, El Haj RA, Dediste A, Vandenberg O. Comparison of the Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 2012;50(4):1313-1325.
3. Veen SQ van, Claas ECJ, Kuijper EJ. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(3):900-907.
4. Wilkins CL, Lay JO. *Identification of Microorganisms by Mass Spectrometry.* John Wiley & Sons; 2005.
5. Szabados F, Woloszyn J, Richter C, Kaase M, Gatermann S. Identification of molecularly defined *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry and the Biotyper 2.0 database. *J Med Microbiol.* 2010;59(7):787-790.
6. Dekker JP, Branda JA. MALDI-TOF Mass Spectrometry in the Clinical Microbiology Laboratory. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2011;33(12):87-93.
7. Lavigne J-P, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* 2013;51(2):257-270.
8. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010;16(11):1614-9.
9. Bansal SS, Halket JM, Fusova J, Bomford A, Simpson RJ, Vasavda N, et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry RCM.* 2005;19(6):1531-1542.
10. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, Scola BL, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin Infect Dis.* 2009;49(4):543-551.
11. Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(5):1549-1554.
12. Neville SA, LeCordier A, Ziochos H, Chater MJ, Gosbell IB, Maley MW, et al. Utility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry following Introduction for Routine Laboratory Bacterial Identification [∇]. *J Clin Microbiol.* 2011;49(8):2980-2984.

13. Bizzini A, Jaton K, Romo D, Bille J, Prod'hom G, Greub G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry as an Alternative to 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of Difficult-To-Identify Bacterial Strains. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):693-696.
14. Santos C, Paterson RRM, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010;108(2):375-385.
15. Haigh J, Degun A, Eydmann M, Millar M, Wilks M. Improved Performance of Bacterium and Yeast Identification by a Commercial Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System in the Clinical Microbiology Laboratory [∇]. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3441.
16. Bougnoux M-É, Lacroix C, Hassouni N, Beretti J-L, Dauphin B. Intérêt de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF pour l'identification des champignons filamenteux. *Bio trib. mag.* 2011;40(1):45-49.
17. Pinto A, Halliday C, Zahra M, Van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identification of Yeasts Is Contingent on Robust Reference Spectra. *PLoS ONE.* 13 oct 2011;6(10):e25712.
18. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and Cost Analysis of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Routine Identification of Yeast[∇]. *J Clin Microbiol.* 2011;49(4):1614-1616.
19. Fournier R, Wallet F, Grandbastien B, Dubreuil L, Courcol R, Neut C, et al. Chemical extraction versus direct smear for MALDI-TOF mass spectrometry identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 2012;18(3):294-297.
20. Veloo ACM, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clinical Microbiology and Infection.* 2011;17(10):1501-6.
21. Jamal WY, Shahin M, Rotimi VO. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry methods and API 20AN for identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *J Med Microbiol [Internet].* 2012 [cité 17 janv 2013]; Disponible sur: <http://jmm.sgmjournals.org/content/early/2012/12/11/jmm.0.053256-0>
22. Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, Fisher MA. Identification of HACEK Clinical Isolates by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry[∇]. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):1104-1106.
23. De Mouy D, Cavallo JD, Fabre R, Garrabe E, Grobost F, Armengaud M, et al. Les entérobactéries isolées d'infections urinaires en pratique de ville : étude AFORCOPIBIO 1995. *Médecine et Maladies Infectieuses.* 1997;27, Supplement 6:642-645.
24. Bouassida K, Jaidane M, Hidoussi A, Tlili G, Ben Meriem K, Hmida W, et al. Étude analytique des infections urinaires nosocomiales à entérobactéries élaboratrices de bêta-lactamase à spectre étendu et stratégie de lutte. *Progrès en Urologie.* 2012;22(13):813.
25. Kaltenbach G, Heitz D, Vogel T, Noblet-Dick M, Martin-Hunyadi C, Kiesmann M, et al. Les infections urinaires à entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu

[Internet]. Presse Med. 2002. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/92721/article/les-infections-urinaires-a-enterobacteries-product>

26. B Colomb, M f Bouthet, S Aho, K Astruc, G Guerre, C Neuwirth, N Henri, S Amiot, A Lévy, J B Gouyon. CONTRÔLE DES INFECTIONS NOSOCOMIALES A STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTANT À LA MÉTHICILLINE DANS DEUX UNITÉS DE NÉONATOLOGIE. CHU, Bd de Lattre de Tassigny, Dijon, France.
27. Etienne J, Brun Y, Billard M, Fleurette J. Hospital dispersion of *Staphylococcus epidermidis* isolates resistant to a fluoroquinolone, pefloxacin. *Epidemiol. Infect.* 1989;103(3):459-464.
28. VILLERS D, RICHEL H, LEPELLETIER D, FERREOL S. Infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline en réanimation médicale polyvalente : facteurs de risque, morbidité et impact économique. 2004.
29. Les infections nosocomiales à *Staphylococcus aureus* résistants à la méticilline : épidémiologie, prévention et antibiothérapie [Internet]. EM-Consulte. [cité 26 févr 2013]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/87549/article/les-infections-nosocomiales-a-resistants-a-la-meti>
30. Grollier G, Le Moal G, Robert R. Infections dues aux bactéries anaérobies de la flore endogène (*Clostridium difficile* et *Actinomyces* exclus). *EMC - Maladies Infectieuses.* 2004;1(4):262-280.
31. Société Française de Microbiologie. REMIC. 4ème édition. 2010.
32. Archambaud M, Clavé D, Grosjean J, Pasquier C. Bactériologie et virologie pratique. Groupe de Boeck; 2009.
33. Carbonnelle é., Nassif X. Implantation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans les laboratoires de microbiologie : quels changements pour les cliniciens ? *Réanimation.* 2012;21(3):351-361.
34. Honoré S, Trillard M, Ould-Hocine Z, Lesprit P, Deforges L, Legrand P. Contribution de la recherche d'antigénurie pneumococcique couplée à celle d'antigénurie légionelle au diagnostic des pneumonies à l'hôpital. *Pathologie Biologie.* 2004;52(8):429-433.
35. *Clostridium difficile* [Internet]. EM-Consulte. [cité 21 mars 2013]. Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/60986/clostridium-difficile>
36. Baty G, Lanotte P, Hocqueloux L, Prazuck T, Bret L, Romano M, et al. [PCR rDNA 16S used for the etiological diagnosis of blood culture negative endocarditis]. *Med Mal Infect.* 2010;40(6):358-362.
37. Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe.* 2005;11(1-2):79-91.
38. Dubouix-Bourandy A, De Ladoucette A, Pietri V, Mehdi N, Benzaquen D, Guinand R, et al. Direct detection of *Staphylococcus osteoarticular* infections by use of Xpert MRSA/SA SSTI real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2011;49(12):4225-4230.
39. Malhotra-Kumar S, Van Heirstraeten L, Lee A, Abrahantes JC, Lammens C, Vanhommerig E, et al. Evaluation of molecular assays for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(12):4598-4601.

40. Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38(10):3623-3630.
41. Mignard S, Flandrois JP. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: a 30-month experiment. *J. Microbiol. Methods.* 2006;67(3):574-581.
42. Kolbert CP, Persing DH. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999;2(3):299-305.
43. Bosshard PP, Abels S, Zbinden R, Böttger EC, 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.
44. Mellmann A, Müthing J. MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Microbial Identification. In: Tang Y-W, Stratton CW, éditeurs. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology.* 2013. p. 187-207.
45. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Clinically Relevant Bacteria. Ahmed N, éditeur. *PLoS ONE.* 2011;6(1):e16424.
46. Boéri D. Maîtriser la qualité: Tout sur la certification et la qualité totale, Les nouvelles normes ISO 9001. Editions Maxima; 2003.
47. Société Française de Microbiologie. QUAMIC. 2011.
48. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001;51(Pt 3):925-932.
49. Nemeč A, Krizova L, Maixnerova M, Van der Reijden TJK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res. Microbiol.* 2011;162(4):393-404.
50. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010;16(11):1620-1625.
51. La Scola B, Raoult D. Direct Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Bottles by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE.* 25 nov 2009;4(11):e8041.
52. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper(TM) and Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS One [Internet].* 2011 [cité 1 mars 2013];6(8). Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156714/>

53. Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1481-1483.
54. Rose NL, Sporns P, McMullen LM. Detection of Bacteriocins by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999;65(5):2238-2242.
55. Bittar F, Ouchenane Z, Smati F, Raoult D, Rolain J-M. MALDI-TOF-MS for rapid detection of staphylococcal Panton-Valentine leukocidin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2009;34(5):467-470.
56. Szabados F, Becker K, Von Eiff C, Kaase M, Gatermann S. The matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based protein peaks of 4448 and 5302 Da are not associated with the presence of Panton-Valentine leukocidin. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011;301(1):58-63.
57. Cai JC, Hu YY, Zhang R, Zhou HW, Chen G-X. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):2179-2182.
58. Corpillo D, Cabella C, Geninatti Crich S, Barge A, Aime S. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2007;389(20):6012-6016.
59. Hettick JM, Green BJ, Buskirk AD, Kashon ML, Slaven JE, Janotka E, et al. Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Biochemistry.* 2008;22(2):2555-2560.
60. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel J-M, Drissi M, et al. Rapid Detection of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e31676.
61. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Based Functional Assay for Rapid Detection of Resistance against β -Lactam Antibiotics. *J Clin Microbiol.* 2012;50(3):927-937.
62. Majcherczyk PA, McKenna T, Moreillon P, Vaudaux P. The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters.* 2006;255(2):233-9.

Annexes:

ANNEXE 1 : Résultats des identifications réalisées en parallèle par la technique traditionnelle et par le spectromètre de masse BIOTYPER MICROFLEX LT®

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|-------------------------------|---------|-------------------------------|-------|--------------|
| ENTEROBACTERIES | | | | |
| <i>Citrobacter braakii</i> | Vitek | <i>Citrobacter braakii</i> | 2,318 | |
| <i>Citrobacter braakii</i> | Vitek | <i>Citrobacter braakii</i> | 2,368 | |
| <i>Citrobacter koseri</i> | Vitek | <i>Citrobacter koseri</i> | 2,426 | |
| <i>Citrobacter koseri</i> | Vitek | <i>Citrobacter koseri</i> | 2,46 | |
| <i>Citrobacter koseri</i> | Vitek | <i>Citrobacter koseri</i> | 2,413 | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Vitek | <i>Citrobacter freundii</i> | 2,254 | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Vitek | <i>Citrobacter freundii</i> | 2,252 | |
| ENTEROBACTERIES | | | | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Vitek | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 2,417 | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Vitek | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 2,549 | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Vitek | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 2,43 | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | Vitek | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 2,383 | |

| | | | | |
|--------------------------------|-----------|------------------------------|-------|---|
| <i>Enterobacter hormaechei</i> | | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2,287 | groupe <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Vitek | <i>Enterobacter kobei</i> | 2,1 | groupe <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Vitek | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2,234 | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Vitek | <i>Enterobacter asburiae</i> | 2,121 | groupe <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Vitek | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2,175 | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Vitek | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1,967 | 9 espèces du groupe <i>Enterobacter cloacae</i> |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | Vitek | <i>Enterobacter cloacae</i> | 2,089 | |
| <hr/> | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | | <i>Escherichia coli</i> | 2,413 | |
| <i>Escherichia coli</i> | CQE AGLAE | <i>Escherichia coli</i> | 2,235 | |
| <i>Escherichia coli</i> | CQE AGLAE | <i>Escherichia coli</i> | 2,406 | |
| <i>Escherichia coli</i> | CQE AGLAE | <i>Escherichia coli</i> | 2,331 | |
| <i>Escherichia coli</i> | CQE AGLAE | <i>Escherichia coli</i> | 2,299 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,348 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,33 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,427 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 1,985 | 10 choix pour <i>Escherichia coli</i> |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,374 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,407 | |

| | | | | |
|------------------------------|-------|------------------------------|-------|---|
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,364 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,287 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,316 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,394 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,367 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,388 | |
| <i>Escherichia coli</i> | Vitek | <i>Escherichia coli</i> | 2,306 | |
| | | | | |
| <i>Hafnia alvei</i> | Vitek | <i>Hafnia alvei</i> | 2,544 | |
| <i>Hafnia alvei</i> | Vitek | <i>Hafnia alvei</i> | 2,582 | |
| <i>Hafnia alvei</i> | Vitek | <i>Hafnia alvei</i> | 2,514 | |
| <i>Hafnia alvei</i> | Vitek | <i>Hafnia alvei</i> | 2,363 | |
| | | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,377 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,164 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,474 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,364 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,527 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1,969 | 7 choix pour <i>Klebsiella pneumoniae</i> |

| | | | | |
|------------------------------|-------|------------------------------|-------|---|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1,758 | 9 choix pour <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,472 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 2,39 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Vitek | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1,906 | 8 choix pour <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Vitek | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2,295 | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Vitek | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2,302 | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | Vitek | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2,42 | |
| | | | | |
| <i>Morganella morganii</i> | Vitek | <i>Morganella morganii</i> | 2,537 | |
| <i>Morganella morganii</i> | Vitek | <i>Morganella morganii</i> | 2,511 | |
| <i>Morganella morganii</i> | Vitek | <i>Morganella morganii</i> | 2,234 | |
| <i>Morganella morganii</i> | Vitek | <i>Morganella morganii</i> | 2,62 | |
| | | | | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,54 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,547 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,578 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,37 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,412 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,518 | |

| | | | | |
|-------------------------------|-------------------|-----------------------------------|-------|--|
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,455 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,43 | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Vitek | <i>Proteus mirabilis</i> | 2,151 | |
| <i>Proteus vulgaris</i> | Vitek | <i>Proteus vulgaris</i> | 2,415 | |
| | | | | |
| <i>Providencia stuartii</i> | Souche collection | <i>Providencia stuartii</i> | 2,52 | |
| <i>Providencia stuartii</i> | Vitek | <i>Providencia stuartii</i> | 2,416 | |
| | | | | |
| <i>Raoultella panticola</i> | Vitek | <i>Raoultella ornithinolytica</i> | 2,373 | Spectres très similaires pour les deux espèces |
| | | | | |
| <i>Salmonella Typhimurium</i> | Vitek | <i>Salmonella sp</i> | 2,382 | |
| <i>Salmonella sp</i> | Vitek | <i>Salmonella sp</i> | 2,402 | |
| <i>SalmonellaTyphimurium</i> | Vitek | <i>Salmonella sp</i> | 2,407 | |
| <i>Salmonella sp</i> | Vitek | <i>Salmonella sp</i> | 2,378 | |
| | | | | |
| <i>Shigella boydii</i> | Souche collection | <i>Escherichia coli</i> | 2,354 | Spectres proches d' <i>Escherichia coli</i> , non dissociables |
| <i>Shigella flexneri</i> | Souche collection | <i>Escherichia coli</i> | 2,11 | pour le moment |
| <i>Shigella sonnei</i> | Souche collection | <i>Escherichia coli</i> | 2,337 | |
| <i>Shigella sonnei</i> | Souche collection | <i>Escherichia coli</i> | 2,3 | |

| | | | |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------------|-------|
| <i>Serratia marcescens</i> | Souche collection | <i>Serratia marcescens</i> | 2,277 |
| <i>Serratia marcescens</i> | Souche collection | <i>Serratia marcescens</i> | 2,32 |
| <i>Serratia marcescens</i> | Vitek | <i>Serratia marcescens</i> | 2,411 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Souche collection | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 2,386 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Souche collection | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 2,374 |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Vitek | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 2,253 |

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|------------------------------|---------|------------------------------|-------|--------------|
| STAPHYLOCOQUES | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,371 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,305 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,442 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,451 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,402 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,372 | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,295 | |

| | | | |
|------------------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,444 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,417 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,451 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,266 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus aureus</i> | 2,435 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus capitis</i> | 2,147 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus capitis</i> | 2,069 |
| <i>Staphylococcus capitis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus capitis</i> | 2,182 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2,273 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2,229 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2,029 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2,084 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2,217 |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2,086 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2,131 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2,103 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2,201 |
| <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | Vitek | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 2,329 |

| | | | | |
|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|--|
| <i>Staphylococcus hominis</i> | Vitek | <i>Staphylococcus hominis</i> | 2,346 | |
| <i>Staphylococcus simulans</i> | Vitek | <i>Staphylococcus simulans</i> | 2,193 | |
| <i>Staphylococcus warneri</i> | Vitek | <i>Staphylococcus sp</i> | 1,499 | 1 ^{er} passage : degré de confiance insuffisant |
| | | | 1,626 | 2eme passage idem |
| <i>Micrococcus luteus</i> | Vitek | <i>Micrococcus luteus</i> | 2,287 | |

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|---------------------------------|----------|---------------------------------|-------|--------------|
| STREPTOCOQUES | | | | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,399 | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Vitek | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,353 | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Vitek | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,211 | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Streptex | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,324 | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Streptex | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,327 | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Streptex | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,455 | |

| | | | | |
|---------------------------------|-------------|-----------------------------------|-------|---|
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | chromogène | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,351 | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Streptex | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1,862 | 9 choix pour <i>Streptococcus agalactiae</i> |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | Vitek | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 2,341 | |
| <i>Streptococcus grp.A</i> | Streptex | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 2,39 | |
| <i>Streptococcus grp.C</i> | Streptex | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2,154 | |
| <i>Streptococcus grp.G</i> | Streptex | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2,138 | |
| <i>Streptococcus grp.G</i> | Streptex | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2,283 | |
| <i>Streptococcus grp.G</i> | Streptex | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2,184 | |
| <i>Streptococcus grp.G</i> | Streptex | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 2,331 | |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,178 | |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | optochine S | <i>Pas de pic</i> | | 4 passages par 2 techniciens + 1 extraction : pas de résultat |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | optochine S | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,261 | spectre proche entre <i>Streptococcus oralis/mitis/pneumoniae</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | optochine S | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,334 | spectre proche entre <i>Streptococcus oralis/mitis/pneumoniae</i> |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | optochine S | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,258 | |

| | | | | |
|-----------------------------------|-------------|--|-------|--|
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | optochine S | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,416 | |
| <i>Streptococcus thermophilus</i> | | <i>Streptococcus thermophilus</i> | 2,362 | |
| <i>Streptococcus anginosus</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus anginosus</i> | 2,086 | |
| <i>Streptococcus anginosus</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus anginosus</i> | 2,08 | |
| <i>Streptococcus bovisII</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus equinus</i> | 2,207 | Streptococcus groupe bovis |
| <i>Streptococcus constellatus</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus constellatus</i> | 2,363 | |
| <i>Streptococcus constellatus</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus constellatus</i> | 2,156 | |
| <i>Streptococcus gallolyticus</i> | Vitek | <i>Streptococcus gallolyticus</i> | 2,366 | |
| <i>Streptococcus gordonii</i> | Vitek | <i>Streptococcus gordonii</i> | 2,25 | |
| <i>Streptococcus oralis</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,202 | répétabilité : 7 ; optochine R Extraction rapide et totale : <i>S.pneumoniae</i> >2 |
| <i>Streptococcus oralis</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus oralis/pneumoniae</i> | 1,843 | 2 passages |
| <i>Streptococcus oralis/mitis</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 2,167 | |
| <i>Streptococcus salivarius</i> | Vitek | <i>Streptococcus salivarius</i> | 2,296 | |

| | | | |
|---------------------------------|-----------|---------------------------------|-------|
| <i>Streptococcus salivarius</i> | RapidId32 | <i>Streptococcus salivarius</i> | 2,074 |
|---------------------------------|-----------|---------------------------------|-------|

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|--------------------------------|-------------|------------------------------|-------|--|
| ENTEROCOQUES | | | | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,443 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,482 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1,813 | 5 choix pour <i>Enterococcus faecalis</i> , 5 choix pour d'autres genres |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,386 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,415 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,387 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,402 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,521 | |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecalis</i> | 2,42 | |
| <i>Enterococcus faecium</i> | RapidID32St | <i>Enterococcus faecium</i> | 2,454 | |
| <i>Enterococcus faecium</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecium</i> | 2,353 | |
| <i>Enterococcus gallinarum</i> | Vitek | <i>Enterococcus faecium</i> | 2,483 | Api 20 strept : <i>Enterococcus faecium</i> + Imp : ImpR |

| | | | | |
|---------------------------------|------------|-----------------------------------|-------|--|
| <i>Aerococcus viridans</i> | Vitek | <i>Aerococcus sanguinicola</i> | 2,329 | <i>Aerococcus sanguinicola</i> absent du thesaurus Vitek |
| <i>Aerococcus viridans</i> | Vitek | <i>Aerococcus sanguinicola</i> | 2,426 | <i>Aerococcus sanguinicola</i> absent du thesaurus Vitek |
| <i>Aerococcus urinae</i> | Vitek | <i>Aerococcus urinae</i> | 1,989 | 7 choix pour <i>Aerococcus urinae</i> |
| <i>Aerococcus urinae</i> | Rapid32str | <i>Aerococcus urinae</i> | 2,145 | |
| Corynebacterium | | | | |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | RapidCB+ | <i>Corynebacterium striatum</i> | 2,052 | |
| <i>Corynebacterium striatum</i> | RapidCB+ | <i>Corynebacterium striatum</i> | 2,372 | |
| Corynebacterium spp. | | | | |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | Gram+Cat | <i>Corynebacterium macginleyi</i> | 2,158 | |
| <i>Corynebacterium spp.</i> | Gram+Cat | <i>Corynebacterium jeikeium</i> | 2,127 | |
| <i>Bacillus sp</i> | | <i>Clostridium halophilum</i> | 1,858 | deuxième passage : <i>Bacillus cereus</i> 1.789 |
| <i>Bacillus sp, (lentus)</i> | Api 50CH | <i>Bacillus cereus</i> | 2,361 | |

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|---|------------|--------------------------------|-------|---------------------------------------|
| BACILLES à GRAM NEGATIFS NON FERMENTANTS | | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2,479 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Vitek | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2,495 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Vitek | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2527 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Vitek | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2,252 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Vitek | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2,484 | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Vitek | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 2,683 | |
| <i>Pseudomonas putida</i> | Api ID32GN | <i>Pseudomonas monteilii</i> | 2,079 | groupe <i>Pseudomonas putida</i> |
| <i>Pseudomonas putida</i> | Vitek | <i>Pseudomonas putida</i> | 2,285 | |
| <i>Pseudomonas mendocina</i> | Api ID32GN | <i>Pseudomonas mendocina</i> | 2,057 | |
| <i>Pseudomonas fluorescens 2</i> | Api ID32GN | <i>Pseudomonas synxantha</i> | 2,062 | groupe <i>Pseudomonas fluorescens</i> |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,282 | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,416 | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,509 | |

| | | | | |
|--|-------------|-------------------------------------|-------|---|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter pittii</i> | 2,153 | Api ID32GN : <i>Acinetobacter baumannii</i> ; extraction maldi : <i>Acinetobacter pittii</i> <i>Acinetobacter pittii</i> absent du thésaurus Vitek et 32 GN |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,483 | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,368 | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 2,327 | |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter pittii</i> | 2,419 | Api ID32GN : <i>Acinetobacter baumannii</i> ; extraction maldi : <i>Acinetobacter pittii</i> |
| <i>Acinetobacter lwoffii</i> | Vitek | <i>Acinetobacter lwoffii</i> | 2,351 | |
| <i>Acinetobacter lwoffii/johnsonii</i> | Vitek +32GN | <i>Acinetobacter johnsonii</i> | 2,375 | identification Maldi tof après extraction rapide et totale : <i>Acinetobacter johnsonii</i> ID 32GN à 72h : <i>Acinetobacter johnsonii</i> : 0 test à l'encontre, probabilité d'identification 78,3% |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | Vitek | <i>Alcaligenes faecalis</i> | 2,245 | |
| <i>Achromobacter xylosoxydans</i> | Id32GN | <i>Achromobacter xylosoxydans</i> | 2,335 | |
| <i>Burkholderia cepacia</i> | Vitek | <i>Burkholderia cenocepacia</i> | 2,259 | |
| <i>Delftia acidovorans</i> | Vitek | <i>Delftia acidovorans</i> | 2,077 | |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | Vitek | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 2,123 | |

| | | | | |
|-----------------------------------|--------|-----------------------------------|-------|--|
| <i>Moraxella gr (osloensis)</i> | Vitek | <i>Moraxella osloensis</i> | 1,887 | |
| <i>Moraxella (Br) catarrhalis</i> | Api NH | <i>Moraxella (Br) catarrhalis</i> | 2,257 | |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Api NH | <i>Haemophilus influenzae</i> | 2,106 | |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Api NH | <i>Haemophilus influenzae</i> | 2,118 | |
| <i>Haemophilus influenzae</i> | Api NH | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1,926 | 8 choix pour <i>Haemophilus influenzae</i> |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | Api NH | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 2,253 | |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | Api NH | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 2,095 | |
| <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | Api NH | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | 2,034 | |

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|-----------------------------|------------|-----------------------------|-------|--------------|
| ANAEROBIES | | | | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | RapidanaII | <i>Bacteroides fragilis</i> | 2,4 | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | Api+Remel | <i>Bacteroides fragilis</i> | 2,436 | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | RapidanaII | <i>Bacteroides fragilis</i> | 2,424 | |

| | | | |
|--------------------------------|------------|--------------------------------|-------|
| <i>Bacteroides fragilis</i> | RapidanaII | <i>Bacteroides fragilis</i> | 2,403 |
| <i>B.thetaiotaomicron</i> | RapidanaII | <i>B. thetaiotaomicron</i> | 2,137 |
| <i>Bacteroides ureolyticus</i> | RapidanaII | <i>Bacteroides ureolyticus</i> | 2,12 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,169 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,185 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,228 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,196 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,194 |
| <i>Clostridium difficile</i> | Remel | <i>Clostridium difficile</i> | 2,215 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,332 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,024 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,222 |
| <i>Clostridium difficile</i> | RapidanaII | <i>Clostridium difficile</i> | 2,431 |
| <i>Clostridium innocuum</i> | RapidanaII | <i>Clostridium innocuum</i> | 2,04 |

| | | | | |
|-----------------------------------|------------|-------------------------------------|-------|---|
| <i>Clostridium ramosum</i> | RapidanaII | <i>Clostridium ramosum</i> | 2,161 | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | | <i>Clostridium perfringens</i> | 2,31 | |
| <i>Fusobacterium necrophorum</i> | RapidanaII | <i>Fusobacterium nucleatum</i> | 2,316 | |
| <i>Paenibacillus sp.</i> | Api50CH | <i>Paenibacillus glucanolyticus</i> | 1,922 | Pas de reproductibilité. Deuxième passage idem : score 1,817 |
| <i>Parabacteroides distasonis</i> | RapidanaII | <i>Parabacteroides johnsonii</i> | 1,996 | 1 seul spectre dans la base de données pour P.johnsonii, autres choix pour distasonis (4) |
| <i>Ps anaerobius</i> | RapidanaII | <i>Ps anaerobius</i> | 2,196 | |
| <i>Ps asaccharolyticus</i> | RapidanaII | <i>Peptoniphilus harei</i> | 2,336 | |
| <i>Veillonella sp</i> | Api+Remel | <i>Veillonella parvula</i> | 2,184 | |
| <i>Helicobacter pylori</i> | Api Campy | <i>Helicobacter pylori</i> | 1,701 | reproductibilité : 5 ; deuxième passage : 1,653 reproductibilité : 6 |
| <i>Campylobacter coli</i> | Api Campy | <i>Campylobacter coli</i> | 2,305 | |
| <i>Campylobacter jejuni</i> | Api Campy | <i>Campylobacter jejuni</i> | 2,293 | |
| <i>Actinomyces sp</i> | cbplus | <i>Actinomyces neuui</i> | 2,402 | |

| | | | | |
|--|------------|-------------------------------------|----------------|--|
| <i>Actinomyces turicensis</i> | RapidanaII | <i>Actinomyces turicensis</i> | 2,244 | |
| <i>Trueperella (Arcano) bernardiae</i> | Remel CB+ | <i>Trueperella bernardiae</i> | (Arcano) 1,929 | 3 choix <i>Trueperella bernardiae</i> , 3 spectres dans la base. |
| <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> | Api Coryne | <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> | 2,28 | |
| <i>Dermabacter hominis</i> | Rapid CB+ | <i>Dermabacter hominis</i> | 1,591 | 4 choix pour <i>Dermabacter hominis</i> |
| <i>Propionibacterium avidum</i> | Api Coryne | <i>P. sp [2]/P. avidum</i> | 2,06 | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 1,995 | 10 choix pour <i>Propionibacterium acnes</i> |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 2,289 | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 2,109 | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 2,262 | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 2,218 | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 2,169 | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | RapidanaII | <i>Propionibacterium acnes</i> | 2,257 | |

| Identification | galerie | Identification MALDI | score | commentaires |
|-------------------------------|---------|--------------------------------|-------|--|
| LEGIONELLES | | | | |
| <i>Legionella pneumophila</i> | | <i>Legionella pneumophila</i> | 1,773 | 9 choix pour <i>Legionella pneumophila</i> |
| <i>Legionella pneumophila</i> | | <i>Legionella pneumophila</i> | 1,98 | 9 choix pour <i>Legionella pneumophila</i> |
| <i>Legionella spp</i> | | <i>Legionella dumoffii</i> | 2,347 | |
| <i>Legionella spp</i> | | <i>Legionella dumoffii</i> | 2,225 | |
| <i>Legionella spp</i> | | <i>Legionella dumoffii</i> | 2,156 | |
| LEVURES | | | | |
| <i>Candida parapsilosis</i> | | <i>Candida parapsilosis</i> | 2,276 | |
| <i>Candida kefyr</i> | | <i>Candida kefyr</i> | 1,993 | 5 choix pour <i>Candida Kefyr</i> |
| <i>Rhodotorula sp.</i> | | degré de confiance insuffisant | 1,633 | 7 choix pour <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> |
| <i>Candida krusei</i> | | <i>Candida krusei</i> | 2,036 | |

ANNEXE 2: Résultats des identifications des souches de routines des spectromètres BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS®.

| | souches | vitek ms | | | | microflex Bruker | | | | commentaires |
|-----|--------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|------------------------|---|--|--------------|
| | | identifications correctes à l'espèce | identifications correctes au genre | identification absente | identifications correctes à l'espèce | identifications correctes au genre | identification absente | | | |
| 145 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Acinetobacter pitii</i> par Bruker | | |
| 158 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Acinetobacter pitii</i> par Bruker | | |
| 196 | <i>Branhamella catarrhalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | |
| 89 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité | | |
| 90 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité | | |
| 91 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | |
| 92 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité | | |
| 93 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité | | |
| 94 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité | | |
| 95 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité | | |
| 96 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | | | |

| | | | | | | | | |
|------------|-----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 97 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 98 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 99 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 100 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 101 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 102 | <i>Candida albicans</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 103 | <i>Candida albicans</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 218 | <i>Candida glabrata</i> | 1 | 1 | 0 | | | | |
| 194 | <i>Candida glabrata</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | <i>Candida albicans</i> , erreur lors de l'isolement de la souche |
| 195 | <i>Candida glabrata</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 193 | <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 212 | <i>Citrobacter freundii</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 265 | <i>Citrobacter freundii</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Citrobacter braakii</i> par Bruker |
| 161 | <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 185 | <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 186 | <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 140 | <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 211 | <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| 126 | <i>Citrobacter koseri</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 81 | <i>Corynebacterium striatum</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 1 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 3 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 4 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 6 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 7 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 8 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 9 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 12 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 13 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 14 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 15 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 16 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 17 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 18 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 19 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 20 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 129 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 130 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 131 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 132 | <i>Escherichia coli</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 118 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 121 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 123 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Enterobacter asburiae</i> par Bruker |
| 122 | <i>Enterobacter cloacae</i> | | | | | | | <i>Escherichia coli</i> , erreur lors de l'isolement de la souche |
| 151 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | rendu <i>Enterobacter asburiae/kobei</i> par Vitek |
| 187 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 188 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 189 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 197 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 198 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 199 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 201 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 204 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 75 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 76 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 155 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 162 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 163 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | |
| 165 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 168 | <i>Enterococcus faecalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 117 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 169 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 206 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 223 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 233 | <i>Enterococcus faecium</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | rendu <i>Enterococcus faecalis</i> par Vitek |
| 237 | <i>Enterococcus faecium</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité, rendu <i>Enterococcus faecalis</i> par Vitek |
| 238 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 228 | <i>Enterococcus faecium</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 135 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|---------------|
| 139 | <i>Enterobacter aerogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 224 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 225 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 179 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 268 | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| | <i>Fusobacterium</i> | | | | | | | pas de pousse |
| | <i>necrophorum</i> | | | | | | | |
| 171 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | | | | | | | pas de pousse |
| 219 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | | | | | | | pas de pousse |
| 221 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 274 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | | | | 1 | 1 | 0 | |
| 110 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | | | | | | | pas de pousse |
| 111 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | | | | | | | pas de pousse |
| 112 | <i>Gardnarella vaginalis</i> | | | | | | | pas de pousse |
| 104 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | | | | pas de pousse |
| 105 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 106 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 107 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 108 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|--------------|
| 109 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 170 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 230 | <i>Haemophilus influenzae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 222 | <i>Kingella kingae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 61 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 133 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 207 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 213 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 231 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 232 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 51 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 52 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 53 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 54 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 55 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 56 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 57 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 58 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 59 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|-------------------------------|
| 60 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 62 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 63 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 64 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 65 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| 66 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 67 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | |
| 244 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 245 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 246 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 247 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 248 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 249 | <i>Legionella</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella dumofii</i> |
| 250 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 251 | <i>Legionella</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella dumofii</i> |
| 252 | <i>Legionella</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella bozemanii</i> |
| 253 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 254 | <i>Legionella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella pneumophila</i> |
| 255 | <i>Legionella</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella bozemanii</i> |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------|---|---|---|---|---|---|-----------------------------|
| 256 | <i>Legionella</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | <i>Legionella bozemanii</i> |
| 180 | <i>Micrococcus spp</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 226 | <i>Morganella morganii</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 141 | <i>Morganella morganii</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 220 | <i>Morganella morganii</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 136 | <i>Pasteurella multocida</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 138 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 148 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 149 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 152 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 124 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 125 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 127 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 128 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 119 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 120 | <i>Proteus mirabilis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 36 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 37 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 38 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| 39 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 40 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 41 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 42 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 43 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 44 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 45 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 46 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 49 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 50 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 164 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 47 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 48 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 257 | <i>Raoultella ornitholytica</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | rendu <i>Klebsiella oxytoca</i> par Vitek |
| 258 | <i>Raoultella ornitholytica</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Raoultella planticola</i> par Bruker |
| 167 | <i>Salmonella</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 21 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 22 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 23 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|------------------------------|---|---|---|---|---|---|---------------|
| 24 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | | | | pas de pousse |
| 25 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 26 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 27 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 28 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 29 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 30 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 31 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 32 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 34 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 35 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 134 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 137 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 143 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 146 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 147 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 154 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 166 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 173 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|-----|-----------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 174 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 177 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 191 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> , contamination? |
| 200 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 202 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 205 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 208 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 209 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 210 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 158 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 | 1 | 0 | | | | <i>Acinetobacter baumannii</i> , contamination |
| 82 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 83 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 84 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 85 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 144 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 150 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 153 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 157 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 159 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Staphylococcus hominis</i> et <i>Staphylococcus haemolyticus</i> par Bruker |
| 160 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 181 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 182 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 116 | <i>Staphylococcus haemolyticus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 33 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| 88 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | |
| 183 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 77 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 266 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 243 | <i>Streptococcus mitis/oralis</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Streptococcus parasanguinis</i> par Vitek rendu <i>Streptococcus pneumoniae</i> par Bruker |
| 72 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Streptococcus castoreus</i> à un meilleur score que <i>Streptococcus pyogenes</i> par Bruker |
| 264 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Streptococcus dysgalactiae</i> par Bruker |
| 275 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>Streptococcus dysgalactiae</i> par Bruker |
| 216 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 236 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 229 | <i>Streptococcus pyogenes</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|-------------------------|
| 241 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 242 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 227 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 235 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 73 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 74 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 78 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 79 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 80 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 70 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 142 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 156 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 172 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 175 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 176 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | répétabilité |
| 178 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 184 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | absence de répétabilité |
| 192 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | |
| 203 | <i>Streptococcus agalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|-----|------------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 269 | <i>Streptococcus bovis</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>S.equi</i> sur Vitek rendu <i>S.lutetiensis</i> sur Bruker |
| 270 | <i>Streptococcus bovis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | rendu <i>S.galloliticus</i> sur les deux automates |
| 259 | <i>Streptococcus constellatus</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 274 | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 71 | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 271 | <i>Streptococcus mitis</i> | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>S.pneumoniae</i> par Bruker |
| 277 | <i>Streptococcus mitis</i> | | | | 0 | 1 | 0 | rendu <i>S.pneumoniae</i> par Bruker |
| 272 | <i>Streptococcus oralis</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | rendu <i>S.parasanguinis</i> par Vitek rendu <i>S.peroris</i> par Bruker |
| 262 | <i>Streptococcus parasanguinis</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 239 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | répétabilité, rendu <i>Streptococcus parasanguinis</i> par Vitek |
| 240 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 214 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 215 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |

| | | | | | | | | |
|------------|---------------------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 86 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 87 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 263 | <i>Streptococcus salivarius</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| 261 | <i>Streptococcus salivarius</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | rendu <i>S.parasanguinis</i> par Brucker |
| 260 | <i>Turicella otitidis</i> | | | | | | | pas de pousse |
| 190 | <i>Yersinia enterocolitica</i> | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | |
| | | | | | | | | |

ANNEXE 3: Résultats d'identifications de la collections de *S.pneumoniae* des sepctromètres BIOTYPER MICROFLEX LT et VITEK MS

| reference | VITEK MS | | | BRUKER SM | | |
|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification | identification correcte à l'espèce | identification correcte au genre | absence d'identification |
| <i>S.pneumoniae</i> 11012 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 12473 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 14300 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 15494 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 17526 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 20706 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 23968 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 24115 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 26447 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 30346 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 38013 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 38987 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 39100 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---------------|
| <i>S.pneumoniae</i> 40503 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 41028 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 41472 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 43945 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 44128 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 44210 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 44565 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 44817 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 46841 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 48034 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 49217 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 49275 | 1 | 1 | 0 | | | pas de pousse |
| <i>S.pneumoniae</i> 497 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 51195 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 51247 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 51450 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 51570 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 51711 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 51943 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | |
|---------------------------|---|---|---|---|---|---|
| <i>S.pneumoniae</i> 52035 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 52040 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 52690 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 53748 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 53752 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 57810 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 62930 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 64951 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 70879 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 727 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 75568 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 78578 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 84351 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 87020 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 88640 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| <i>S.pneumoniae</i> 89149 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 |

ANNEXE 4: Résultats d'identifications des souches de collections des spectromètres BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS®

| | souches | vitek | | | bruker | | |
|-----------|--|---------------------|-------------------|---------|---------------------|-------------------|---------|
| | | correcte à l'espèce | correcte au genre | absente | correcte à l'espèce | correcte au genre | absente |
| 1 | <i>Enterococcus saccharolyticus</i> 430761 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 2 | <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> 33389 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 3 | <i>Enterobacter aerogenes</i> 13048 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 4 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> 12228 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 5 | <i>Staphylococcus aureus</i> 976 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 6 | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 19424 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 7 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9721 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 8 | <i>Neisseria lactamica</i> 23970 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 9 | <i>Oligella urethralis</i> 17466 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 10 | <i>Enterococcus faecalis</i> 29212 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 11 | <i>Kocuria kristinae</i> 752 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 12 | <i>Paenibacillus polymyxa</i> 7070 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 13 | <i>Enterococcus casseliflavus</i> 700327 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 14 | <i>Listeria monocytogenes</i> 751 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 15 | <i>Staphylococcus sciuri</i> 29061 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 16 | <i>Candida lusitanae</i> 7444 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | | |
|----|--|---|---|---|---|---|---|
| 17 | <i>Streptococcus equi</i> 4307 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 18 | <i>Proteus vulgaris</i> 6380 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 19 | <i>Candida parapsilosis</i> 2201 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 20 | <i>Acinetobacter baumannii</i> 747 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 21 | <i>Klebsiella oxytoca</i> 70032 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 22 | <i>Shigella sonnei</i> 2593 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 23 | <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> 1325 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 24 | <i>Staphylococcus aureus</i> 977 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 25 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 1766 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 26 | <i>Enterobacter cloacae</i> 700323 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 27 | <i>Trichosporon mucoides</i> 204094 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 28 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1744 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 29 | <i>Candida albicans</i> 14053 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 30 | <i>Candida glabrata</i> 29501 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 31 | <i>Oligella ureolytica</i> 435941 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 32 | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> 7501 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 33 | <i>Haemophilus influenzae</i> 90071 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 34 | <i>Candida utilis</i> 49501 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 35 | <i>Candida krusei</i> 62581 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |

| | | | | | | | |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|
| 36 | <i>Eikenella corrodens</i> 11521 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 37 | <i>Streptococcus salivarius</i> ssp <i>thermophilus</i> 192581 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 38 | <i>Kloeckere japonica</i> 583701 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| 39 | <i>Clostridium sporogenes</i> 45550 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |

Index des figures:

| | |
|--|----|
| Figure 1: exemple de galerie API® | 18 |
| Figure 2: exemple de galerie rapID 32® | 19 |
| Figure 3: exemple de carte VITEK 2 image consultable le 21/03/13 à l'adresse www.biomerieux-diagnostics.com | 20 |
| Figure 4: Test d'agglutination d'un <i>Staphylococcus</i> | 21 |
| Figure 5: schématisation d'une bandelette de test immunochromatographique. Test rapid INDICIA BIOTECHNOLOGY consultable le 21/03/13 à l'adresse www.indicia.fr | 22 |
| Figure 6: exemple d'électrophoregramme. Consultable le 21/03/13 à l'adresse www.ead.univ-angers.fr | 25 |
| Figure 7: illustration du fonctionnement des puces ADN.image consultable le 21/03/13 à l'adresse www.archee.qc.ca | 26 |
| Figure 8: exemple de spectre (<i>E.coli</i>) | 27 |
| Figure 9: schématisation du principe MALDI TOF (BRUKER)..... | 28 |
| Figure 10: diagramme d'Ishikawa.image consultable le 21/03/13 à l'adresse www.biotechno.fr | 33 |
| Figure 11: spectromètre de masse BRUKER et son unité informatique. | 35 |
| Figure 12: exemple de plaque de l'automate BRUKER..... | 36 |
| Figure 13: interface Infectionaldi® lors de la création de projet. | 37 |
| Figure 14: tableau interprétatif des scores de corrélation. | 38 |
| Figure 15: tableau interprétatif de la cohérence d'analyse. | 38 |
| Figure 16: spectromètre de masse VITEK MS® et son unité informatique. | 39 |
| Figure 17: organisation de la paillasse de travail pour une analyse VITEK MS® | 40 |
| Figure 18: interface de création MYLA®..... | 40 |
| Figure 19: support de plaque VITEK MS® | 41 |
| Figure 20: tableau interprétatif du score d'identification..... | 42 |
| Figure 21: tableau interprétatif du niveau de confiance d'identification. | 42 |
| Figure 22: origine des souches issue du Centre Hospitalier de Roubaix..... | 48 |
| Figure 23: valeurs d'interprétation du coefficient Kappa. | 52 |
| Figure 24: organisation du plan de travail lors de la réalisation des dépôts. | 55 |
| Figure 25: sélection d'une colonie d'intérêt..... | 55 |
| Figure 26: réalisation d'un fin frottis de la colonie à l'aide d'un cône de pipette..... | 55 |
| Figure 27: application d'une goutte de matrice CHCA. | 55 |
| Figure 28: séchage de la plaque de dépôt..... | 56 |
| Figure 29: insertion de la plaque dans la chambre de l'automate..... | 56 |
| Figure 30: dépôt du contrôle de qualité sur plaque BIOMERIEUX..... | 56 |
| Figure 31: dépôt de matrice | 56 |
| Figure 32: insertion du support de plaque dans l'automate VITEK MS®. | 57 |

Index des tableaux :

| | |
|--|----|
| Tableau 1: bibliothèque de souche issue du CH Valenciennes | 46 |
| Tableau 2: bibliothèque de souches d'identification courante issue du Centre Hospitalier de Roubaix. | 47 |
| Tableau 3: Bibliothèque de souches de S.pneumoniae. | 49 |
| Tableau 4: bibliothèque de souches de collection..... | 50 |
| Tableau 5: corrélation identification traditionnelle et identification MALDI TOF | 59 |
| Tableau 6: réalisation en parallèle des identifications de routine sur les automates Bruker et Vitek 2. | 60 |
| Tableau 7: robustesse d'identification selon l'âge des cultures. | 65 |
| Tableau 8: robustesse en fonction du milieu de culture..... | 67 |
| Tableau 9: maîtrise des risques, paramètres et modalités de prise en charge..... | 68 |
| Tableau 10:synthèse des performances VITEK MS® et BIOTYPER MICROFLEX LT® | 72 |
| Tableau 11: comparaison des performances BIOTYPER MICROFLEX LT® et VITEK MS® | 73 |
| Tableau 12: différence de performances au rang d'espèce..... | 75 |
| Tableau 13: différence de performance d'identification au rang du genre..... | 76 |
| Tableau 14: comparaison des résultats VITEK MS® et BIOTYPER MICROFLEX LT® vis à vis des Pneumocoques..... | 80 |
| Tableau 15: score de différence de performance d'identification pour les pneumocoques..... | 81 |
| Tableau 16: comparaison VITEK MS ET BRUKER vis à vis de souches de collections..... | 82 |
| Tableau 17: score de différence de performance d'identification d'une collection de souches ATCC. | 82 |

Liste des abréviations :

ANC (BIOMERIEUX): gélose sang avec Acide Nalidixique et Colistine

BCP : Pourpre de BromoCrésol

CAP (OXOÏD): gélose au sang avec Colistineine et Aztréonam

CQE : contrôle de qualité externe

CQI : contrôle de qualité interne

CPS: « chromogenic plate substrate » gélose chromogène

dNTP: desoxyribonucléotide

ddNTP: didesoxyribonucléotide

SG : Gélose Sang

PM : poids moléculaire

PVX : gélose au sang cuit, chocolat PolyViteX

SNC : Staphylocoque coagulase négative

SNH : Streptocoque non hémolytique

AUTEUR : Nom : NOCON

Prénom : Cécile

Date de Soutenance : 10 avril 2013

Titre de la Thèse : Evaluation des performances du spectromètre de masse MALDI TOF

Microflex LT Bruker comparées à celles du spectromètre Vitek MS Biomérieux et démarche d'accréditation.

Thèse - Médecine - Lille 2013

Cadre de classement : *DES de biologie médicale, bactériologie*

Mots-clés : spectromètre de masse MALDI TOF, performance, accréditation, identification

Résumé : La spectrométrie de masse MALDI TOF révolutionne la microbiologie et devrait prochainement remplacer la plupart des systèmes d'identification traditionnels.

L'objet de cette étude a été dans le cadre de la démarche d'accréditation, d'évaluer la mise en production du spectromètre de masse BRUKER au CH de Valenciennes. Puis d'évaluer la robustesse de la méthode en fonction de différents milieux de cultures et en fonction de l'âge des colonies bactériennes. Enfin, de réaliser une comparaison de performances entre les spectromètres de masse BIOTYPER MICROFLEX LT (BRUKER) et VITEK MS (BIOMERIEUX).

Les résultats de la comparaison des identifications obtenues par le spectromètre de masse, avec les identifications obtenues par les méthodes traditionnellement utilisées au laboratoire, ont révélé une bonne corrélation au rang de genre (97,80%) et au rang de l'espèce (92,51%) sur un panel de 227 souches. Les résultats obtenus dans le cadre de la vérification de la robustesse montrent que les conditions de validation d'un résultat selon les critères du fournisseur sont remplies. La comparaison de performances entre les spectromètres BIOTYPER MICROFLEX LT et VITEK MS, n'a pas mis en évidence de différences significatives au rang de genre ($p=0,1796$) et au rang de l'espèce ($p=0,7277$), dans le cadre d'une utilisation de routine.

L'analyse des discordances a révélé une exhaustivité beaucoup plus importante de la base de données BRUKER par rapport aux bases de données des techniques usuelles. Certaines limites déjà connues de la technique MALDI TOF nécessitent la mise en place de « conduites à tenir » intégrées dans les procédures du laboratoire. La formation et l'habilitation du personnel technique à maîtriser cette nouvelle technologie sont capitales dans la démarche de maîtrise des risques. Les perspectives de développement de cette technique sont nombreuses et les études réalisées semblent encourageantes. L'identification directement à partir du bouillon de culture des hémocultures, la détection directement sur des colonies bactériennes de la présence de facteurs de virulence ou encore le profil de résistance à certains antibiotiques.

De nouvelles études seront cependant nécessaires afin de s'assurer de la pertinence d'analyse et d'assurer la qualité de l'application de ces techniques.

Composition du Jury :

Président : Monsieur le Professeur R.Courcol

**Asseseurs : Monsieur le Professeur L.Dubreuil
Madame le Professeur A.Decoster
Madame le Docteur A.Vachée**

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur C.Cattoen