

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1  
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES  
FACULTE DE PHARMACIE DE LYON  
8, avenue Rockefeller – 69373 LYON Cedex 08

Année 2018

Thèse n° 47 - 2018

**MÉMOIRE**  
**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**  
**DE BIOLOGIE MÉDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional le 20 décembre 2018, à Lyon

Par M. Thibaut DURAND

Né le 27/03/1990, à Lyon (Rhône)

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

**THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN**  
**PHARMACIE**

---

Evaluation des performances de la base de données V3 du  
spectromètre de masse MALDI-ToF Vitek MS<sup>®</sup> pour  
l'identification des bactéries du genre *Nocardia*

---

**JURY**

**PRESIDENT** : M. LAURENT Frédéric – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

**DIRECTEUR** : Mme RODRIGUEZ-NAVA Verónica – Professeur des Universités

**MEMBRES** : Mme ADER Florence – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier

M. DAUWALDER Olivier – Praticien Hospitalier

# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

• Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
• Présidence du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
• Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
• Vice-Président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLEE
• Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER

## Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

### SANTE

• UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Gilles RODE
• UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Mme Carole BURILLON
• Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
• UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
• Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
• Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : Anne-Marie SCHOTT

### SCIENCES ET TECHNOLOGIES

• Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
• UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
• Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
• I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
• Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
• ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

**UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**  
**ISPB -Faculté de Pharmacie Lyon**

**LISTE DES DEPARTEMENTS PEDAGOGIQUES**

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET  
PHARMACIE GALENIQUE**

• **CHIMIE ANALYTIQUE, GENERALE, PHYSIQUE ET MINERALE**

Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)  
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)  
Madame Anne DENUZIERE (MCU)  
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)  
Madame Christelle MACHON (MCU-PH)

• **PHARMACIE GALENIQUE -COSMETOLOGIE**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)  
Madame Françoise FALSON (Pr)  
Monsieur Hatem FESSI (Pr)  
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)  
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)  
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)  
Madame Giovanna LOLLO (MCU)  
Monsieur Damien SALMON (AHU)

• **BIOPHYSIQUE**

Madame Laurence HEINRICH (MCU)  
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)  
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)  
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)  
Madame Elise LEVIGOUREUX (AHU)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTE PUBLIQUE**

• **DROIT DE LA SANTE**

Monsieur François LOCHER (PU – PH)  
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

• **ECONOMIE DE LA SANTE**

Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)  
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)  
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

• **INFORMATION ET DOCUMENTATION**

Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

• **HYGIENE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**

Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

• **INGENIERIE APPLIQUEE A LA SANTE ET DISPOSITIFS MEDICAUX**

Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

**• QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**

Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBault (MCU)

Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)

Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)

Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

**• MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**

Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)

Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU) Madame Marie-Paule GUSTIN (MCU - HDR)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE SCIENCES DU MEDICAMENT**

**• CHIMIE ORGANIQUE**

Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)

Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)

Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)

Madame Christelle MARMINON (MCU)

Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)

Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)

**• CHIMIETHERAPEUTIQUE**

Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)

Monsieur Thierry LOMBERGET (Pr)

Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)

Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)

**• BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**

Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)

Madame Anne-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)

Madame Isabelle KERZAON (MCU)

Monsieur Serge MICHALET (MCU)

**• PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINETIQUE ET EVALUATION DU MEDICAMENT**

Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)

Madame Catherine RIOUFOL (PU- PH)

Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)

Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)

Madame Céline PRUNET-SPANO (MCU)

Madame Florence RANCHON (MCU-PH)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE**

**• TOXICOLOGIE**

Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)

Madame Léa PAYEN (PU-PH)

Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)

Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)

**• PHYSIOLOGIE**

Monsieur Christian BARRES (Pr)

Madame Kiao Ling LIU (MCU)

Monsieur Ming LO (MCU - HDR)

• **PHARMACOLOGIE**

Monsieur Michel TOD (PU – PH)  
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)  
Monsieur Roger BESANCON (MCU)  
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)  
Madame Evelyne CHANUT (MCU)  
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)  
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)

• **COMMUNICATION**

Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

• **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**

Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)  
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)  
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

**DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES A**

• **IMMUNOLOGIE**

Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)  
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)  
Madame Morgane GOSSEZ (AHU)  
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)

• **HEMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**

Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)  
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)  
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)

• **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUEE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**

Monsieur Patrick BOIRON (Pr)  
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)  
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)  
Madame Florence MORFIN (PU – PH)  
Monsieur Didier BLAHA (MCU)  
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)  
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)  
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)  
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)

• **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MEDICALE**

Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)  
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

## **DEPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMEDICALES B**

### **• BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLECULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**

Madame Pascale COHEN (Pr)  
Madame Caroline MOYRET-LALLE (Pr)  
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)  
Madame Emilie BLOND (MCU-PH)  
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)  
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)  
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)  
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)  
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)  
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)

### **• BIOLOGIE CELLULAIRE**

Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)  
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)

### **• INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**

Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)  
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)  
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)  
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)  
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)  
Madame Alexandra MONTEBAULT (MCU)  
Madame Angélique MULARONI (MCU)  
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

### **• Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**

Monsieur Alexandre JANIN

### **• Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**

Monsieur Karim MILADI (85ème section)  
Monsieur Antoine ZILLER (87ème section)

**Pr** : Professeur

**PU-PH** : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

**MCU** : Maître de Conférences des Universités

**MCU-PH** : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

**HDR** : Habilitation à Diriger des Recherches

**AHU** : Assistant Hospitalier Universitaire

**PAST** : Personnel Associé Temps Partiel

## REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord adresser un immense merci à Verónica Rodriguez-Nava, cela fait maintenant plus de 6 ans que l'on se connaît, et tout ce que tu m'as permis de faire n'a pas de prix : un incroyable stage de 2 mois au Mexique, deux congrès à Paris, un congrès à Madrid, et une thèse bien sûr ! Autant de bons moments qui resteront gravés dans ma mémoire. Ton écoute, ta gentillesse et ta générosité n'ont pas d'égal, j'espère que notre amitié durera dans le temps. Encore merci !

A Emmanuelle Bergeron,  
Sans ton aide technique, cette thèse n'existerait tout simplement pas !

A Florian Vautrin,  
Ton aide m'a également été très précieuse, merci de t'être impliqué sans hésitation et sans rien attendre en retour !

A Frédéric Laurent,  
Notre rencontre a permis le démarrage de ce projet, merci de m'avoir aidé et d'avoir pris du temps pour répondre à mes questions existentielles tout au long de mon internat.

A Olivier Dauwalder,  
Qui a pris de son temps sans aucune hésitation pour m'aider à dompter le Vitek MS lors de nos tout premiers essais, par la suite ton écoute et ton aide durant mon internat m'ont été précieuses.

A Florence Ader,  
Merci d'avoir accepté sans aucune hésitation de faire partie de mon jury de thèse.

A Emmanuel Chanard,  
Qui nous a permis gentiment d'utiliser son MALDI-ToF lors de notre première étude, merci également à son équipe de m'avoir aidé à utiliser cet appareil.

A l'équipe de bioMérieux pour son aide durant ce projet.

Aux personnes ayant contribué à ma formation d'interne, biologistes, techniciens et co-internes.

A ma famille bien aimée,

A mes parents, merci de m'avoir encouragé et soutenu (aussi bien moralement que matériellement) tout au long de ces études, merci Maman de m'avoir donné l'idée de faire la fac de pharma ! Je vous dois tellement, merci pour tout !

A mon frère,  
Notre complicité et notre affection est sans pareil, merci pour toutes ces belles années que nous avons partagées lorsque nous étions encore à la maison et ces bons moments que nous continuons de passer ensemble en famille. Merci aussi pour ton aide en maths au début de la pharma !

A Céline,

Vous formez un beau couple avec Yann et je suis heureux de t'avoir comme belle-sœur même si avec Fanny, vous n'avez pas d'humeur. Merci pour les neveux et nièces aussi !

A Sylvie,

Merci pour toute l'affection que tu nous portes, ta gentillesse et ta force me touche toujours autant.

A Mamie et Papy,

Même si je n'ai pas eu la chance de partager l'achèvement de mes études avec vous, j'imagine à quel point vous êtes fiers de moi car vous continuez de vivre dans mon cœur et dans mes pensées.

A Laetitia

Ma chère cousine, tes premières expériences culinaires resteront dans ma mémoire, mais cela valait le coup car tes gâteaux sont maintenant fameux !

A la famille Négrier,

Merci pour ces bons moments passés ensemble.

A ma belle-famille,

A Jean-Lou,

Merci de m'avoir accordé la main de votre fille aussi bien au sens figuré qu'au sens propre.

A Françoise,

Merci pour votre gentillesse, j'espère que mon niveau en Espagnol l'égalera un jour !

A Marie-Do,

Merci pour tous les bons moments passés en famille autour d'un bon plat plein de beurre !

A Olivier,

Merci de nous faire partager ta passion pour le vin, je suis heureux que tu sois aux côtés de Marie-Do.

A Pierre-Lou, Claire, Laurent, Cyrille, Mathilde, Clément, Blanche, Charlotte et Gégé,

Merci pour les repas de famille, ils ne manquent pas d'animation !

A Pierre,

Merci pour votre sens de l'humour et votre accueil à Annecy, j'espère avoir la même santé que vous lorsque j'aurai votre âge !

A mes amis,

A Maxence,

Mon plus fidèle et ancien ami, nous avons partagé tellement de bons moments, notre amitié a beaucoup de valeur à mes yeux, j'espère qu'elle perdurera pour toujours même si la distance nous sépare.

A Adrien,

Avec Maxence, tu formes les derniers vestiges des amis de l'Arbre, les bons moments que nous avons partagés et que nous continuons de partager n'ont pas de valeur, reste comme tu es, c'est comme ça qu'on t'aime !

A Julien,

Mon plus cher ami de la fac, mon binôme d'enfer, que de bons souvenirs également, je suis heureux que notre belle amitié se poursuive malgré la distance, et n'oublie pas, la poussière du sol n'entre pas dans la composition d'un comprimé de paracétamol !

A Jérémie,

Mon plus cher ami du lycée, illustre chanteur de notre premier groupe de musique, Caravane Cactus, merci pour toutes ces soirées passées à gratouiller nos guitares, à faire des enregistrements débiles, je suis heureux que notre amitié perdure !

A Célia et JC,

Nos petites escapades, nos soirées et nos matchs endiablés de badminton sont autant de très bons moments passés en votre compagnie, à tous les quatre, on forme déjà un vieux couple qui j'espère durera à vie !

A Ophélie et Rémy,

Les premiers parents de notre groupe, merci d'avoir donné de mauvaises idées à certain et surtout certaine ...

A Elodie,

Pas la peine d'insister, je ne veux pas de tes toasts au saumon avec de la crème et puis parle de toi d'abord !

A Thomas et Céline,

Merci pour nos après-midis jeux et nos week-ends ski ou campagne, vivement le prochain !

Aux Gizz Disciples,

A Corentin, tu es un batteur d'exception et même si tu es en voie de devenir un grand hémostasien, je veux bien te garder comme ami quand même !

A Dorian, tu es un guitariste talentueux, ta bonne humeur et ton attitude « no stress » m'émerveillent toujours autant, reste comme ça !

A Bastien, tu es une bête de scène et un chanteur incroyable, ton enthousiasme et ton énergie débordante m'ont toujours impressionné !

Aux alcooliques anonymes,

A Astrid,

Ma plus fidèle co-interne, ces semestres partagés en ta compagnie resteront gravés dans ma mémoire, on s'était bien trouvé pour raconter des saloperies sur les gens et se plaindre ! Heureusement que tu étais là à St-Jo d'ailleurs ! J'espère que notre amitié persistera, dans la viande et l'alcool !

A Alexia,

C'est sous une montagne de tampons à Lyon Sud que nous avons fait connaissance, je préfère tout de même nos soirées jeux et picole, j'espère qu'elles seront encore nombreuses !

A Marine,

Je pensais m'être définitivement débarrassé de toi et tes escarpins après la fac, mais c'est sans compter sur ton parasitisme ! Cela dit, fréquenter des moisissures comme toi n'est pas si terrible, surtout lorsqu'il s'agit d'aller picoler aux salons des vins !

A mes co-internes,

A Pauline Perrin,

Ton premier semestre en compagnie d'un guitariste ne t'a finalement pas dégouté de la biochimie, j'espère que tu as trouvé ta voix.

A Pauline Jaeger,

Compagnon de galère en hématologie, heureusement que toi et ta bonne humeur étiez là, je ne sais pas si j'aurais pu survivre à ce semestre sans cela !

A la team Caca de parasito,

Pauline Lévigne, notre mamie préférée, merci d'avoir partagé ton savoir avec nous !

Laurent, ta motivation pour expliquer la qualité à Persouille la Fripouille montrait que tu avais déjà trouvé ta voie à l'époque !

Pauline Jaeger, merci aussi d'avoir partagé mon découragement devant la lecture des cacas !

A notre équipe des Tigautizés,

Dr Legandre, Mélo la dite clinicien, Yann, Thomas et le Dr Labrunie, j'ai vraiment passé un bon semestre en votre compagnie !

A l'ensemble de mes co-internes pigeons de l'IAI, ce fut un plaisir de vous avoir sous mes ordres même si certains d'entre vous étaient bien trop récalcitrants à mon goût !

A notre fine équipe d'hémato CBPE,

Astrid, Corentin, Steph, Emeline et Xavier, ce dernier semestre en votre compagnie a marqué la fin de mon internat, je suis content d'avoir pu le faire en votre compagnie, on a vraiment passé de bons moments !

A ceux que j'ai oubliés.

A Fanny,

L'Amour de ma vie, ma future femme, cela va bientôt faire neuf ans que je partage ta vie avec joie, merci de m'avoir supporté sans répit durant ces longues années d'études, et surtout pendant ces quatre années d'internat. Notre complicité, nos enfantillages, nos beaux projets sont tant de cadeaux que tu me fais au quotidien. Je ne mesure pas assez souvent la chance que j'ai de t'avoir chaque jour à mes côtés mais j'ai maintenant pleinement compris la signification d'avoir « trouver son âme-sœur ». A nos nombreux futurs projets !

Je t'aime.

## TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES .....	15
LISTE DES TABLEAUX .....	16
LISTES DES ABREVIATIONS .....	16
LISTE DES ANNEXES .....	17
PARTIE 1 : GENERALITE SUR LE GENRE <i>NOCARDIA</i> .....	18
1. Une brève histoire du genre <i>Nocardia</i> .....	18
2. Taxonomie du genre <i>Nocardia</i> .....	21
3. Caractéristiques écologiques .....	26
4. Caractéristiques bactériologiques .....	26
5. Nocardioses humaines .....	27
5.1. Aspect épidémiologique.....	27
5.2. Portes d'entrée.....	31
5.3. Facteurs prédisposants.....	31
5.4. Formes cliniques .....	32
5.4.1. Nocardiose pulmonaire .....	32
5.4.2. Nocardiose cérébrale.....	34
5.4.3. Nocardiose disséminée .....	35
5.4.4. Nocardiose cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée .....	36
6. Diagnostic.....	37
6.1. Prélèvements .....	37
6.2. Examen direct.....	38
6.3. Caractères cultureux.....	39
6.4. Identification .....	41
6.4.1. Identification phénotypique .....	41
6.4.1.1. Identification à l'aide de tests biochimiques.....	41

6.4.1.2.	Identification chimiotaxonomique .....	42
6.4.1.3.	Identification par spectrométrie de masse Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight (MALDI-ToF MS) .....	42
6.4.2.	Identification par biologie moléculaire .....	42
6.4.2.1.	Identification par PCR .....	43
6.4.2.2.	Identification par séquençage de l'ADN.....	43
6.4.2.2.1.	Identification par séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S	44
6.4.2.2.2.	Identification par analyse de séquences multiples (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA) .....	44
6.4.3.	Diagnostic immunologique.....	45
7.	Traitement.....	45
7.1.	Etude de la sensibilité aux antibiotiques .....	46
7.2.	Profils de résistance.....	47
7.3.	Traitement antibactérien.....	48
7.4.	Traitement chirurgical .....	50
PARTIE 2 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-ToF .....		51
1.	Généralités sur la spectrométrie de masse MALDI-ToF .....	51
1.1.	Source d'ionisation MALDI .....	51
1.2.	Analyseur de masse ToF .....	52
1.3.	Détecteur d'ions .....	53
2.	Intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-ToF en bactériologie .....	54
2.1.	Aspect pratique de la spectrométrie de masse MALDI-ToF en bactériologie	54
2.1.1.	Dépôt de l'échantillon.....	54
2.1.2.	Ajout de la matrice.....	54
2.1.3.	Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF .....	55

2.2. Premiers développements et applications de la spectrométrie de masse MALDI-ToF en microbiologie.....	56
2.3. La spectrométrie de masse MALDI-ToF de nos jours : Avantages, inconvénients et avenir.....	57
2.4. Spectromètres de masse MALDI-ToF disponibles sur le marché.....	58
3. Intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-ToF pour l'identification des espèces du genre <i>Nocardia</i> .....	60
3.1. Introduction .....	60
3.2. Revue de la littérature .....	62
3.3. Synthèse de la revue de la littérature.....	83
<b>PARTIE 3 : EVALUTATION DES PERFORMANCES DE LA BASE DE DONNEE V3 DU SPECTROMETRE DE MASSE MALDI-TOF VITEK MS POUR L'IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE <i>NOCARDIA</i> .....</b>	
<b>86</b>	
1. Objectifs .....	86
2. Matériel et méthode .....	86
2.1. Souches.....	86
2.2. Prétraitement des isolats.....	87
2.3. Dépôt des échantillons .....	88
2.4. Calibration de l'appareil.....	88
2.5. Analyse des échantillons .....	88
2.6. Critères d'identification.....	88
3. Résultats .....	89
3.1. Performances pour l'identification des souches de l'année 2014 .....	89
3.2. Performances sur une collection de souches de 18 espèces différentes.....	91
4. Discussion.....	94
CONCLUSIONS .....	99
BIBLIOGRAPHIE .....	101

ANNEXES .....	112
---------------	-----

## **LISTE DES FIGURES**

Figure 1 : Farcin du bovin (d'après Hamid <i>et al.</i> 2012).....	18
Figure 2 : Portrait d'Edmond Nocard.....	19
Figure 3 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences concaténées de 2190 pb des gènes <i>gyrB</i> -16S- <i>secA1</i> - <i>hsp65</i> - <i>rpoB</i> de 237 souches (d'après McTaggart <i>et al.</i> 2010) .....	22
Figure 4 : Opacification de la partie supérieure du lobe gauche au cours d'une nocardiose pulmonaire (IRM) (d'après Kurahara <i>et al.</i> 2014) .....	33
Figure 5 : Nodules dans la partie inférieure du lobe droit au cours d'une nocardiose (IRM) (d'après Kurahara <i>et al.</i> 2014).....	33
Figure 6 : Epanchement pleural (grosse flèche) associé à un épanchement péricardique (petite flèche) et à un infiltrat pulmonaire au cours d'une nocardiose pulmonaire (IRM) (d'après Rosman <i>et al.</i> 2013).....	34
Figure 7 : Multiples abcès cérébraux observés au cours d'une nocardiose cérébrale (IRM) (d'après Yang <i>et al.</i> 2014).....	35
Figure 8 : Mycétome du pied d'après (Verma <i>et al.</i> 2018) .....	37
Figure 9 : Coloration de Gram effectuée sur une hémoculture montrant une bactériémie à <i>N. veterana</i> au cours d'une nocardiose disséminée (photo réalisée par Corentin Achard à l'Institut des Agents Infectieux, Lyon, 2017).....	39
Figure 10 : Différents aspects d'isolats de <i>Nocardia</i> en culture .....	40
Figure 11 : Profils RFLP de différentes souches de référence de <i>Nocardia</i> (d'après Conville <i>et al.</i> 2000).....	43
Figure 12 : Spectre de masse de la souche d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 9637 (d'après Wang <i>et al.</i> 1998).....	51
Figure 13 : Principe de la source d'ionisation MALDI en microbiologie .....	52
Figure 14 : Schéma résumant le principe de la spectrométrie de masse MALDI-ToF (d'après Marvin <i>et al.</i> 2003).....	53

Figure 15 : Plaque 48 cibles fournie avec le Vitek MS (bioMérieux).....	54
Figure 16 : Spectres de masse de différentes espèces de <i>Nocardia</i> (d'après Hsueh <i>et al.</i> 2014).....	56
Figure 17 : Spectromètre de masse Microflex LT (Bruker Daltonics).....	59
Figure 18 : Spectromètre de masse Vitek MS (bioMérieux).....	59
Figure 19 : Schéma résumé des différents protocoles d'extraction utilisés .....	64

## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Profil de résistance des espèces de l'ancien complexe <i>N. asteroides</i> (d'après Brown-Elliott <i>et al.</i> 2006).....	21
Tableau 2 : Actualisation des profils de résistance selon McTaggart <i>et al.</i> (2015).....	25
Tableau 3 : Espèces de <i>Nocardia</i> actuellement considérées comme pathogènes pour l'homme (d'après Conville <i>et al.</i> 2018).....	30
Tableau 4 : Taux d'identification en fonction du nombre de dépôt (collection 2014) ...	90
Tableau 5 : Taux d'identification en fonction du nombre de dépôt (collection 2014 à 2016) .....	92
Tableau 6 : Erreurs d'identification .....	93

## **LISTES DES ABREVIATIONS**

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

BCP : gélose au bromocrésol pourpre

BCYE : gélose Buffered Charcoal Yeast Extract

CHCA : acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique

COS : gélose Colombia au sang de mouton

MALDI-ToF MS : Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight mass spectrometry

MLSA : Multi Locus Sequence Analysis

OFN : Observatoire Français des Nocardioses

PCR : Polymerase Chain Reaction

RFLP : Restriction Fragments Length Polymorphism

SNC : Système nerveux central

## **LISTE DES ANNEXES**

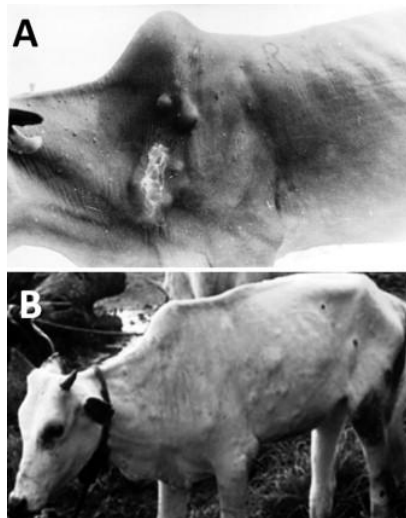
Annexe 1 : Tableau récapitulatif de la littérature évaluant le MALDI-ToF pour l'identification des espèces du genre <i>Nocardia</i> .....	112
Annexe 2 : Poster concernant l'étude sur la base de données V3 du Vitek MS présenté au congrès de l'ECCMID 2018 à Madrid .....	115
Annexe 3 : Premier travail traitant de la comparaison des performances des systems de spectrométrie Bruker et bioMérieux pour l'identification des <i>Nocardia</i> .....	116
Annexe 4 : Collaboration sur le sujet des infections à <i>N. brasiliensis</i> ayant conduit à une publication. ....	134

## PARTIE 1 : GENERALITE SUR LE GENRE *NOCARDIA*

### 1. Une brève histoire du genre *Nocardia*

C'est en 1888 qu'Edmond Nocard, un vétérinaire français, isola pour la première fois la bactérie qui sera par la suite placée dans le genre *Nocardia*. Il travaillait alors sur le farcin, une maladie infectieuse cutanée du bovin provoquée par ce microorganisme (1).

Figure 1 : Farcin du bovin (d'après Hamid *et al.* 2012)



Un an plus tard, Trevisan caractérisera la souche et nommera cette espèce *Nocardia farcinica* en l'honneur du vétérinaire et de ses travaux. Il définit ainsi le genre *Nocardia* et y plaça également cinq autres espèces (2). La souche alors identifiée en tant que *N. farcinica* fut ainsi déposée au sein de deux collections différentes (ATCC 3318 et NCTC 4524). En 1896, Eppinger isola d'un abcès cérébral humain un organisme filamenteux qu'il baptisera *Cladothrix asteroides* (2). Cette souche sera par la suite renommée *Nocardia asteroides*. De nouvelles espèces telles que *N. brasiliensis*, *N. otitiscaviarum*, *N. transvalensis* seront ensuite incluses dans le genre *Nocardia* ainsi que bien d'autres souches de bactéries filamenteuses. Grâce à l'avènement de la chimiotaxonomie, un certain nombre de ces souches furent par la suite écartées du genre *Nocardia* et reclassées au sein d'autres genres (3). Il s'agissait entre autres de souches appartenant maintenant aux genres *Gordonia*, *Rhodococcus* ou encore *Skermania*.

**Figure 2 : Portrait d'Edmond Nocard**



C'est en 1954 que *N. farcinica* fut désignée comme espèce type du genre *Nocardia* et la souche ATCC 3318 comme la souche type de l'espèce *N. farcinica*. En 1962, Gordon et Mihm, au cours de leurs études taxonomiques menées sur le genre *Nocardia*, ne parvinrent pas à identifier de différences phénotypiques entre la souche type *N. farcinica* ATCC 3318 et *N. asteroides*, qui était devenu l'espèce la plus couramment isolée à cette époque. Ils en conclurent que les isolats identifiés en tant que *N. farcinica* et *N. asteroides* correspondaient très probablement à une seule et même espèce. Par la suite, d'autres études sur les deux souches de collection de *N. farcinica* confirmèrent l'incertitude taxonomique concernant cette espèce. En effet, ces travaux mirent en évidence que la souche NCTC 4524 était en fait plus proche du genre *Mycobacterium* que du genre *Nocardia* tandis que la souche ATCC 3318 demeurait plus proche du genre *Nocardia*. Ainsi, seul le nom d'espèce *N. asteroides* fut conservé et elle devint alors la nouvelle espèce type du genre. C'est donc la souche *N. asteroides* ATCC 19247 qui devint par la suite la nouvelle souche type du genre *Nocardia*. En 1969, Tsukamura identifia au sein d'une collection d'isolats alors identifiés en tant que *N. asteroides* un sous-groupe d'isolats qui partageait des caractéristiques biochimiques et immunologiques identiques à la souche *N. farcinica* ATCC 3318 mais différait de la souche *N. asteroides* ATCC 19247. Pour cette raison, le nom d'espèce *N. farcinica* sera de nouveau employé et les études ultérieures confirmeront que *N. farcinica* et *N. asteroides* étaient bien deux espèces distinctes. Ainsi, *N. asteroides* fut longtemps considérée comme étant la principale espèce responsable d'infections humaines. En 1988, Wallace *et al.* identifièrent six profils de résistance aux antibiotiques différents (tableau 1) au sein d'une collection de 78 isolats

précédemment identifiés en tant que *N. asteroides* (4). Ainsi, le terme de « complexe *N. asteroides* » fut employé pour définir ces isolats identiques sur le plan biochimique mais divergents d'un point de vue de leur phénotype de résistance. C'est en définitive grâce au développement des techniques de séquençage (séquençage des gènes codant l'ARNr 16S et la protéine hsp65 initialement) qu'il sera conclu que ces différents profils de résistance correspondaient en fait à différentes espèces, bien identifiées à l'heure actuelle. Ainsi, *N. asteroides* est aujourd'hui considérée comme une espèce bien distincte des autres et est en réalité exceptionnellement pathogène pour l'homme. Ce bref historique met en évidence la complexité de la taxonomie du genre *Nocardia*. Bien que les techniques moléculaires aient permis de mieux appréhender la phylogénie du genre *Nocardia*, elle demeure complexe et encore incomplète, d'autant plus que de nouvelles espèces sont très régulièrement découvertes (5–7).

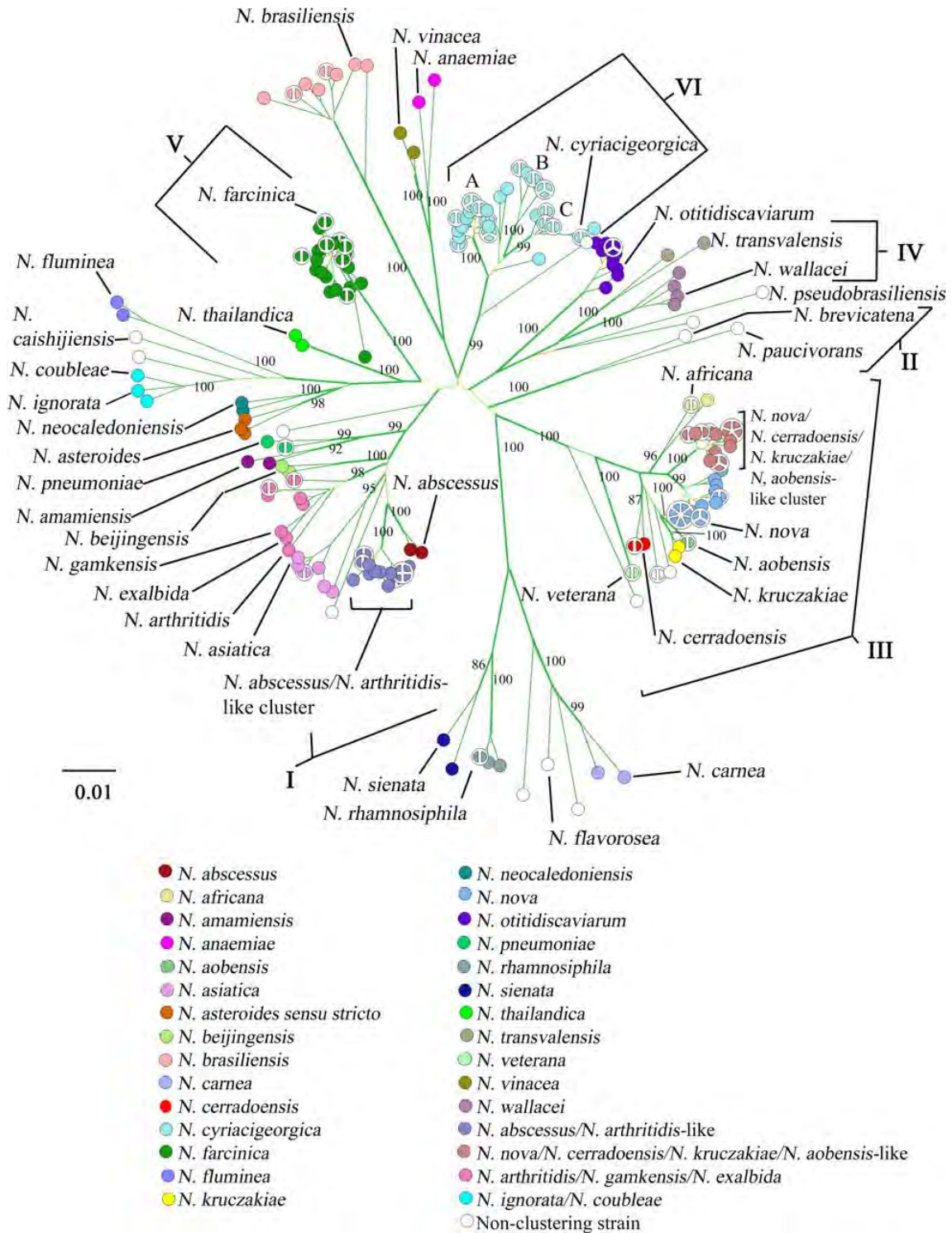
**Tableau 1 : Profil de résistance des espèces de l'ancien complexe *N. asteroides* (d'après Brown-Elliott *et al.* 2006)**

Espèces	Type de profil de résistance	Principales caractéristiques du profil de résistance
<i>N. abscessus</i>	I	Sensibilité à l'ampicilline, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ceftriaxone, le linézolidie et l'amikacine; des CMI élevées catégorisant la majorité des souches résistantes pour l'imipénème sont observées; résistance à la ciprofloxacine et à la clarithromycine
Complexe <i>N. brevicatena/paucivorans</i>	II	Identique au type I mais sensibilité à la ciprofloxacine, CMI basses pour la kanamicine; résistance à la clarithromycine, généralement résistance à la gentamicine
<i>N. nova</i>	III	Sensibilité à l'ampicilline mais résistance à l'amoxicilline-acide clavulanique, sensibilité à l'erythromycine, la clarithromycine, la ceftriaxone et le linézolidie, ; CMI très basses pour l'amikacine et l'imipénème
Complexe <i>N. transvalensis</i>	IV	Résistance à la totalité des aminosides, sensibilité à la ciprofloxacine, la ceftriaxone, le linézolide, l'imipénème; résistance à l'erythromycine et la clarithromycine.
<i>N. farcinica</i>	V	Résistance à l'ampicilline, aux céphalosporines et à la clarithromycine; résistance aux aminosides sauf à l'amikacine; sensibilité à la ciprofloxacine, au linézolide et à l'imipénème
<i>N. cyriacigeorgica</i>	VI	Résistance à l'ampicilline, amoxicilline-acide clavulanique, clarithromycine et ciprofloxacine; sensible à la ceftriaxone, amikacine, linezolidie et imipénème

## 2. Taxonomie du genre *Nocardia*

Les espèces du genre *Nocardia* appartiennent à la famille des *Nocardiaceae*, au sein des *Corynebacteriales*, un ordre faisant partie de la classe des *Actinobacteria*. Plus d'une centaines d'espèces sont actuellement décrites (3,8).

Figure 3 : Arbre phylogénétique construit à partir des séquences concaténées de 2190 pb des gènes *gyrB*-16S-*secA1*-*hsp65*-*rpoB* de 237 souches (d'après McTaggart *et al.* 2010)



C'est à l'aide de caractéristiques phénotypiques et physiologiques telles que la morphologie des colonies et les caractères biochimiques que les différentes espèces du genre *Nocardia* étaient initialement identifiées. Cependant, ces caractéristiques sont en réalité trop peu discriminatives pour identifier l'ensemble des espèces de *Nocardia* qui

sont globalement peu réactives biochimiquement. En effet, ce problème fut assez rapidement pointé par Wallace *et al.* avec sa description chez *N. asteroides* de six différents profils de résistance aux antibiotiques évoqués dans le chapitre précédent. Il émit donc l'hypothèse que ces différents profils de résistance pouvaient en fait correspondre à différentes espèces ou groupes d'espèces. En effet, il avait été précédemment montré que le phénotype de résistance était un critère d'identification fiable au sein des Actinobactéries (9). Par la suite, ces hypothèses se vérifièrent et le complexe *N. asteroides* fut éclaté en différentes espèces ou complexes d'espèces grâce à l'analyse des séquences des gènes *hsp65* et ARN16S ribosomal des six différents profils de résistance. Dernièrement, McTaggart *et al.* ont actualisé ces différents profils de résistance, ajoutant aux 6 précédents profils, les profils de type Ia, VII, VIII et IX (10) et modifiant quelques peu certains anciens profils (voir tableau 2). Ainsi le complexe *N. asteroides* est actuellement représenté par les espèces du complexe *N. abscessus* (profil de résistance type I), les espèces du complexe *N. arthritidis/N. gamkensis/N. exalbida* et *N. asiatica* (profil de résistance type Ia), le complexe *N. brevicatena/N. paucivorans* (profil de résistance type II), le complexe *N. nova* (profil de résistance type III), le complexe *N. transvalensis* (profil de résistance type IV), *N. farcinica* (profil de résistance type V), *N. cyriacigeorgica* (profil de résistance type VI). Les autres profils correspondent aux espèces *N. otitidiscaviarum* (profil de résistance type VII), *N. brasiliensis* (profil de résistance type VIII) et *N. asteroides sensu stricto*, *N. pneumoniae*, *N. amamiensis*, *N. beijingensis*, *N. thailandica*, *N. vinacea* et *N. anaemiae* (profil de résistance type IX). Ainsi le terme de complexe *N. asteroides* n'a plus lieu d'être employé puisque chaque espèce est maintenant bien identifiable grâce aux méthodes de séquençage multigénique. Malgré cela, de nombreuses incertitudes taxonomiques demeurent actuellement. Une étude réalisée en 2018 a permis de résoudre quelques-unes de ces incertitudes et ainsi confirmer à l'aide des séquences concaténées des gènes *atpD-groL1-groL2-recA-rpoA-secY-sodA-ychF* que *N. soli* et *N. cummidelens* étaient des synonymes taxonomiques « hétérotypiques » plus récents de *N. salmonicida*, que *N. elegans* était un synonyme taxonomique « hétérotypique » plus récent de *N. nova*, que *N. gamkensis* était un synonyme taxonomique « hétérotypique » plus récent de *N. exalbida* et enfin que *N. coubleae* était un synonyme taxonomique « hétérotypique » plus récent de *N. ignorata* (8). Cependant, quelques incertitudes persistent encore. Elles concernent essentiellement les isolats des complexes *N. abscessus/N. arthritidis-like* et *N. nova/N. cerradoensis/N.*

*kruczakiae*/*N. aobensis-like* qui n'ont pu être rattachés à aucune souche type et qui semblent correspondre à une fusion d'allèles de 2 ou 3 souches types (11) (voir figure 3). D'autres isolats n'avaient également pas pu être assignés à une souche type, pouvant ainsi constituer de nouvelles espèces. L'analyse de séquences supplémentaires permettra peut-être d'assigner ces isolats à une souche type connue ou bien de confirmer leur appartenance à une nouvelle espèce. Un autre point à éclaircir est la découverte chez *N. cyriacigeorgica* de la répartition des souches en 3 sous-groupes distincts nommés A, B et C (11,12) (voir figure 3).

**Tableau 2 : Actualisation des profils de résistance selon McTaggart *et al.* (2015)**

Espèces	Type de profil de résistance <sup>a</sup>	Non sensible (résistant ou intermédiaire)	sensible
complexe <i>N. abscessus</i> <sup>b</sup>	I <sup>a</sup>	imipénème, ciprofloxacine, moxifloxacine et clarithromycine	amoxicilline-acide clavulanique, ceftriaxone, céfépime, tobramycine, amikacine, linézolide et sulfaméthoxazole-triméthoprim (SXT)
complexe <i>N. arthritidis/N. gamkensis/N. exalbida</i> <sup>d</sup> et <i>N. asiatica</i>	Ia <sup>c</sup>	identique au type I mais non sensible à l'amoxicilline-acide	identique au type I mais non sensible à l'amoxicilline-acide
Complexe <i>N. brevicatena/paucivorans</i>	II <sup>a</sup>	Aucune souche testée par McTaggart et al.	Aucune souche testée par McTaggart et al.
Complexe <i>N. nova</i> <sup>e</sup>	III <sup>a</sup>	amoxicilline-acide clavulanique, tobramycine, doxycycline, ciprofloxacine et moxifloxacine	ceftriaxone, céfépime, imipénème, amikacine, clarithromycine, linézolide et SXT
Complexe <i>N. transvalensis</i> <sup>f</sup>	IV <sup>a</sup>	imipénème, tobramycine, amikacine, doxycycline et clarithromycine	ceftriaxone, ciprofloxacine, moxifloxacine, linézolide et SXT
<i>N. farcinica</i>	V <sup>a</sup>	ceftriaxone, céfépime, tobramycine, doxycycline et clarithromycine	amoxicilline-acide clavulanique, amikacine, moxifloxacine, linézolide et SXT; sensibilité variable à l'imipénème et à la ciprofloxacine
<i>N. cyriacigeorgica</i>	VI <sup>a</sup>	amoxicilline-acide clavulanique, ciprofloxacine, moxifloxacine et clarithromycine	ceftriaxone, imipénème, tobramycine, amikacine, doxycycline, linezolid et SXT
<i>N. otitidiscaviarum</i>	VII <sup>g</sup>	amoxicilline-acide clavulanique, ceftriaxone, céfépime, imipénème, doxycycline, ciprofloxacine, moxifloxacine et clarithromycine	amikacine, linezolid et SXT
<i>N. brasiliensis</i>	VIII <sup>g</sup>	céfépime, imipénème, doxycycline, ciprofloxacine et clarithromycine	amoxicilline-acide clavulanique, tobramycine, amikacine, linezolid et SXT
<i>N. asteroides sensu stricto</i> , <i>N. pneumoniae</i> , <i>N. amamiensis</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. thailandica</i> , <i>N. vinacea</i> et <i>N. anaemiae</i>	IX <sup>c</sup>	amoxicilline-acide clavulanique et ciprofloxacine	ceftriaxone, céfépime, imipénème, tobramycine, amikacine, doxycycline, clarithromycine, linézolide et SXT

<sup>a</sup> décrit par Wallace et al. et Brown-Elliott et al.

<sup>b</sup> complexe *N. abscessus* : comprend des souches de *N. abscessus* et du complexe *N. abscessus/N. arthritidis*-like, à qui il manque une souche type mais qui comprend des souches similaires à *N. abscessus* et *N. arthritidis*

<sup>c</sup> nouveau type de profil de résistance décrit par McTaggart et al.

<sup>d</sup> complexe *N. arthritidis/N. gamkensis/N. exalbida* : comprend des souches similaires aux trois souches type *N. arthritidis* DSM 44731T, *N. gamkensis* DSM 44956T, and *N. exalbida* DSM 44883T

<sup>e</sup> complexe *N. nova* : comprend des souches de *N. nova*, *N. africana*, *N. cerradoensis*, *N. kruczakiae*, *N. veterana* et du complexe *N. nova/cerradoensis/kruczakiae/aobensis*-like à qui il manque une souche type mais qui comprend des souches similaires à *N. nova*, *N. cerradoensis*, *N. kruczakiae* et *N. aobensis*

<sup>f</sup> complexe *N. transvalensis* : comprend des souches de *N. transvalensis* et *N. wallacei*

<sup>g</sup> profil de résistance concordant avec celui décrit par Brown-Elliott et al. et pour lequel un numéro a été assigné par McTaggart et al.

### 3. Caractéristiques écologiques

Les *Nocardia* sont des bactéries ubiquitaires dans l'environnement, retrouvées au niveau du sol, sur les végétaux, dans les matières en décomposition, dans l'air ou encore dans les eaux douces ou salées. Elles s'y comportent en tant que saprophyte en dégradant diverses matières organiques. Ces organismes sont cosmopolites puisque présents dans toutes les régions du monde. Cependant, certaines espèces sont plus volontiers associées à certains climats, un exemple bien connu étant celui de *N. brasiliensis*, une espèce possédant un important tropisme cutané, dont la prévalence est beaucoup plus importante dans les régions au climat tropical ou subtropical (13). Les environnements contaminés en hydrocarbures sont également connus pour être des lieux de développement des *Nocardia* (14,15). En effet, ces dernières ont la capacité de dégrader et d'utiliser divers hydrocarbures. Ce sont également des bactéries intéressantes du point de vue de la découverte de nouveaux principes actifs. En effet, elles produisent de nombreux métabolites secondaires possédant divers activités biologiques (antibactérienne, antifongique, immunosuppressive, antitumorale, etc) (16). Un exemple bien connu est celui de la ristocétine, antibiotique synthétisé par *N. lurida*, qui est couramment utilisé dans le diagnostic de la maladie de Willebrand afin d'évaluer la capacité de liaison du facteur Willebrand à la glycoprotéine GPIb plaquettaire (activité cofacteur de la ristocétine du facteur Willebrand) (17).

### 4. Caractéristiques bactériologiques

Le genre *Nocardia* regroupe des organismes filamenteux ramifiés capables de produire du mycélium pouvant se fragmenter en éléments bacillaires et coccoïdes. Leur paroi à la particularité, tout comme les bactéries du genre *Mycobacterium*, d'être riche en acides mycoliques, des acides gras à longue chaîne conférant une hydrophobicité à la paroi cellulaire. La coloration de Gram est positive (contrairement aux mycobactéries) pour ces bactéries qui se présentent à l'examen direct sous forme de fins bacilles ramifiés avec un aspect moucheté ou tigré, probablement du fait de cette composition particulière de la paroi, ou sous forme bacillaires ou coccoïdes après fragmentation du mycélium. A l'instar des mycobactéries, les *Nocardia* ne sont pas acido-alcool-résistantes lorsque la technique de Ziehl-Neelsen classique (coloration à chaud) est utilisée mais en revanche,

elles le sont partiellement lorsque la technique modifiée de Kinyoun (coloration de Ziehl-Neelsen à froid) est employée. En culture, les *Nocardia* sont des organismes peu exigeants mais de croissance assez lente. L'aspect particulier des isolats sur milieu solide (qui sera détaillé dans une autre partie) est une caractéristique utile qui permet de suspecter leur appartenance au genre *Nocardia*.

## 5. Nocardioses humaines

### 5.1. Aspect épidémiologique

A l'heure actuelle, on décompte au moins une cinquantaine d'espèces pathogènes pour l'homme (2) (voir tableau 3). Initialement, l'espèce *N. asteroides* était considérée comme étant la principale espèce pathogène pour l'homme. Son scindement en différentes espèces et complexes d'espèces permet par la suite de constater que ces différentes espèces ne sont pas toutes aussi prévalentes les unes que les autres.

En France, l'étude épidémiologique la plus récente concernant les *Nocardia* a été réalisée de 2010 à 2015 par Lebeaux *et al.* et se base sur les isolats reçus par l'Observatoire Français des Nocardioses (OFN) durant cette période (18). Un total de 793 isolats a pu être inclus. Les espèces les plus fréquemment retrouvées étaient *N. farcinica* (20,2 %), les espèces du complexe *N. abscessus* (19,9 %) et du complexe *N. nova* (19,5 %), *N. cyriacigeorgica* (12,9 %) et moins fréquemment *N. brasiliensis* (6,9 %) et les espèces du complexe *N. transvalensis* (6,4 %). Les incidences calculées par région allaient de 0,03 à 0,46 cas/100 000 habitants. D'après les données récoltées par l'OFN entre 2006 et 2007, l'incidence nationale serait d'approximativement 0,3 cas/100 000 habitants cependant, ce chiffre est très probablement sous-estimé du fait de l'absence de signalement obligatoire ou de centralisation systématique des cas et des souches (19).

Concernant les USA, une étude publiée en 2014, réalisée de 2006 à 2011 avait permis de recueillir un total de 1299 isolats (20). Elle a montré que les espèces les plus fréquemment isolées étaient celles du complexe *N. nova* (43,6 %), *N. cyriacigeorgica* (20,3 %), *N. farcinica* (15,7 %), *N. brasiliensis* (11,4 %) et les espèces du complexe *N. abscessus* (8,5 %). Une étude antérieure rapportait un nombre de 765 cas entre 1995 et 2004 avec comme espèces les plus fréquentes *N. nova* (28 %), *N. brasiliensis* (14 %), *N. farcinica* (14 %) et *N. cyriacigeorgica* (13 %) (21).

Au Canada, une étude publiée en 2011 a permis d'analyser 718 isolats de *Nocardia* sur deux périodes distinctes, de 1988 à 2003 et de 2004 à 2008 (22). Sur la première période, la majorité des 393 souches isolées ont été identifiées en tant que *N. asteroides* (219/393 isolats soit 56 %). Les autres souches ont été identifiées comme complexe *N. nova* (71/393), *N. farcinica* (42/393), *N. brasiliensis/N. pseudobrasiliensis* (28/393), complexe *N. otitidiscaviarum* (17/393), autres espèces (6/393), *N. sp* (4/393), *N. cyriacigeorgica* (3/393), complexe *N. transvalensis* (2/393) et *N. abscessus* (1/393). Sur la seconde période, les 325 souches isolées ont été identifiées en tant que complexe *N. nova* (109/325), *N. cyriacigeorgica* (67/325), *N. farcinica* (44/325), *N. sp* (37/325), autres espèces (26/325), *N. abscessus* (14/325), *N. brasiliensis/N. pseudobrasiliensis* (13/325), *N. asteroides* (4/325), complexe *N. transvalensis* (4/325), complexe *N. otitidiscaviarum* (4/325) et complexe *N. brevicatena/N. paucivorans* (3/325). L'incidence calculée sur cette période pour l'ensemble du pays a ainsi été multipliée par 2,6, passant de 0,33/100 000 habitants en 1997 à 0,87/100 000 habitants en 2008.

En Espagne, une étude publiée en 2016 a permis l'analyse de 1119 isolats recueillis entre 2005 et 2014 (23). Les espèces les plus fréquemment isolées étaient *N. cyriacigeorgica* (25,3 %), *N. nova* (15,0 %), les espèces du complexe *N. abscessus* (12,7 %) et *N. farcinica* (11,4 %). Une étude antérieure publiée en 2009 menée de 1995 à 2006 a permis d'identifier 43 patients atteints de nocardiose (24). Les 2 principales espèces impliquées étaient alors *N. cyriacigeorgica* (32,4 %) et *N. farcinica* (24,3 %). Il avait été établi une incidence de 0,39 cas/100 000 habitants entre 1995 et 1998 et de 0,55 entre 2003 et 2006.

En Italie, une étude rétrospective menée entre 2011 et 2015 rapportent 14 cas de nocardioses (25). Les espèces impliquées étaient *N. abscessus* (5/13), *N. cyriacigeorgica* (4/13) et *N. farcinica* (4/13).

Une étude australienne de 2018 décrit l'isolation de 67 souches différentes sur une période de 7 ans. Neuf espèces différentes ont pu être identifiées, avec une prédominance des espèces *N. nova* (29 %), *N. cyriacigeorgica* (18 %), *N. farcinica* (15 %) et *N. paucivorans* (9 %). Les autres espèces représentaient moins de 5 % des isolats (*N. brasiliensis*, *N. takedensis*, *N. veterana*, *N. beijingensis*, *N. otitidiscaviarum*).

Une étude rétrospective réalisée en Chine en 2017 a permis de recueillir 28 isolats de *Nocardia* entre 2011 et 2017 (26). Les espèces retrouvées correspondaient à *N.*

*cyriacigeorgica* (13), *N. farcinica* (6), *N. beijingensis* (n = 3), *N. abscessus* (2), *N. wallacei* (2), *N. otitidiscaviarum* (1) et *N. nova* (1).

Une étude taïwanaise menée entre 1998 et 2010 a permis d'identifier 100 cas de nocardiose dont 55 % de forme cutanée (13). Les principales espèces impliquées étaient *N. brasiliensis* (50 %) et *N. cyriacigeorgica* (18 %). Cette étude souligne bien le caractère variable de l'épidémiologie en fonction du climat. En effet, les pays en voie de développement au climat tropical et où une importante population rurale existe sont souvent associés à un nombre plus important de forme cutanée et sous-cutanée, constituant un réel problème de santé publique.

Ainsi, les espèces du complexe *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. farcinica* et les espèces du complexe *N. abscessus* sont maintenant considérées comme les espèces les plus prévalentes aux vues des résultats ci-dessus. Il semblerait que la situation géographique joue un rôle important dans la prévalence des différentes espèces comme évoqué précédemment puisque les études taïwanaises ont montré que *N. brasiliensis* était l'espèce la plus prévalente dans ce pays au climat tropical (13,27). En Europe, *N. brasiliensis* est plutôt regroupée parmi les espèces de prévalence moyenne avec les espèces du complexe *N. transvalensis*, *N. otitidiscaviarum* et *N. veterana*. En France, une étude récente décrit 36 cas autochtones d'infection à *N. brasiliensis* entre 2002 et 2012 (28). D'autres espèces plus rares telles que *N. paucivorans*, *N. beijingensis*, *N. pseudobrasiliensis* sont considérées comme des espèces de faible prévalence. Plus exceptionnellement encore, d'autres espèces peuvent être responsables d'infections humaines (voir tableau 3).

**Tableau 3 : Espèces de *Nocardia* actuellement considérées comme pathogènes pour l'homme (d'après Conville et al. 2018)**

espèce	année de description	pathogénicité incertaine (< 4 cas publiés)	infection primaire peau/tissus mou	infection pulmonaire	infection disséminée	source non connue
<i>N. abscessus</i>	2000		+	+	+	
<i>N. africana</i>	2001			+		
<i>N. amamiensis</i>	2007	+	+	+		
<i>N. amikacinotolerans</i>	2013		+	+		
<i>N. anaemiae</i>	2005	+				
<i>N. aobensis</i>	2005					+
<i>N. araoensis</i>	2004	+	+	+		
<i>N. arthritidis</i>	2004	+	+	+		
<i>N. arizonensis</i>	2015	+		+		
<i>N. asiatica</i>	2004			+		
<i>N. asteroides</i>	1891	+				
<i>N. beijingensis</i>	2001		+	+	+	
<i>N. blacklockiae</i>	2008	+		+		
<i>N. boironii</i>	2016		+			
<i>N. brasiliensis</i>	1909		+			
<i>N. brevicatena</i>	1961	+				
<i>N. carnea</i>	1891	+		+	+	
<i>N. cerradoensis</i>	2003	+		+	+	
<i>N. concava</i>	2005			+	+	
<i>N. cyriacigeorgica</i>	2001		+	+	+	
<i>N. donostiensis</i>	2016	+		+		
<i>N. elegans</i>	2005			+	+	
<i>N. exalbida</i>	2006	+	+			
<i>N. farcinica</i>	1889		+	+	+	
<i>N. harenae</i>	2006	+	+			
<i>N. higoensis</i>	2004	+		+	+	
<i>N. ignorata</i>	2001	+	+			
<i>N. inohanensis</i>	2004	+	+			
<i>N. jinanensis</i>	2009	+	+			
<i>N. kroppenstedtii</i>	2014	+		+	+	
<i>N. kruczakiae</i>	2004		+	+		
<i>N. mexicana</i>	2006		+	+	+	
<i>N. mikamii</i>	2010			+	+	
<i>N. neocaledoniensis</i>	2004	+	+			
<i>N. niigatensis</i>	2004		+			
<i>N. ninae</i>	2007	+		+		
<i>N. niwae</i>	2011			+		
<i>N. nova</i>	1983			+	+	
<i>N. otitidiscaviarum</i>	1924		+	+	+	
<i>N. paucivorans</i>	2000				+	
<i>N. pneumoniae</i>	2004	+		+		
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	1995			+	+	
<i>N. puris</i>	2003	+	+		+	
<i>N. shinanonensis</i>	2016	+	+			
<i>N. sienata</i>	2004	+		+		
<i>N. takedensis</i>	2005		+	+		
<i>N. terpenica</i>	2007	+		+		
<i>N. testacea</i>	2004	+		+		
<i>N. thailandica</i>	2005	+	+	+		
<i>N. transvalensis</i>	1927		+	+	+	
<i>N. vermiculata</i>	2005	+				
<i>N. veterana</i>	2001			+		
<i>N. vulneris</i>	2015		+			
<i>N. wallacei</i>	2006				+	
<i>N. yamanashiensis</i>	2004	+	+			

## 5.2. Portes d'entrée

L'inhalation de spores ou de fragments de mycélium en suspension dans l'air et l'inoculation directe suite à un traumatisme cutané sont les principales portes d'entrée identifiées.

## 5.3. Facteurs prédisposants

Les nocardioses prédominent chez le sujet masculin (sex-ratio entre 2 et 3) et concernent principalement l'adulte de 45 à 60 ans. En effet, les facteurs prédisposant à ce type d'infections concernent plus fréquemment cette tranche d'âge.

Les espèces du genre *Nocardia* se comportent le plus souvent comme des pathogènes opportunistes. Ainsi, la grande majorité des nocardioses concerne le patient immunodéprimé dont l'immunité cellulaire est très affaiblie même si un nombre significatif d'infections graves chez l'immunocompétent a également été rapporté (29). Il ne faut pas non plus oublier les cas d'infections cutanées primaires suite à une inoculation traumatique qui surviennent le plus souvent chez des sujets immunocompétents et qui sont probablement très largement sous-estimés. Les principaux facteurs de risque sont d'origine iatrogène et sont représentés par la corticothérapie au long court à forte dose et les autres traitements immunosuppresseurs. Ainsi, les patients transplantés d'organes solides (transplantations de poumon surtout, puis transplantations cardiaques, intestinales, rénales et hépatiques) (30,31), greffés de moelles osseuses ou de cellules souches hématopoïétiques, atteints d'hémopathies malignes, de tumeurs solides ou de maladies auto-immunes sont les principaux concernés (24–26,32–34). D'autres formes d'immunodépression acquise d'origine non médicamenteuse sont également rapportées telles que l'alcoolisme, le diabète, l'infection par le VIH. Sont également concernés, les patients présentant un déficit immunitaire constitutionnel tel que la granulomatose septique chronique. Les pathologies broncho-pulmonaires chroniques (bronchopathie chronique obstructive, dilatation des bronches, emphysème, asthme, mucoviscidose, sarcoïdoses, etc.) sont également des facteurs prédisposant au développement de nocardioses cependant une corticothérapie est souvent retrouvée chez ces patients.

## 5.4. Formes cliniques

Les bactéries du genre *Nocardia* sont à l'origine d'infections variées chez l'humain. Les formes cliniques les plus courantes sont la nocardiose pulmonaire isolée, la nocardiose du système nerveux centrale (SNC) isolée ou non, la nocardiose cutanée/sous cutanée/lymphocutanée et la nocardiose disséminée. Bien entendu, d'autres formes beaucoup plus rares existent telles que les formes oculaires (35), péritonéales, ostéoarticulaires, rénales, etc. Bien que peu fréquente, la présence d'une colonisation sans infection a été observée au cours de différentes études (24,33,36,37). Il s'agit d'une situation au cours de laquelle une souche de *Nocardia* est isolée d'un prélèvement respiratoire en l'absence de signe clinique ou radiologique de nocardiose pulmonaire. Des cas de transmission nosocomiale ont également été rapportés (38,39). Des signes biologiques non spécifiques tels qu'une hyperleucocytose, une leucopénie, une augmentation de la CRP sont observables au cours d'une nocardiose (25,32).

### 5.4.1. Nocardiose pulmonaire

Il s'agit de la présentation clinique la plus fréquemment décrite, la principale porte d'entrée étant l'inhalation du microorganisme. Dans les études les plus récentes, plus de 70 % des nocardioses correspondaient à des formes pulmonaires (25,32–34,37,40–42). Elle est le plus classiquement retrouvée chez des patients immunodéprimés présentant les facteurs de risques cités précédemment (corticothérapie et autres traitements immunosuppresseurs chez les patients transplantés d'organes solides, atteints d'hémopathies, de tumeurs solides ou de maladies auto-immunes). Elle se manifeste généralement sous la forme d'une pneumonie nécrosante subaiguë ou chronique. Les manifestations pulmonaires sont le plus souvent polymorphes et non spécifiques (toux, expectorations, rarement hémoptysies, douleur pleurale, dyspnée), associées à des signes généraux (fièvre, perte de poids, sueurs nocturnes, asthénie, etc.), pouvant ainsi mimer une tuberculose (25,32,33,37,43). De la même manière, les images radiologiques au cours d'une nocardiose pulmonaire sont très polymorphes et peu spécifiques. Ainsi, des atteintes uni- ou bilatérales sont observables, avec des atteintes plus fréquemment alvéolaires qu'interstitielles. Le plus souvent, une opacification pulmonaire (infiltrat) est observée (figure 4), plus ou moins associée à une lésion cavitaire (36). La seconde image

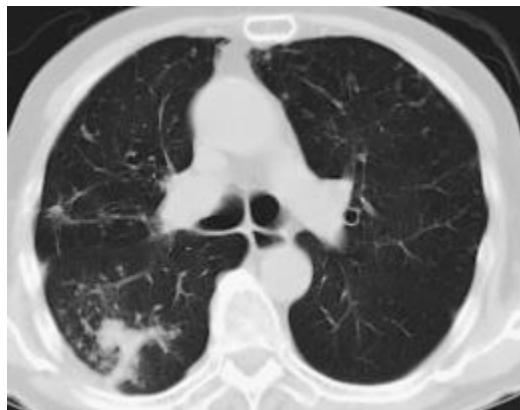
fréquemment observée est la présence d'un ou plusieurs nodules (figure 5) pouvant être excavés (25,30,33) puis la visualisation d'un épanchement pleural (figure 6). De ce fait, les diagnostics différentiels sont nombreux (notamment les infections fongiques et mycobactériennes ou encore les cancers). Un autre facteur de risque fréquemment rapporté dans les études est la présence d'une maladie pulmonaire chronique (26,33,34,40). Tel est le cas de la bronchopathie chronique obstructive, de la bronchectasie (44), de la mucoviscidose (45,46) ou encore de l'asthme.

**Figure 4 : Opacification de la partie supérieure du lobe gauche au cours d'une nocardiose pulmonaire (IRM) (d'après Kurahara *et al.* 2014)**



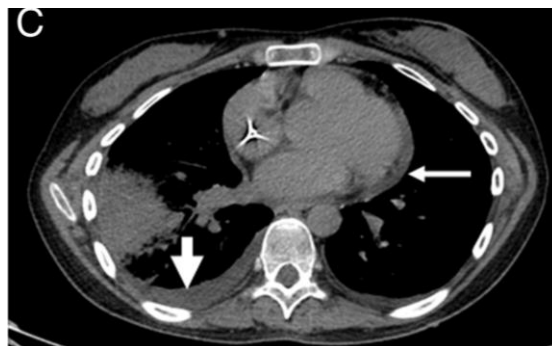
Cependant, une corticothérapie occasionnelle ou prolongée est fréquemment associée à ces pathologies. La problématique de la présence d'une colonisation ou d'une véritable infection se pose régulièrement chez ces patients atteints de pathologies broncho-pulmonaires chroniques et ce type de situation nécessite un bilan clinique et radiologique afin de rechercher des signes de nocardiose pulmonaire, cérébrale, cutanée ou disséminée (44–46).

**Figure 5 : Nodules dans la partie inférieure du lobe droit au cours d'une nocardiose (IRM) (d'après Kurahara *et al.* 2014)**



Fréquemment, une dissémination hémotogène à partir du foyer pulmonaire est observée. On parle alors de nocardiose disséminée. Il est donc indispensable de réaliser un bilan d'extension complet à la recherche de foyers extra-pulmonaires lorsque le diagnostic de nocardiose pulmonaire est posé (32).

Figure 6 : Epanchement pleural (grosse flèche) associé à un épanchement péricardique (petite flèche) et à un infiltrat pulmonaire au cours d'une nocardiose pulmonaire (IRM) (d'après Rosman *et al.* 2013)

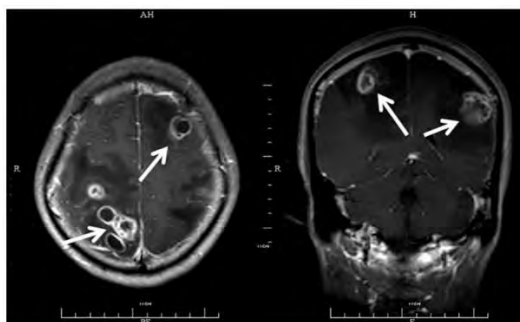


#### 5.4.2. Nocardiose cérébrale

La nocardiose cérébrale est la deuxième forme la plus fréquemment observée. Comme expliqué précédemment, elle est souvent secondaire à une dissémination à partir d'un foyer pulmonaire initial puisque 30 à 50 % des nocardioses cérébrales sont associées à une localisation pulmonaire mais de nombreux cas de forme uniquement cérébrale sont également rapportés (47,48). Elle se manifeste le plus fréquemment chez des sujets immunodéprimés (facteurs prédisposants précédemment cités) mais des cas chez l'immunocompétent sont également rapportés (49–51). En effet, une revue de 84 cas de nocardioses cérébrales montre que 18 % des patients atteints ne présentaient aucun facteur de risque identifiable (47). Ces formes cérébrales peuvent se manifester le plus souvent par des signes de focalisation variables en fonction de la région atteinte (déficits sensitifs et/ou moteurs), une confusion, des troubles du langage, des céphalées, des nausées et des vomissements, une fièvre, des troubles mentaux, des convulsions, une ataxie, des signes méningés, des troubles sensoriels, des troubles du comportement (25,32,37,47). Plus rarement, une méningite peut être associée à la présence d'abcès cérébraux faisant suite à la rupture d'un de ces derniers mais elle peut également se présenter de manière isolée (48). Des cas de myélites ont également été rapportés. Parfois, ces atteintes cérébrales demeurent asymptomatiques et sont révélées au décours du bilan d'extension d'une

nocardiose pulmonaire. Les images radiologiques (scanner et IRM) sont le plus souvent non spécifiques. Les plus communément observées sont la présence d'un ou plusieurs abcès cérébraux (figure 7), le plus souvent en cocarde, parfois avec un aspect multiloculé.

**Figure 7 : Multiples abcès cérébraux observés au cours d'une nocardiose cérébrale (IRM) (d'après Yang *et al.* 2014)**



La mortalité demeure importante, la publication la plus récente sur ce sujet (2016) montrait une mortalité à 1 an de 35 % sur une série de 20 patients et la revue de la littérature également effectuée dans cette revue faisant état d'une mortalité globale de 23,8 % (10/42) (48). Cependant, selon Anagnostou *et al.* (47), elle varie beaucoup selon la prise en charge initiée : 7 % avec une antibiothérapie ciblée et un traitement chirurgical, 22 % avec une antibiothérapie ciblée uniquement et 36 % avec un traitement chirurgical seul. En l'absence de tout traitement, la mortalité est proche de 100 %. Ainsi, une prise en charge rapide et adaptée est nécessaire lorsqu'une forme cérébrale est diagnostiquée.

#### **5.4.3. Nocardiose disséminée**

La nocardiose disséminée correspond à l'atteinte d'au moins 2 organes et/ou une bactériémie. Elle représente 15 à 30 % des nocardioses (25,33,37,52) dans les séries les plus récentes et atteint même 50 % pour Haussaire *et al.*(32). Dans la grande majorité des cas, il s'agit d'une dissémination à partir d'un foyer pulmonaire initial (32). Le SNC est la localisation secondaire la plus fréquente (1/3 des cas), suivi par la peau et les tissus mous (25,32,33), cependant, tous les organes peuvent être concernés (œil, foie, ganglions lymphatiques, pancréas, os et articulations, etc.). Une dissémination par contiguïté est également possible avec atteinte de la plèvre, du cœur, du médiastin ou encore de la veine cave. Cette dissémination est plus fréquemment observée chez les sujets immunodéprimés et est de mauvais pronostic (53).

#### 5.4.4. Nocardiose cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée

Différentes formes de nocardiose cutanée, sous-cutanée et lymphocutanée sont décrites. Hormis les nocardioses cutanées secondaires à une dissémination hématogène à partir d'un foyer pulmonaire, les autres formes sont dans la très grande majorité des cas observées chez l'immunocompétent. Elles sont le plus fréquemment suite à une inoculation directe du microorganisme au cours d'un traumatisme cutané. C'est le plus souvent par l'intermédiaire d'un environnement contaminé (54) tel qu'une épine, un morceau de bois ou une piqûre d'arthropodes que la contamination a alors lieu. La prévalence de ces formes cutanées est très différente en fonction des régions du monde. En effet, les régions tropicales et subtropicales semblent les plus concernées, une publication parue en 2011 montrant que les formes cutanées représentaient plus de 50 % des nocardioses recensées à Taiwan au cours de cette étude réalisée entre 1998 et 2010 (13). En France, les nocardioses cutanées semblent beaucoup plus rares, bien que quelques cas soient décrits. Cependant, l'incidence de ces formes est probablement nettement sous-estimée. En effet, des pathogènes beaucoup plus courants tels que *Staphylococcus aureus* ou certaines espèces de streptocoques provoquent des lésions similaires pour lesquelles une documentation bactériologique n'est pas systématiquement réalisée, un traitement empirique étant alors utilisé. Ainsi seules les formes compliquées ou résistantes au traitement bénéficient d'une documentation, révélant parfois de manière fortuite une nocardiose. Les infections cutanées les plus bénignes et les plus superficielles se présentent sous la forme d'abcès unique ou multiples (55) ou de cellulite. La dissémination à partir de ses lésions superficielles est très exceptionnellement décrite. L'espèce en cause dans la très grande majorité des cas est *N. brasiliensis* (13) bien que les autres espèces puissent également être impliquées (56,57) notamment des espèces proches de *N. brasiliensis* comme *N. boironii*, *N. altamirensis*, *N. iowensis*, *N. tenerifensis* ou *N. vulneris* (5,58). Quelques fois, l'infection peut s'étendre aux ganglions lymphatiques, on parle alors de nocardiose lymphocutanée ou forme sporotrichoïde (59). Plus rarement une atteinte des muscles, des articulations ou des os peut compliquer ces formes cutanées et sous-cutanées en l'absence de traitement.

Le mycétome est une forme sous-cutanée chronique particulière (figure 8), plus communément observée dans les régions tropicales et subtropicales (60). Liée le plus

souvent à un mode de vie rural (marche pieds nus, port de fagot de bois sur l'épaule), elle est ainsi localisée aux membres inférieurs (pieds) et parfois aux membres supérieurs, au dos, aux épaules ou à la tête). Cette forme est donc exceptionnellement décrite dans les pays développés (5).

Figure 8 : Mycétome du pied d'après (Verma *et al.* 2018)



De progression lente et peu douloureuse, ce type d'infection peut être causé par divers champignons et actinobactéries dont les *Nocardia* (61). L'infection débute sous forme d'un nodule sous-cutané indolore qui augmente progressivement de taille. Une fistulisation des lésions peut ensuite se produire, avec écoulement d'un liquide purulent et hématisé pouvant contenir des grains de taille, de forme et de couleur caractéristiques. Une inflammation granulomateuse chronique avec tuméfaction des régions environnantes se produit par la suite avec formation de nodules secondaires et de nouvelles fistules. Une extension aux muscles et aux os finit par se produire en l'absence de prise en charge.

Concernant les nocardioses cutanées des formes disséminées, elles se présentent le plus souvent sous forme d'abcès sous-cutané unique ou multiples pouvant fistuliser ou sous forme de cellulite (25).

## 6. Diagnostic

### 6.1. Prélèvements

Les prélèvements pour recherche de *Nocardia* peuvent être de nature très diverse du fait des multiples localisations possibles au cours des nocardioses. Les prélèvements pouvant être relativement pauvres en bactéries, ils doivent donc être multiples et répétés si besoin.

En cas de nocardiose pulmonaire, des prélèvements respiratoires tels que les expectorations, les aspirations bronchiques, les liquides de lavage broncho-alvéolaires, les liquides de ponction d'épanchement pleuraux, voire des biopsies pulmonaires peuvent être analysés.

Concernant les atteintes cérébrales, les prélèvements de pus d'abcès recueillis lors d'une ponction stéréotaxique ou en per-opératoire pourront être analysés. Des ponctions de liquide céphalo-rachidien peuvent également être contributives puisque les atteintes méningées sont possibles (47,48).

Au cours des formes cutanées, des biopsies et des prélèvements de pus peuvent être réalisés.

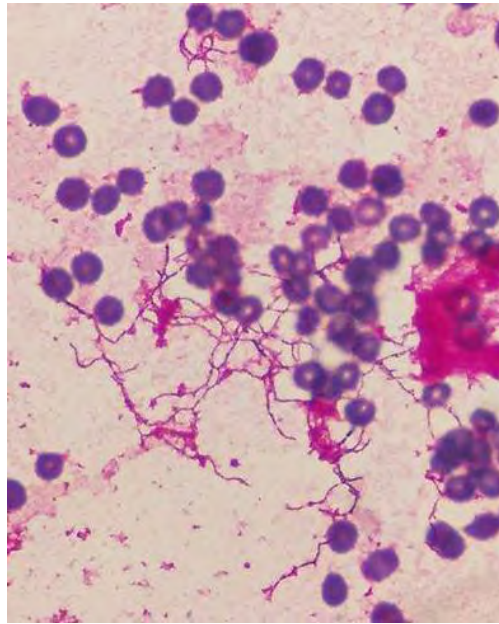
Au cours des formes disséminées, des hémocultures peuvent révéler la présence d'une bactériémie.

Au cours des autres formes plus rarement rencontrées, divers prélèvements peuvent être adressés au laboratoire : tissu ostéoarticulaire, ganglion lymphatique, épanchements divers, cornée, tissus divers, divers prélèvements de pus, etc.

## **6.2. Examen direct**

La réalisation d'un examen direct du prélèvement est la première étape à effectuer. Elle est primordiale car elle peut rapidement permettre une orientation diagnostique et en l'absence de demande spécifique de recherche de *Nocardia* de la part du clinicien, permettre d'augmenter les chances d'isolement de ces bactéries qui requièrent des conditions de culture spécifiques. La coloration de Gram est la technique la plus sensible pour détecter les *Nocardia*. Elle révèle de fins bacilles ramifiés, à coloration positive (violet), d'aspect tigré (figure 9). Parfois des formes bacillaires ou coccoïdes peuvent être observées, en particulier si un examen direct sur les cultures est réalisé. La coloration de Ziehl-Neelsen classique, fréquemment utilisée pour la recherche des mycobactéries, ne permet pas de révéler les *Nocardia*, en revanche, la technique du Ziehl-Neelsen modifiée de Kinyoun révèle leur caractère d'acido-alcool-résistance partielle. Cependant, elle n'est pas suffisamment fiable pour être utilisée seule et constitue seulement un argument supplémentaire.

Figure 9 : Coloration de Gram effectuée sur une hémoculture montrant une bactériémie à *N. veterana* au cours d'une nocardiose disséminée (photo réalisée par Corentin Achard à l'Institut des Agents Infectieux, Lyon, 2017)

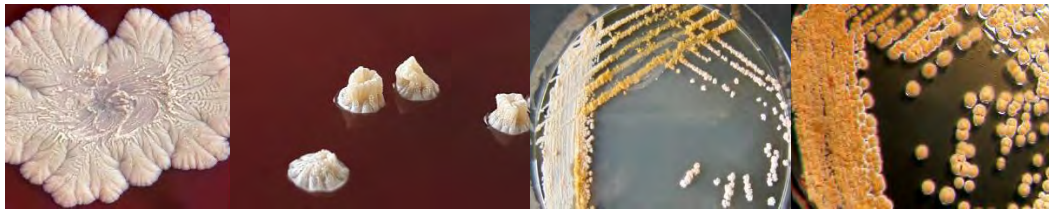


La coloration de Gomori fréquemment utilisée en mycologie permet également de mettre en évidence les *Nocardia* (coloration verte). L'examen direct fait partie intégrante du diagnostic microbiologique, il ne faut cependant pas oublier qu'un examen direct négatif ne permet en aucun cas d'exclure une nocardiose du fait d'un possible faible inoculum bactérien du prélèvement (61).

### 6.3. Caractères cultureux

En culture, les *Nocardia* sont des bactéries peu exigeantes, pouvant pousser sur tous types de milieux. Elles sont en revanche de croissance assez lente et plusieurs jours voire plusieurs semaines sont souvent nécessaires avant d'obtenir une pousse significative bien que la majorité d'entre elles croisse de manière satisfaisante en 48 à 72 heures. Ainsi, les milieux les plus couramment employés tels que les géloses au sang et géloses au sang cuit enrichies constituent de bons milieux de culture mais ne sont pas forcément les mieux adaptées à l'isolement des *Nocardia*.

Figure 10 : Différents aspects d'isolats de *Nocardia* en culture



En effet, les prélèvements biologiques d'origine respiratoire ou cutanée sont très souvent contaminés par la flore commensale majoritairement constituée de bactéries à développement rapide qui risque d'inhiber la croissance des *Nocardia*. Pour cette raison, les milieux destinés à la culture des mycobactéries (milieux Loewenstein-Jensen, Bennett) ou des champignons (milieu Sabouraud) conviennent bien, ainsi que d'autres milieux pauvres tel que le milieu au bromocrésol pourpre (BCP) ou encore le milieu Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) qui a l'avantage supplémentaire d'être sélectif (élimination de la flore respiratoire contaminante). Une décontamination des prélèvements biologiques est possible, en revanche, les protocoles de décontamination utilisés sur les échantillons destinés à la recherche des mycobactéries sont trop agressifs pour les *Nocardia* et sont donc à éviter (bien que certains isolats y résistent). Les cultures sont incubées entre 32 et 37 C° en aérobiose ou en présence de 5 à 10 % de CO<sub>2</sub> pendant une à deux semaines. En culture sur milieux solides, la morphologie des colonies est très variable d'une espèce à une autre et même entre souches d'une même espèce, tout ceci en fonction de l'âge des colonies et du milieu de culture utilisé. L'aspect le plus communément décrit est celui de colonies surélevées, « cérébriformes », d'apparence crayeuse ou poudreuse due à la présence d'un court mycélium aérien, le plus souvent blanchâtre (figure 10). Certaines colonies sont pigmentées, arborant des couleurs allant du beige, jaune, orangé, rouge-rosé, en passant par tous les intermédiaires possibles. De consistance le plus souvent ferme mais friable, certaines souches seront volontiers incrustées dans la gélose, sous forme de petites colonies très dures. Cet aspect particulier des colonies constitue d'ailleurs une difficulté supplémentaire sur le plan technique, en particulier lors de la réalisation d'un inoculum adapté pour l'antibiogramme ou lors du dépôt sur une cible destinée à l'identification par spectrométrie de masse MALDI-ToF. C'est en revanche cet aspect bien particulier, en association avec la coloration de Gram (éventuellement avec la coloration de Ziehl-Neelsen modifiée) qui fait suspecter la présence d'une *Nocardia* en culture. Bien que le fait de sentir l'odeur des cultures bactériennes ne soit plus recommandé de nos jours, l'odeur caractéristique de terre ou de

cave qui se dégage des milieux de culture constitue un critère d'orientation supplémentaire.

Du fait de ces caractéristiques bactériologiques particulières, la recherche de bactéries du genre *Nocardia* doit être demandée spécifiquement par le clinicien afin que le microbiologiste puisse par la suite assurer une prise en charge adaptée des prélèvements biologiques et des cultures.

## **6.4. Identification**

Depuis la première description du genre *Nocardia* en 1888, les méthodes d'identification de ce genre bactérien ont beaucoup évolué. Nous allons voir que jusqu'à présent, très peu de laboratoires de bactériologie étaient en mesure d'identifier de manière fiable les différentes espèces du genre *Nocardia*. Ainsi, les souches devaient systématiquement être adressées à un laboratoire de référence qui était le seul en mesure de rendre une identification définitive.

### **6.4.1. Identification phénotypique**

#### **6.4.1.1. Identification à l'aide de tests biochimiques**

Initialement, les bactéries du genre *Nocardia* étaient identifiées à l'aide de différents tests biochimiques, notamment l'hydrolyse des acides aminées (adénine, caséine, tyrosine, xanthine, hypoxanthine), l'utilisation de sucres (glucose, maltose, saccharose), la production d'enzymes (arylsulfatase, catalase, acétamidase, galactosidase, uréase, nitrate réductase) (3,62). Cependant, les *Nocardia* étant des bactéries relativement inertes sur le plan biochimique, la lourdeur de ces techniques et la description d'un nombre croissant de nouvelles espèces ont fait que ces tests sont rapidement devenus insuffisants pour obtenir une identification fiable et précise au niveau de l'espèce.

#### **6.4.1.2. Identification chimiotaxonomique**

L'analyse de différents composants après lyse des bactéries, notamment des acides gras, des acides mycoliques ou des ménaquinones n'est plus guère utilisée de nos jours pour l'identification des *Nocardia*. Ces techniques laborieuses et coûteuses permettaient une identification au niveau du genre mais une identification précise au niveau de l'espèce était difficile à obtenir.

#### **6.4.1.3. Identification par spectrométrie de masse Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time-of-Flight (MALDI-ToF MS)**

La spectrométrie de masse MALDI-ToF est une des techniques les plus récemment développées afin de permettre l'identification des *Nocardia*. Jusqu'à présent, encore peu d'études ont évalué ses performances mais les plus récentes ont montré qu'il s'agissait d'un outil très performant et fiable lorsque les bases de données de spectres de référence étaient les plus exhaustives possibles. Le principe de la technique, son développement et l'évaluation de ses performances à travers une revue de la bibliographie seront détaillés dans une prochaine partie.

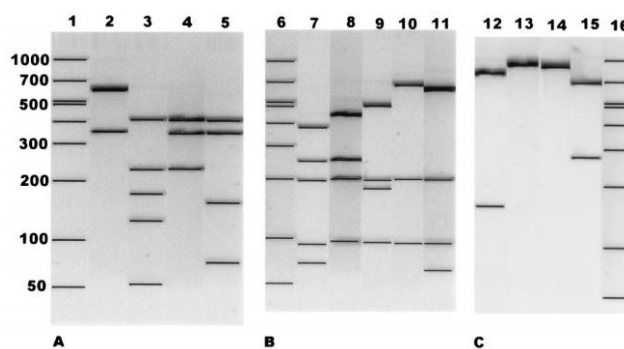
#### **6.4.2. Identification par biologie moléculaire**

De par leur rapidité et leur précision, l'avènement récent des techniques de biologie moléculaire a clairement modifié la bactériologie moderne. En ce qui concerne les *Nocardia*, elles ont eu un impact majeur sur la taxonomie du genre, permettant le reclassement et la description d'un nombre croissant d'espèces. Actuellement, l'amplification de certains gènes d'intérêt par Polymerase Chain Reaction (PCR) suivie de leur séquençage constituent la technique de référence pour l'identification des différentes espèces du genre *Nocardia*.

### 6.4.2.1. Identification par PCR

L'amplification génique par PCR, seule ou en combinaison avec d'autres techniques moléculaires a été un des premiers outils moléculaires utilisé pour la caractérisation des isolats appartenant au genre *Nocardia* ou pour leur identification au niveau de l'espèce. Initialement, une amplification génique suivie d'une digestion enzymatique (PCR – Restriction Fragments Length Polymorphism, PCR-RFLP) réalisée sur la protéine de choc thermique (Heat Shock Protein) de 65 kDa (Hsp 65) avait été utilisée pour l'identification des mycobactéries. Cette méthode a par la suite été adaptée au genre *Nocardia* étant donné sa proximité phylogénétique avec le genre *Mycobacterium* et permit alors l'identification d'un certain nombre d'espèces pathogènes. Cette technique fut par la suite adaptée à une partie du gène codant l'ARNr 16S afin d'optimiser la vitesse et l'exactitude de l'identification (63). Cependant, aux vues d'une taxonomie de plus en plus complexe et d'un faible pouvoir discriminant, ces techniques de PCR-RFLP ont été progressivement abandonnées. En 1999, Laurent *et al.* décrivent pour la première fois une technique de PCR utilisant des amorces spécifiques permettant une identification du genre *Nocardia* (64).

Figure 11 : Profils RFLP de différentes souches de référence de *Nocardia* (d'après Conville *et al.* 2000)



### 6.4.2.2. Identification par séquençage de l'ADN

Grâce aux progrès techniques effectués dans le domaine de la biologie moléculaire, le séquençage de l'ADN dans le but d'identifier un microorganisme est de nos jours devenu assez courant et accessible. En ce qui concerne le genre *Nocardia*, le séquençage de l'ADN a véritablement révolutionné sa taxonomie et est devenu un outil précieux pour l'identification de ses différentes espèces car rapide et fiable. De nombreux gènes tels que les gènes codant l'ARNr 16S, la sous-unité bêta de l'ADN topoisomérase de type II ou gyrase B (*gyrB*) (65), la sous-unité A de la pré-protéine de la translocase SecA (*secA1*)

(66), la sous-unité bêta de l'ARN polymérase (*rpoB*) (67), la protéine hsp65 (*hsp65*) (68) ou encore de la superoxyde dismutase A (*sodA*) (69) ont été étudiés afin de discriminer correctement les différentes espèces de *Nocardia*.

#### **6.4.2.2.1. Identification par séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S**

Le gène codant l'ARNr 16S est un élément très souvent utilisé pour l'identification des microorganismes car les bases de données publiques sont désormais assez complètes. Son séquençage partiel (500 paires de bases) ou total (1500 paires de bases) est ainsi la méthode moléculaire de référence pour l'identification de nombreuses bactéries, en particulier pour les bactéries difficiles voire impossibles à cultiver. Concernant le genre *Nocardia*, ce gène contient aussi bien des régions très conservées, identiques pour toutes les espèces, que des régions variables et donc spécifiques de chaque espèce. Les 500 premières paires de bases de ce gène constituent ainsi une de ces régions variables et son séquençage constitue donc une méthode fiable et rapide pour la plupart des espèces du genre (70). Elle est actuellement considérée comme la technique de référence et est la plus fréquemment utilisée. Cependant, son utilisation comme seul gène d'identification est actuellement remise en question du fait d'un polymorphisme inter-espèce insuffisant pour certaines espèces appartenant à des complexes d'espèces tels que les complexes *N. nova* et *N. abscessus* (71), nécessitant le séquençage total du gène de l'ARNr 16S. Cependant, même cette technique a prouvé ses limites pour des espèces telles que *N. brevicatena/N. paucivorans* et *N. kruczakiae/N. veterana* qui montrent 99,5 % (1352 paires de bases) et 99,8 % (1379 paires de bases) de similarité (2). Afin de résoudre ce problème, il est actuellement recommandé d'effectuer une analyse multigénique pour permettre une identification précise des différentes espèces de ces complexes (11).

#### **6.4.2.2.2. Identification par analyse de séquences multiples (Multi Locus Sequence Analysis, MLSA)**

Depuis quelques années, les techniques de MLSA utilisant les séquences concaténées de plusieurs gènes commencent à se développer (72), complexifiant encore d'avantage la taxonomie du genre *Nocardia* (8,11). Ainsi, pour les *Nocardia*, l'utilisation des séquences

concaténées de 4 à 5 gènes de ménage tels que les gènes de l'ARNr 16S, *gyrB*, *secA*, *hsp65*, et/ou *rpoB* est de plus en plus employée car cette technique est précise et très discriminative (11). Elle permet ainsi une identification fiable des différentes espèces et constitue donc la technique de référence ultime lorsqu'une identification par la MALDI-ToF MS ou par séquençage d'un unique gène ne sont pas concluantes (12,73). Elle a également permis de mettre en évidence une grande diversité des souches au sein de l'espèce *N. cyriacigeorgica* dont les souches semblent pouvoir se subdiviser en 3 groupes distincts (12). Cependant, les incertitudes taxonomiques qui concernent certains complexes d'espèces comme le complexe *N. abscessus/N. arthritidis* et le complexe *N. nova/N. cerradoensis/N. kruczakiae/N. aobensis* n'ont pas pu être résolues lors des dernières études (11). Il s'agit de plus d'une technique encore peu accessible bien que des schémas simplifiés visant à employer seulement 3 à 4 gènes se soient développés (11).

#### 6.4.3. Diagnostic immunologique

Actuellement, aucune sérologie ne permet un diagnostic spécifique et fiable de nocardiose sauf dans le cas du mycétome. En effet, une équipe mexicaine a développé un test ELISA permettant de suivre la cinétique du taux d'anticorps dirigés contre des antigènes de *N. brasiliensis* chez les patients atteints de mycétome (74,75).

## 7. Traitement

De par le degré de gravité et de chronicité que peuvent présenter les nocardioses, un traitement efficace se doit d'être initié rapidement. Comme vu précédemment, la mortalité est directement liée à l'efficacité de la prise en charge qui s'axe principalement sur une antibiothérapie ciblée plus ou moins associée à un traitement chirurgical en fonction de la localisation de l'infection. Pour cela, les méthodes d'étude de la sensibilité des isolats à différents antibiotiques se doivent d'être fiables mais leur mise en œuvre n'est pas simple en ce qui concerne le genre *Nocardia* et nécessite une grande expérience en la matière.

## 7.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques

Plusieurs problèmes concernent l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries du genre *Nocardia*. En premier lieu, l'isolement de la souche en culture n'est pas systématiquement réalisé ou possible, un nombre non négligeable de diagnostic de nocardiose étant effectué par biologie moléculaire directement sur l'échantillon biologique. Si la souche est isolée en culture, la réalisation de son antibiogramme peut poser quelques problèmes techniques. En effet, la consistance et le caractère incrusté des colonies rend la préparation d'un inoculum bactérien homogène difficile, ce qui diminue la reproductibilité de la technique. Comme vu précédemment, la croissance des différentes souches étant lente et variable, une standardisation du délai avant lecture est difficile. Actuellement, le CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) recommande la technique par micro-dilution en milieu liquide de Mueller-Hinton. Cette technique présente l'avantage de rendre de véritables valeurs de CMI cependant elle présente aussi quelques inconvénients (nécessite plus de temps technique que les méthodes par diffusion, contamination difficilement détectable, interprétation parfois difficile, mauvaise reproductibilité pour certains antibiotiques sur certaines espèces) qui rendent son implémentation dans les laboratoires de routine délicate (76). D'autres méthodes d'évaluation de la sensibilité sont possibles et ont également été évaluées. Les techniques de diffusion en milieu gélosé (méthode des disques et méthode E-test) restent les plus employées car plus faciles à mettre en œuvre techniquement (18). Ainsi, la diversité des techniques testées a montré que les résultats obtenus sont très variables d'une technique à une autre, rendant l'interprétation de la littérature difficile (77). La catégorisation clinique des souches testées en S, I ou R est rendue en comparant la valeur de concentration minimale inhibitrice (CMI) obtenue aux valeurs critiques publiées par les organismes de standardisation tels que le CLSI ou l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Au niveau national, la SFM (Société Française de Microbiologie) n'a pas encore publié de recommandation concernant les *Nocardia*. En ce qui concerne les antibiotiques à tester, le CLSI recommande d'évaluer la sensibilité des souches à l'amikacine, l'amoxicilline-acide clavulanique, la ceftriaxone, la ciprofloxacine, la clarithromycine, l'imipénème, le linézolide, la minocycline, la moxifloxacine, le sulfaméthoxazole-triméthoprimine et la tobramycine en première intention puis au céfépime, au céfotaxime et à la doxycycline en deuxième intention.

## 7.2. Profils de résistance

Depuis la première description en 1988 par Wallace *et al.* de six différents profils de résistance aux antibiotiques, de nombreuses études ont été réalisées, complexifiant cette description initiale. Ainsi, une très grande disparité des profils de résistance entre les différentes espèces de *Nocardia* existe, compliquant la mise en place d'un traitement probabiliste efficace. Dans l'ensemble, les *Nocardia* sont des bactéries assez résistantes aux antibiotiques avec quelques espèces pouvant être multirésistantes (résistantes à au moins 2 des molécules communément utilisées : amikacine, ceftriaxone, imipénème et sulfaméthoxazole-triméthoprim) telles que *N. pseudobrasiliensis*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis* et les espèces du complexe *N. transvalensis*. D'après les études les plus récentes (10,18,23,26), le linézolide et l'amikacine sont les deux antibiotiques les plus fréquemment identifiés comme étant actifs sur les *Nocardia* puisque 0 % et moins de 3 % des isolats étaient résistants au linézolide et à l'amikacine respectivement. Concernant l'amikacine, seules les espèces du complexe *N. transvalensis* (*N. transvalensis*, *N. wallacei*) présentent des taux de résistance nettement plus élevés que les autres puisque jusqu'à 48 % d'isolats résistants a été observé (23). Le tédzolide, dérivé du linézolide, semble être encore plus actif que le linézolide (78). La tobramycine est moins active que l'amikacine puisque 20 à 47 % des *Nocardia* y sont résistants avec une résistance naturelle pour les espèces des complexes *N. transvalensis* et *N. nova* ainsi que pour *N. farcinica*. Le sulfaméthoxazole-triméthoprim est également une molécule active sur la majorité des *Nocardia* bien que des taux de résistance de 16 % (23) voire 58 % (79) aient été rapportés. Cependant, la majorité des études rapportent des taux très bas de résistance (< 6 %) et ces différences sont probablement explicables par la difficulté technique que représente l'étude de la sensibilité de cette molécule (10). L'imipénème est aussi globalement actif sur une grande partie des isolats bien que certaines études rapportent des taux de résistance proches de 20 % (18,26), voire de 51 % (20). Cependant, ces taux de résistance globaux sont à interpréter en fonction du nombre d'isolats d'espèces réputées être globalement résistantes à l'imipénème. La très grande majorité des souches de *N. brasiliensis*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* et du complexe *N. abscessus* ne sont ainsi pas sensibles à l'imipénème (10,18,20,23). La ceftriaxone et le céfotaxime affichent également des taux de résistance moyens situés aux environs des 30 % avec cependant des espèces globalement très résistantes comme *N. farcinica*, *N. otitidiscaviarum* et *N. pseudobrasiliensis*. Le céfépime semble globalement moins actif

que la ceftriaxone et le céfotaxime puisque 36 à 50 % des isolats y sont résistants. Concernant l'amoxicilline-acide clavulanique, des taux de résistance moyens (aux environs de 20 %) à élevés (plus de 60 %) ont été observés selon les études. Cependant, l'amoxicilline-acide clavulanique peut présenter un intérêt pour des espèces telle que *N. brasiliensis* qui présente des taux de résistance très bas (< 10 %), voire pour *N. farcinica* (< 25 %) et *N. abscessus* (< 27 %) qui sont également assez sensibles. Concernant les fluoroquinolones, elles sont globalement très peu actives sur les *Nocardia*, en effet, de 68 à 83 % des isolats sont résistants à la ciprofloxacine. La moxifloxacine semble avoir une activité légèrement supérieure avec des taux de résistance allant de 36 % à 60 % (10,18,20). Ces molécules présentent une activité supérieure sur certaines espèces telles que celles du complexe *N. transvalensis* et plusieurs espèces rares telles que *N. rhamnosiphila/N. flavorosea* et peuvent parfois être intéressantes chez *N. farcinica*. Concernant les cyclines, les taux de résistance pour la minocycline sont très variables selon les études, allant de moins de 10 % à plus de 57 %, cependant elle semblerait active sur les espèces du complexe *N. abscessus*, de la même manière que la doxycycline. La tigécycline semblerait avoir une activité intéressante avec un peu moins de 30 % de résistance globale d'après Lebeaux *et al.* et des espèces assez sensibles (< 10 % de résistance) telles que *N. brasiliensis* et les espèces du complexe *N. abscessus*. Les macrolides sont globalement assez peu efficaces sur les *Nocardia* puisque 60 à 80 % des isolats y sont résistants bien que la majorité des espèces du complexe *N. nova* y soit sensible.

### 7.3. Traitement antibactérien

Du fait de la rareté des nocardioses, aucune étude prospective ou thérapeutique comparative n'a pu être réalisée. Ainsi, le choix du traitement est actuellement guidé par des données cliniques rétrospectives non contrôlées ou des études *in vivo*. Comme vu précédemment, les profils de résistance rencontrés au sein du genre *Nocardia* étant d'une grande diversité, le traitement empirique qui sera débuté devra utiliser des molécules à large spectre dans l'attente de l'identification et de l'antibiogramme de la souche. L'antibiothérapie la plus adaptée est également choisie en fonction de la localisation et de la gravité de l'infection. Depuis les années 1940, les sulfamides constituent le traitement de choix des nocardioses. L'association sulfaméthoxazole-triméthoprime est

la plus utilisée bien que l'intérêt du triméthoprime n'ait jamais été démontré. Comme vu précédemment, il s'agit d'une molécule active sur la très grande majorité des souches. Cependant, les sulfamides sont réputés pour leur mauvaise tolérance chez les patients du fait de nombreux effets indésirables, nécessitant alors leur arrêt et l'emploi d'autres molécules actives. Comme vu précédemment, l'amikacine est également une molécule de premier choix, puisque la très grande majorité des souches y sont sensibles. L'imipénème est quant à elle la  $\beta$ -lactamine la plus active bien que le céfotaxime et la ceftriaxone possèdent également une bonne activité sur certaines espèces. Afin de garantir l'activité d'au moins une molécule, une bi- ou une trithérapie associant des molécules bactéricides par voie intraveineuse est le plus souvent initiée de manière empirique, utilisant l'amikacine  $\pm$  imipénème ou céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération  $\pm$  sulfaméthoxazole-triméthoprime. Plus récemment, le linézolide a prouvé son activité sur la quasi-totalité des espèces de *Nocardia* et est donc une molécule de choix en probabiliste. Il a d'ailleurs été utilisé avec succès au cours de plusieurs études (34,80). Sa tolérance étant parfois mauvaise, des études récentes se sont employées à tester le tédizolide (78). Comme le linézolide, il s'agit d'une molécule de la famille des oxazolidinones, cependant de développement plus récent et réputé mieux toléré par les patients, le tédizolide semblerait d'autre part encore plus actif que son prédécesseur. Une fois l'antibiogramme obtenu, une adaptation de l'antibiothérapie est réalisée. En cas de forme pulmonaire non compliquée ou de forme cutanée primitive, l'utilisation d'une monothérapie à base de sulfaméthoxazole-triméthoprime semble possible. En cas de forme sévère ou disséminée, une combinaison de molécules bactéricides est le plus souvent maintenue bien qu'aucune étude comparative n'est pu montrer son efficacité par rapport à une monothérapie. Après 2 à 3 semaines de traitement par voie intraveineuse, un relais *per os* est effectué si cela est possible. C'est dans ce contexte que d'autres molécules telles que l'amoxicilline-acide clavulanique, les fluoroquinolones (moxifloxaciné essentiellement), les tétracyclines (minocycline voire tigécycline) peuvent être utilisées si les données de l'antibiogramme et leurs caractéristiques pharmacocinétiques le permettent.

Concernant la durée de l'antibiothérapie, cette dernière est généralement maintenue pendant plusieurs mois (au minimum 6 mois et jusqu'à 12 mois pour les formes cérébrales) du fait d'une possible rechute et de la gravité de l'infection. Cependant les études les plus récentes laisseraient à penser que des durées plus courtes (< 120 jours) ne

semblent pas engendrer plus de rechutes (81), permettant ainsi une diminution des coûts du traitement et des effets indésirables qui concernent tout de même un patient sur deux. Ainsi, l'arrêt d'une antibiothérapie à 4 mois à cause de ses effets indésirables chez un patient qui s'améliore cliniquement et qui est atteint d'une forme pulmonaire ou cutanée non compliquée pourrait être envisageable (82)

Concernant la prophylaxie primaire par sulfaméthoxazole-triméthoprimine mise en place après transplantation afin de prévenir la survenue d'une toxoplasmose ou d'une pneumocystose, les doses utilisées ne sont malheureusement pas suffisantes pour prévenir une nocardiose car trop faibles (82). Ainsi, si une prophylaxie primaire visant à prévenir une nocardiose est envisagée, une augmentation des doses de sulfaméthoxazole-triméthoprimine est souhaitable (82). De la même manière, si une prophylaxie secondaire est envisagée, des doses plus élevées de sulfaméthoxazole-triméthoprimine sont nécessaires.

#### **7.4. Traitement chirurgical**

En cas d'abcès cérébraux, un traitement chirurgical associé à une antibiothérapie permettrait d'augmenter le taux de survie des patients (83). En effet, l'utilisation d'un traitement combiné a permis d'obtenir un taux de survie de 93 % contre 78 % en cas d'utilisation d'une antibiothérapie seule. En cas d'utilisation de la chirurgie seule, le taux de survie diminue encore (64 %). Ainsi, un drainage de l'abcès pourrait être proposé en cas de lésions de taille importante, d'absence de documentation microbiologique ou en cas de détérioration de l'état du patient malgré plusieurs semaines d'une antibiothérapie ciblée. En cas de localisation cutanée, un traitement chirurgical peut également se discuter en cas de non réponse à une antibiothérapie ciblée ou en cas de lésions de taille importante (mycétome par exemple) afin d'augmenter l'efficacité de l'antibiothérapie (61).

## PARTIE 2 : LA SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI-ToF

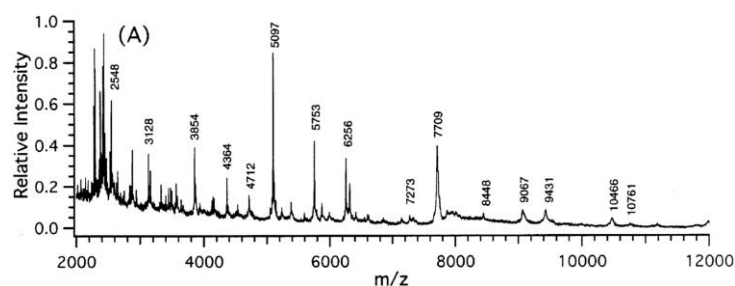
### 1. Généralités sur la spectrométrie de masse MALDI-ToF

La spectrométrie de masse est une technique permettant la détermination de la masse moléculaire des composés analysés, leur identification ainsi que leur quantification. Le principe de base de cette technique est la séparation et la détection des ions provenant des composés analysés qui auront été ionisés grâce à une source d'ionisation.

Un spectromètre de masse est composé de différents éléments placés en série permettant successivement après introduction de l'échantillon, l'évaporation et l'ionisation des molécules de l'échantillon, l'accélération des ions formés, leur séparation en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ) et enfin leur détection.

Est ainsi obtenu un spectre de masse qui présente le courant d'ions mesurés en fonction du rapport  $m/z$  (figure 12).

Figure 12 : Spectre de masse de la souche d'*Escherichia coli* ATCC 9637 (d'après Wang *et al.* 1998)

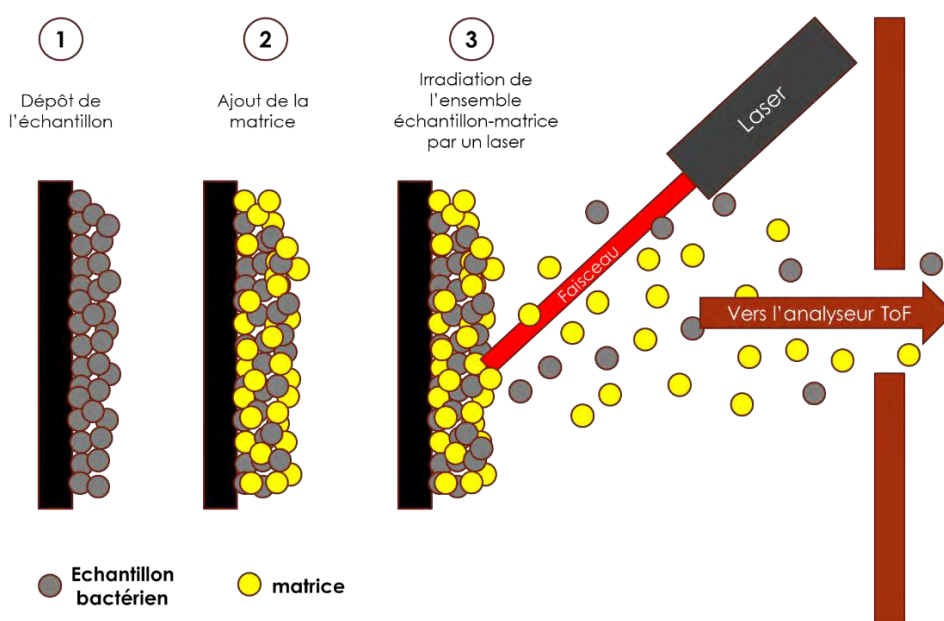


#### 1.1. Source d'ionisation MALDI

L'évaporation et l'ionisation de l'échantillon se produisent dans l'élément du spectromètre appelé la source. Plusieurs méthodes d'ionisation existent, leur utilisation dépendant des molécules à étudier et des informations désirées. Dans le cas des méthodes d'ionisation dites « douces », la formation de l'ion résulte de l'addition d'un ion ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $NH_4^+$ ) ou d'un électron ou de la soustraction d'un électron ou d'un hydrogène ionisé à la molécule. Elles permettent l'ionisation des molécules en ne provoquant pas ou peu leur fragmentation. C'est le cas de la méthode d'ionisation par électro-nébulisation (« electrospray ») ou encore de la méthode de désorption et ionisation par laser assistées par une matrice (MALDI) (figure 13). Elles concernent l'analyse de molécules de masse

moléculaire élevée (supérieure à 500 Daltons). Le principe de la technique MALDI implique l'incorporation et la co-cristallisation de l'échantillon à analyser avec une matrice. L'ensemble échantillon-matrice est ensuite irradié par les photons d'un laser dont la longueur d'onde est située dans la bande d'absorption de la matrice. L'énergie thermique produite par le laser est transférée par la matrice à l'échantillon, provoquant ainsi la désorption et l'ionisation en phase gazeuse de l'ensemble échantillon-matrice (sublimation).

Figure 13 : Principe de la source d'ionisation MALDI en microbiologie



## 1.2. Analyseur de masse ToF

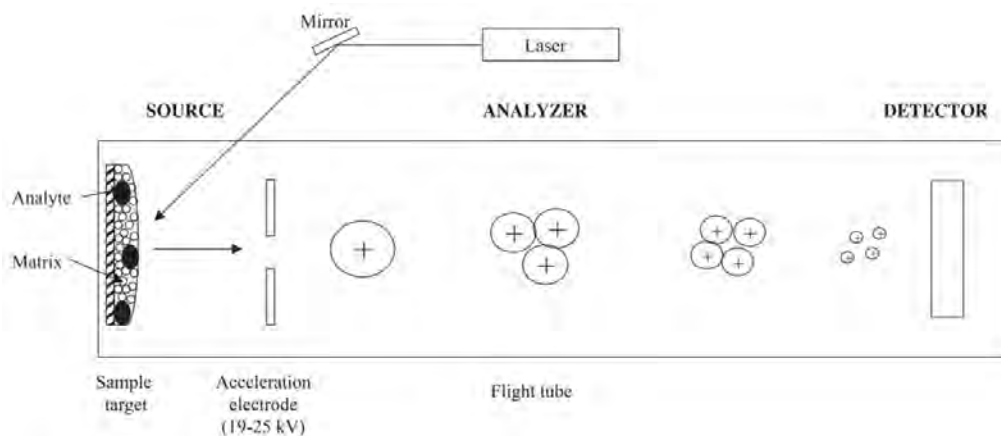
La séparation des ions formés dans la source se produit dans l'élément du spectromètre appelé analyseur de masse. Plusieurs types d'analyseurs de masse sont disponibles. Leur mode de fonctionnement repose sur l'utilisation de champs électriques et/ou magnétiques. Dans le cas de l'analyseur ToF, les ions formés sont ensuite accélérés via un champ électrostatique (une série de plaques portées à des potentiels négatifs croissants) puis envoyés dans un tube de vol sous vide. Ils acquièrent alors des vitesses différentes. Dans le tube de vol, il n'y a aucun champ, les séparations des ions se faisant donc en fonction de leur vitesse qui dépend directement de leur rapport  $m/z$ . Ainsi, les ions caractérisés par un  $m/z$  élevé volent plus lentement que ceux ayant un  $m/z$  faible. Est

donc mesuré le temps que mettent les ions pour atteindre le détecteur. Pour que ce dispositif fonctionne, il faut que tous les ions « démarrent » en même temps. On provoque donc une ionisation instantanée, répétée un grand nombre de fois afin d'améliorer la qualité du signal. Comme la source MALDI permet l'ionisation de macromolécules et ceci de manière instantanée grâce aux tirs du laser, l'analyseur de masse ToF dont la gamme de masse analysable est quasiment illimitée se couple parfaitement avec cette source.

### 1.3. Détecteur d'ions

La détection des ions est enfin faite par l'intermédiaire de la partie appelée détecteur d'ions. Il s'agit d'un multiplicateur d'électrons à dynodes séparées ou continues. Dans le cas de la MALDI-ToF MS, c'est l'enregistrement séquentiel du nombre d'ions arrivant sur le détecteur situé à l'autre extrémité du tube de vol qui permet l'obtention d'un spectre de masse caractérisant l'échantillon. Le spectre obtenu est ensuite comparé à des spectres contenus dans des bases de données selon un algorithme propre au logiciel utilisé, permettant l'identification des composés de l'échantillon.

Figure 14 : Schéma résumant le principe de la spectrométrie de masse MALDI-ToF (d'après Marvin *et al.* 2003)



## 2. Intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-ToF en bactériologie

### 2.1. Aspect pratique de la spectrométrie de masse MALDI-ToF en bactériologie

#### 2.1.1. Dépôt de l'échantillon

En microbiologie, la première étape est constituée par le dépôt de l'échantillon sur la cible d'une plaque métallique (jetable ou réutilisable). Différentes techniques de dépôt existent (84). La plus communément utilisée est la technique du dépôt direct des colonies sur cible. Elle correspond à l'application du microorganisme à tester (généralement une colonie ou quelques petites colonies) en une fine couche sur la cible. Ce dépôt est généralement réalisé à l'aide d'une oese ou d'un cône de pipette.

Pour certains microorganismes tels que les levures, une extraction sur cible par acide formique est nécessaire. Cette seconde technique consiste en l'application du microorganisme à tester en une fine couche sur la cible suivie de l'ajout d'acide formique sur la colonie sèche afin de permettre une meilleure lyse du microorganisme. Plus rarement, une technique d'extraction en tube est nécessaire. Elle consiste alors en l'application d'un extrait sur la cible. L'extraction en elle-même correspond au traitement des colonies par l'emploi successif de différents solvants (éthanol, acide formique et acétonitrile le plus souvent), entrecoupé par des étapes de lavage et de centrifugation/décantation. Différentes études ont montré que l'extraction préalable des colonies permettait d'obtenir des spectres d'une qualité supérieure (85,86). Cette problématique fut pendant longtemps débattue mais la simplicité de la méthode du dépôt direct et l'amélioration de ses performances lui ont valu d'être la plus communément employée en routine (87).

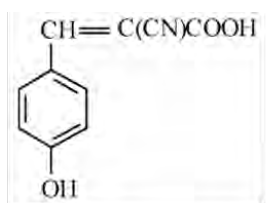
Figure 15 : Plaque 48 cibles fournie avec le Vitek MS (bioMérieux)



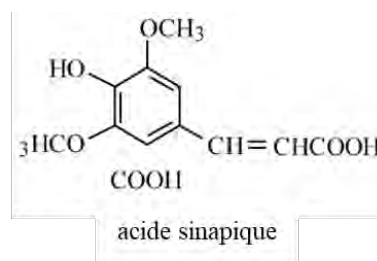
#### 2.1.2. Ajout de la matrice

Dans un second temps, le dépôt de l'échantillon, une fois sec, est recouvert par la matrice. Différentes matrices peuvent être utilisées (88). En général, il s'agit d'une solution organique saturée en cristaux possédant une faible pression de vapeur permettant ainsi leur volatilisation assez facilement. Elle est ainsi composée de petites molécules

d'acide possédant un fort pouvoir d'absorption de la gamme de longueurs d'onde du laser. Les matrices les plus communément utilisées contiennent de l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) mais d'autres composés tels que l'acide sinapique (ou acide sinapinique) ou l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque sont parfois utilisés.



acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique  
(CHCA)



acide sinapique

Ces solutions de matrice contiennent également de l'eau, un solvant organique (acétonitrile ou éthanol) et de l'acide trifluoroacétique. Ce dernier permet l'éclatement des bactéries, libérant ainsi les protéines à analyser. Cette matrice est donc mélangée en excès avec l'échantillon afin de faciliter la sublimation de ce dernier. Sous l'effet de l'évaporation, les deux composés co-cristallisent, l'échantillon se présentant alors sous la forme d'un dépôt solide pris dans la matrice. La matrice doit pouvoir répondre à un certain nombre d'exigences : elle doit posséder une grande absorbance aux longueurs d'onde du laser, posséder un chromophore au sein de sa structure afin d'empêcher la fragmentation des protéines, une grande stabilité dans le tube sous vide, une capacité à ioniser l'échantillon, une solubilité dans le solvant utilisé qui se doit d'être compatible avec l'échantillon analysé afin de créer un mélange échantillon-matrice efficace et une inertie totale vis-à-vis de l'échantillon afin d'éviter son altération (87).

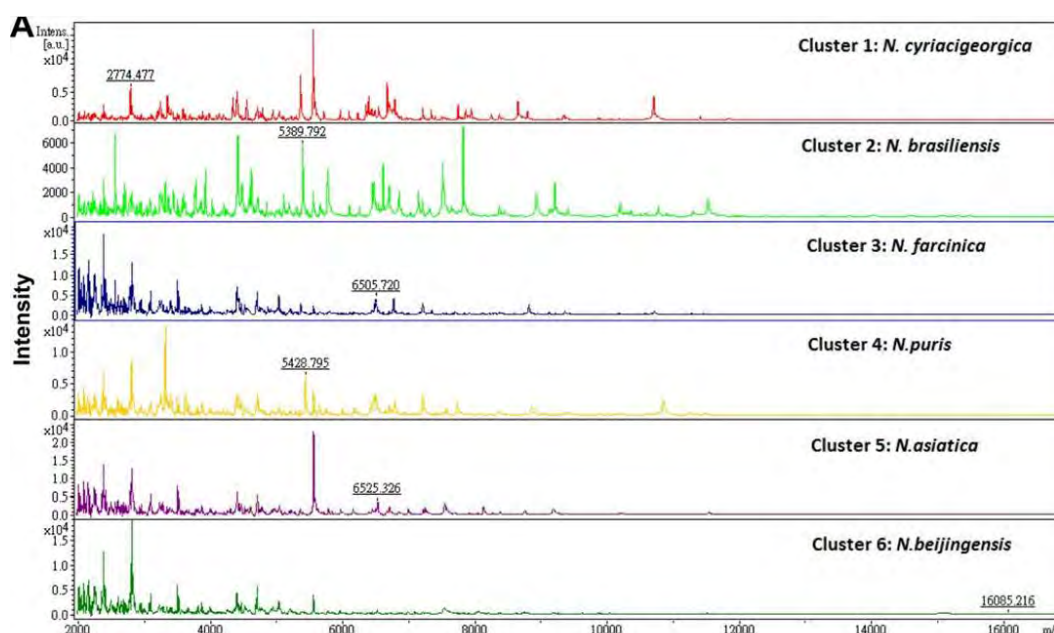
### 2.1.3. Analyse par spectrométrie de masse MALDI-ToF

La plaque est ensuite insérée dans le spectromètre de masse puis le mélange échantillon-matrice est brièvement irradié un grand nombre de fois par le faisceau du laser (généralement un laser à azote en microbiologie). Cette source d'ionisation MALDI est la plus adaptée à la microbiologie. En effet, la préparation de l'échantillon est simple, la présence de sels issus des milieux de culture et de détergents formés par les bactéries en cours de croissance ne pose pas de problème avec cette technique (contrairement à la technique « electrospray »). Elle est également plus sensible que les autres techniques

d'ionisation du fait d'une meilleure préservation des protéines grâce à la concentration du faisceau laser sur une faible surface de l'échantillon, enfin la bonne séparation des molécules analysées au sein de la matrice permet d'empêcher la formation de complexe d'ions gênant l'analyse (87).

La composition en protéines étant différente d'une espèce bactérienne à l'autre (voire entre sous-espèces et même entre différentes souches d'une même espèce), différents spectres vont être générés, permettant la discrimination des différentes espèces (figure 16). En général, les rapports  $m/z$  analysés dans le but d'obtenir l'identification d'une bactérie correspondent aux  $m/z$  des protéines ribosomales qui sont spécifiques d'une espèce à une autre (87).

Figure 16 : Spectres de masse de différentes espèces de *Nocardia* (d'après Hsueh *et al.* 2014)



## 2.2. Premiers développements et applications de la spectrométrie de masse MALDI-ToF en microbiologie

C'est en 1975 que les premiers essais d'application de la spectrométrie de masse en bactériologie débutèrent. Durant les années 1980, les techniques de désorption/ionisation, nouvellement apparues, furent évaluées dans le but de générer des biomarqueurs moléculaires pour les microorganismes. Puis en 1996, différents auteurs commencèrent à travailler sur les techniques d'ionisation MALDI (89,90) et « electrospray ».

Initialement, les premières études sur l'identification des bactéries par la MALDI-ToF MS furent limitées par des problèmes tels que l'absence de base de données ou leur insuffisance ou encore l'absence de standardisation en matière de réactifs et de protocoles d'utilisation. Les publications initiales décrivaient alors une grande variabilité des spectres en fonction des conditions de culture et entre différents laboratoires (91). D'autre part, les premières bases de données utilisées correspondaient à des bases de données « maison » contenant un grand nombre de souche de référence employé par les différents auteurs, rendant une comparaison inter-laboratoires des résultats difficile. Bien que l'utilisation de base de données « maison » perdure encore de nos jours, surtout dans le domaine de la recherche, les analyses de routine réalisées au sein des laboratoires de microbiologie clinique sont effectuées à l'aide de base de données le plus souvent fermées, contrôlées et fournies avec le spectromètre de masse par le fabricant. Ces différents problèmes furent progressivement résolus grâce à la standardisation des conditions de culture, des conditions expérimentales et à une importante augmentation de la taille des bases de données (92). De plus, les analyses qui étaient initialement centrées sur les différents composants situés à la surface des bactéries, dont le niveau d'expression peut varier selon les conditions de culture, ont ensuite été focalisées sur les protéines ribosomales qui sont exprimées de manière constante à toutes les phases de croissance. L'ensemble de ces modifications permirent donc une nette réduction de la variabilité des profils spectraux des isolats analysés, faisant de la spectrométrie de masse MALDI-ToF un outil fiable et précis pour l'identification des microorganismes (85,93,94).

### **2.3. La spectrométrie de masse MALDI-ToF de nos jours : Avantages, inconvénients et avenir**

Cette technique est donc actuellement une technique de choix qui s'implante progressivement au sein des laboratoires de microbiologie clinique, remplaçant avantageusement les techniques d'identification phénotypiques, de par sa robustesse et sa rapidité. D'autre part, le coût des analyses est faible et la maintenance de l'appareil est assez réduite. Les bases de données sont très régulièrement mises à jour, permettant une amélioration constante des performances des appareils, en particulier en ce qui concerne les microorganismes rares (95).

La spectrométrie de masse MALDI-ToF souffre cependant encore de quelques limitations. Bien que très efficace pour identifier les microorganismes au niveau du genre ou de l'espèce, une identification au niveau de la sous-espèce, du sérotype ou du biotype est plus difficile à obtenir (96). Bien que la majorité des microorganismes analysés ne nécessite pas de préparation particulière, un dépôt direct sur cible des bactéries entières étant réalisé la plupart du temps, d'autres nécessitent des prétraitements spécifiques. Ces exceptions concernent notamment les champignons et les bactéries dont la composition de la paroi cellulaire est particulière telles que les bactéries du genre *Mycobacterium* et *Nocardia*. En effet, l'analyse des levures courantes nécessite à minima l'emploi d'une extraction sur cible par de l'acide formique tandis que les bactéries des genre *Mycobacterium* et *Nocardia* nécessitent le plus souvent la réalisation d'une extraction complète, plus longue, employant différents solvants. Pour finir, le prix d'achat élevé des appareils est encore un facteur limitant son acquisition par des laboratoires de taille modeste.

La spectrométrie de masse MALDI-ToF ne se limite cependant pas seulement à l'unique identification des microorganismes, de nombreuses autres applications étant en développement. Entre autres, l'identification de mécanismes de résistance (détection des souches de staphylocoques résistants à la méticilline ou à la téicoplanine, détection de la production de  $\beta$ -lactamase) ou la détection de microorganismes directement à partir des prélèvements sera probablement possible dans un avenir proche.

#### **2.4. Spectromètres de masse MALDI-ToF disponibles sur le marché**

Actuellement, deux fabricants commercialisent des systèmes de spectrométrie de masse MALDI-ToF : bioMérieux qui commercialise le Vitek MS et Bruker qui commercialise la gamme Microflex. Chaque fabricant utilise ses propres algorithmes, base de données, logiciel et critères d'identification, certaines données sont donc difficilement comparables. Malgré quelques spécificités, ces deux systèmes affichent maintenant des performances assez similaires pour l'identification des bactéries communément rencontrées en clinique (84). Cependant, nous verrons dans une prochaine partie que des différences persistent encore pour des bactéries rares telles que les *Nocardia*.

Le système proposé par Bruker Daltonics inclut les spectromètres de masse de la gamme Microflex et la solution MALDI BioTyper. Avec ce système, les spectres de masse générés sont comparés à la base de données BioTyper. Cette dernière est construite à partir de spectres générés selon une approche « souche », signifiant que les spectres sont issus de mesures répliquatives d'une même souche dans différentes conditions. Un log score de correspondance compris entre 0,000 et 3,000, basé sur les masses identifiées et leur corrélation d'intensité est ainsi rendu. Un score compris entre 2,3 et 3,000 est considéré comme une identification d'espèce très probable, un score entre 2,000 et 2,3 comme une bonne identification de genre et une possible identification d'espèce. Dans ces deux cas, une identification au niveau de l'espèce peut être rendue de manière fiable. Un score compris entre 1,7 et 1,999 est considéré comme une identification au niveau du genre probable. Un score inférieur à 1,7 n'est pas considéré fiable et une repasse de l'échantillon ou d'autres tests doivent être envisagés. En outre, le système BioTyper est un système ouvert qui permet la création de base de données « maison ».

**Figure 17 : Spectromètre de masse Microflex LT (Bruker Daltonics)**



Le système proposé par bioMérieux inclut le spectromètre de masse Vitek MS et le logiciel Myla pour ce qui est des analyses de routine, ainsi que la base de données Saramis qui est destinée à des fins de recherche uniquement. Avec ce système, les spectres de masse générés sont comparés à une base de données construite sur une approche « population ». Ainsi, chaque espèce est représentée par une dizaine de souches différentes en moyenne. Afin de déterminer le degré de variabilité acceptable entre les spectres issus d'une même espèce, chaque souche est cultivée sur différents milieux de culture et dans différentes conditions. Ainsi, une quarantaine de spectres de référence est obtenue pour chaque espèce. Une correction de la ligne de base et du bruit de fond est effectuée

**Figure 18 : Spectromètre de masse Vitek MS (bioMérieux)**



sur les spectres bruts et une sélection des pics d'intérêt est effectuée. Cette liste de pics d'intérêt est ensuite soumise à un procédé spécifique consistant en l'attribution d'un certain poids à chaque pic selon son informativité (présence chez tous les isolats d'une même espèce ou non) (97). Par la suite, un score est calculé à partir de la somme de ces « poids » et une valeur de confiance y est associée en fonction de la similarité de ce score avec celui d'un isolat de la base de données. Une identification associée à ce pourcentage de confiance est ensuite proposée via l'interface Myla. Une identification fiable est acceptée pour des pourcentages > 60 %, autrement le logiciel peut également faire des propositions à choix multiples si le pourcentage est < 60 % ou bien ne pas rendre d'identification. Le logiciel Myla constitue donc une interface facile d'utilisation mais à l'inconvénient d'être une base de données fermée, ne permettant pas la création de base de données « maison ». Pour ce faire, les utilisateurs devront se servir de la base de données Saramis qui est moins intuitive et qui fonctionne différemment de Myla pour rendre un résultat.

### **3. Intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-ToF pour l'identification des espèces du genre *Nocardia***

#### **3.1. Introduction**

Comme déjà évoquée précédemment, l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-ToF pour identifier les bactéries et les levures communément rencontrées en pathologie humaine a été une véritable révolution dans le domaine de la microbiologie (93) de par sa rapidité et sa simplicité d'utilisation. Cependant, certains microorganismes nécessitent des étapes supplémentaires par rapport à l'ensemble des bactéries communément identifiables par simple dépôt direct sur la cible. Les champignons et les mycobactéries (et apparentés tels que les *Nocardia*) font partie de ces exceptions. La littérature concernant l'identification des mycobactéries par spectrométrie de masse MALDI-ToF est relativement abondante et précoce puisque la première étude sur ce sujet a été publiée en 2004 (98). Comme pour les autres genres bactériens, les premières études utilisaient des bases de données « maison » du fait de l'absence de base de données commerciale, cependant, contrairement aux bactéries communes, l'inclusion des différentes espèces du genre *Mycobacterium* dans les bases de données commerciales a pris beaucoup plus de temps. De nos jours encore, elles demeurent non exhaustives et

nécessitent des mises à jour. Une problématique bien spécifique aux mycobactéries est la nécessité d'inactivation des isolats avant analyse. Dans ce but, les premières études décrivent le développement de protocoles d'inactivation employant de l'acétonitrile et de l'acide trifluoroacétique (98,99). Cependant, à cette époque, la question de la nécessité d'une extraction des colonies ou de leur analyse par simple dépôt direct sur cible n'était pas encore totalement résolue. Ainsi, les premiers protocoles d'extraction développés pour les mycobactéries permettaient de combiner ces deux aspects. Par la suite, différents protocoles d'inactivation/extraction furent développés, employant des étapes telles que l'inactivation par chauffage à 95°C ou par contact prolongé avec de l'éthanol suivie d'une extraction des colonies par éthanol, acide formique, acétonitrile et agitation en présence de billes de verre. C'est Saleeb *et al.* qui introduisirent pour la première fois l'utilisation de billes de verre. Au cours de cette étude, ils remarquèrent que l'emploi du protocole d'extraction le plus souvent utilisé pour l'extraction des bactéries communes et des levures provoquait une agrégation des colonies qui ne permettait pas d'obtenir des spectres exploitables (100). Ils tentèrent ainsi la dispersion de ses agrégats par différentes méthodes, l'emploi d'une étape de broyage à l'aide d'un micro-pilon fournissant les meilleurs résultats. Cependant, les spectres obtenus à l'aide de cette méthode n'étaient toujours pas exploitables pour certaines espèces. Ils émirent donc l'hypothèse que les solvants d'extraction étaient en fait incapables de pénétrer à travers la paroi des mycobactéries connue pour sa solidité, son épaisseur et son hydrophobicité. Ils décidèrent donc d'employer une étape d'agitation en présence de billes de verre afin d'obtenir une destruction physique de cette paroi sans altération des protéines. A la suite de cette publication, un grand nombre de protocoles d'inactivation/extraction fut proposé, employant sensiblement les mêmes réactifs et une étape d'agitation avec billes de verre, modifiant alors l'ordre ou les quantités de solvants utilisés, le temps des différentes étapes, la méthode d'inactivation, etc (101–109).

Comme vu précédemment en ce qui concerne les techniques d'identification, les études réalisées sur les *Nocardia* sont assez souvent adaptées d'une littérature beaucoup plus abondante concernant les mycobactéries qui leur sont assez proches. Ainsi, les mêmes problématiques concernant la nécessité d'une extraction des colonies due à la présence d'une paroi riche en acides mycoliques se posèrent pour les *Nocardia*. Les protocoles d'extraction adaptés aux mycobactéries le sont donc aussi pour les *Nocardia* et certains auteurs développèrent ainsi des protocoles communs à ces deux genres

bactériens (103). Les bactéries du genre *Nocardia* étant des pathogènes peu fréquemment responsables d'infections humaines, un nombre encore plus restreint d'études concernant leur identification par MALDI-ToF MS a été publié et ceci de manière beaucoup plus tardive. Ainsi, la première étude concernant les *Nocardia* et la spectrométrie de masse MALDI-ToF a été publiée en 2010. A l'heure actuelle, moins d'une vingtaine d'articles traite de cette thématique.

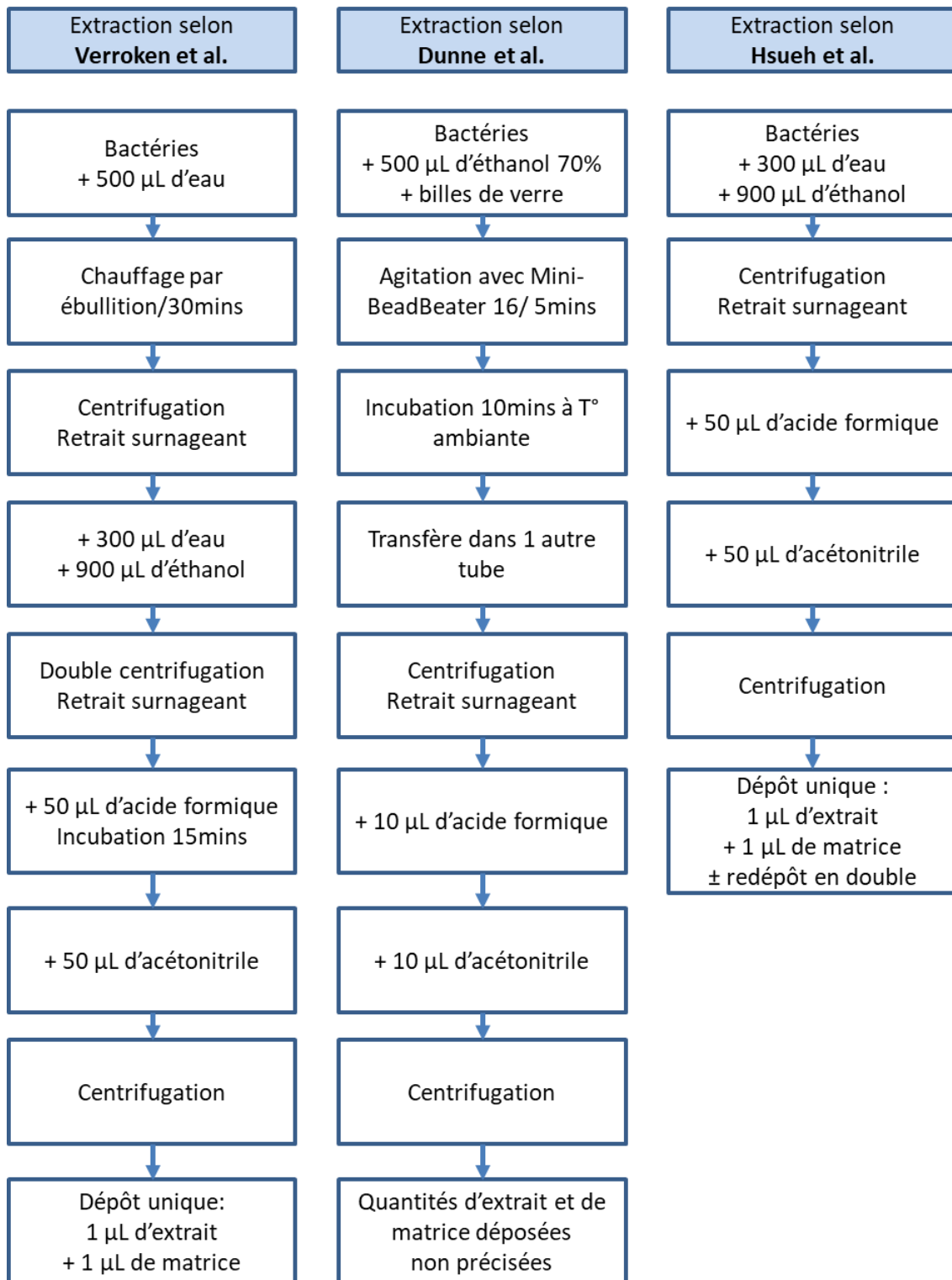
### 3.2. Revue de la littérature

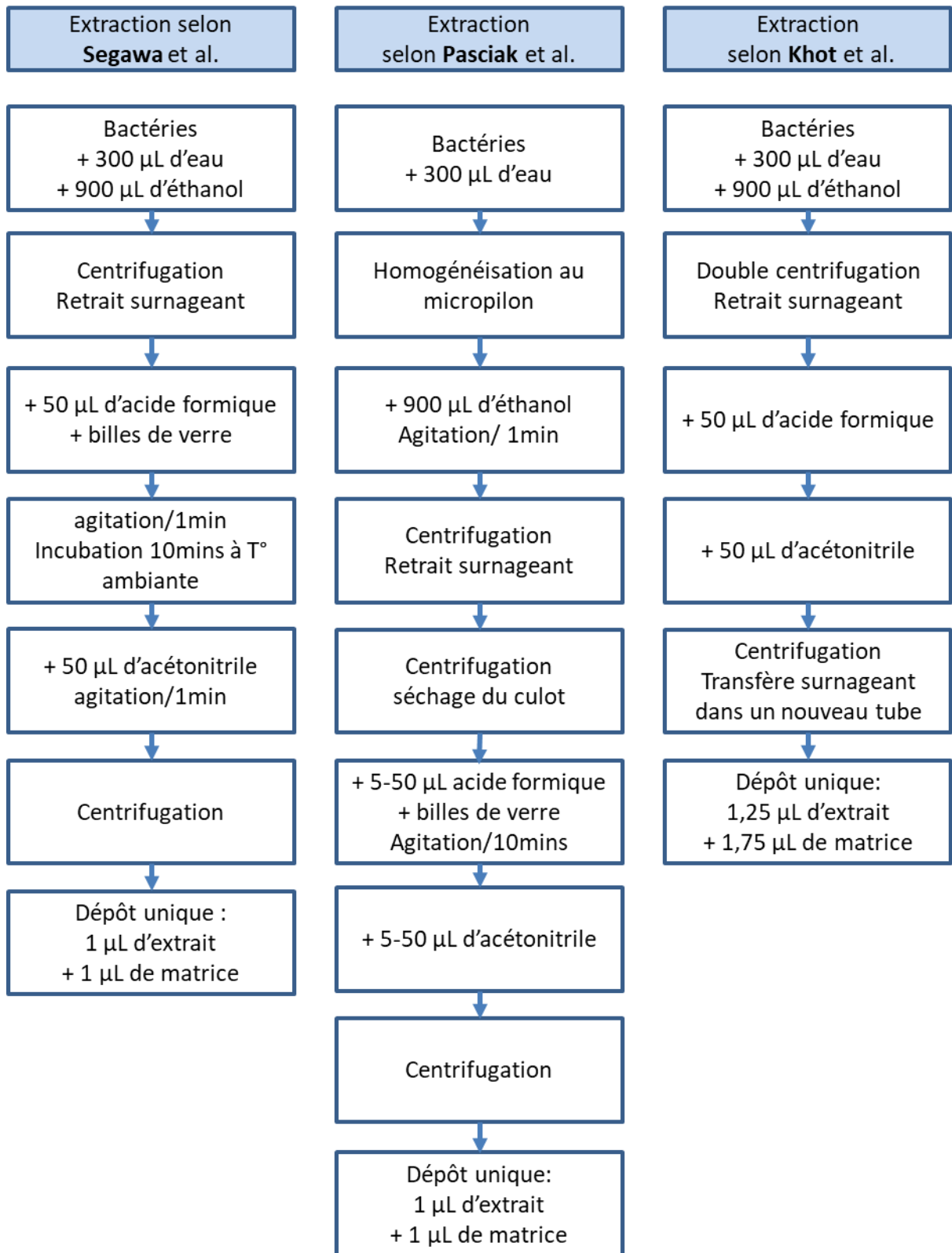
La première étude publiée sur le sujet date de 2010. Verroken *et al.* y ont décrit pour la première fois les performances de la base de données Biotyper 3.0.2 (comportant 3486 entrées dont 29 espèces de *Nocardia*) à l'aide du spectromètre MALDI-ToF Microflex LT (Bruker Daltonics) (110). Comme initialement discuté pour les autres bactéries (85,86), la nécessité d'un prétraitement ou non des colonies bactériennes avant dépôt sur la cible est une problématique récurrente en ce qui concerne les *Nocardia*. Verroken *et al.* ont initialement testé l'identification par dépôt direct. Cependant, l'obtention de spectres de très mauvaise qualité avait finalement conduit les auteurs à réaliser une étape de prétraitement. Ainsi un protocole employant de l'éthanol, de l'acide formique à 70 %, de l'acétonitrile et comprenant une étape de chauffage de l'échantillon à 100°C avait été mis en place par les auteurs (figure 19). Cette étape de chauffage, initialement destinée à inactiver les mycobactéries, a été conservée par les auteurs car ils ont jugé l'extraction par éthanol et acide formique insuffisamment efficace pour pouvoir ioniser les protéines membranaires. Comme vu précédemment, un autre problème limitant initialement l'utilisation de la MALDI-ToF MS était le faible nombre d'isolats disponibles dans les bases de données des fournisseurs, en particulier pour les espèces peu fréquemment isolées (93,111), nécessitant le développement de base de données « maison » pour palier à ce défaut (94). Pour cette même raison, Verroken *et al.* ont fait le choix de créer une base de données « maison » à partir de 110 souches de *Nocardia* (dont 19 souches type). Cette base de données « maison » a été par la suite combinée à la base de données BioTyper puis testée sur 43 isolats cliniques de *Nocardia* représentant 10 espèces différentes. En employant la seule base de données BioTyper, 19/43 (44 %) souches ont été correctement identifiées dont 10 (23 %) qui l'ont été au niveau de l'espèce et 9 (21 %) au niveau du genre. L'utilisation de la base de données BioTyper combinée à

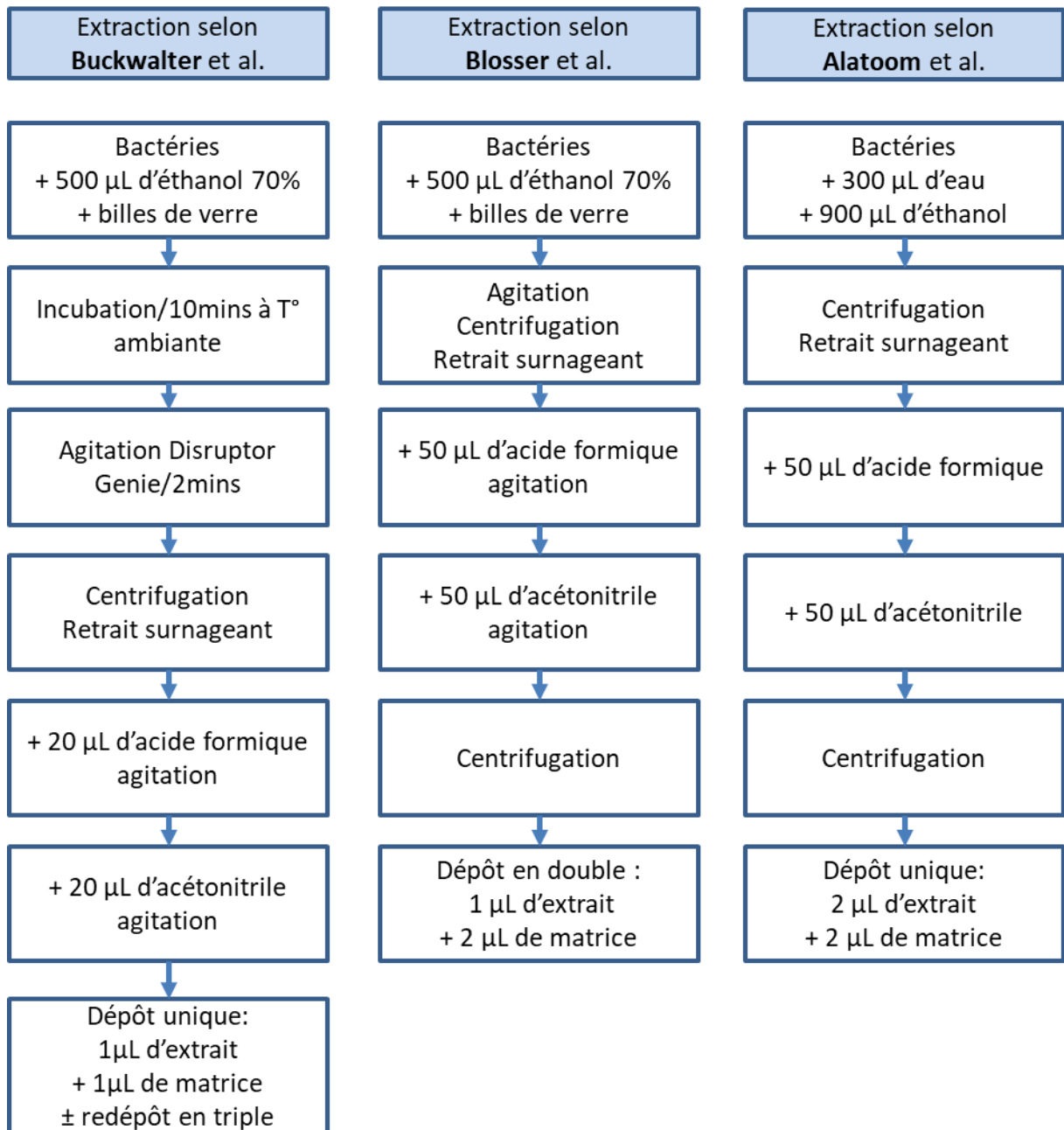
la base de données « maison » permet d'obtenir de bien meilleurs taux d'identification puisque 38/43 (88 %) des souches sont identifiées dont 34 (79 %) au niveau de l'espèce et 4 (9 %) au niveau du genre. Ainsi cette première publication permet de montrer que la base de données BioTyper était encore trop incomplète pour obtenir des taux d'identification corrects et que la création d'une base de données « maison » avait permis de combler en grande partie ces lacunes. Les auteurs ont également testé l'influence de différents milieux de culture sur les taux d'identification et avaient obtenu des résultats similaires aussi bien à partir du milieu Löwenstein-Jensen que du milieu Sabouraud. L'influence du nombre de dépôt du même extrait avait également été testée et le triple dépôt de l'extrait n'avait pas permis d'obtenir de meilleurs taux d'identification par rapport à un dépôt unique.

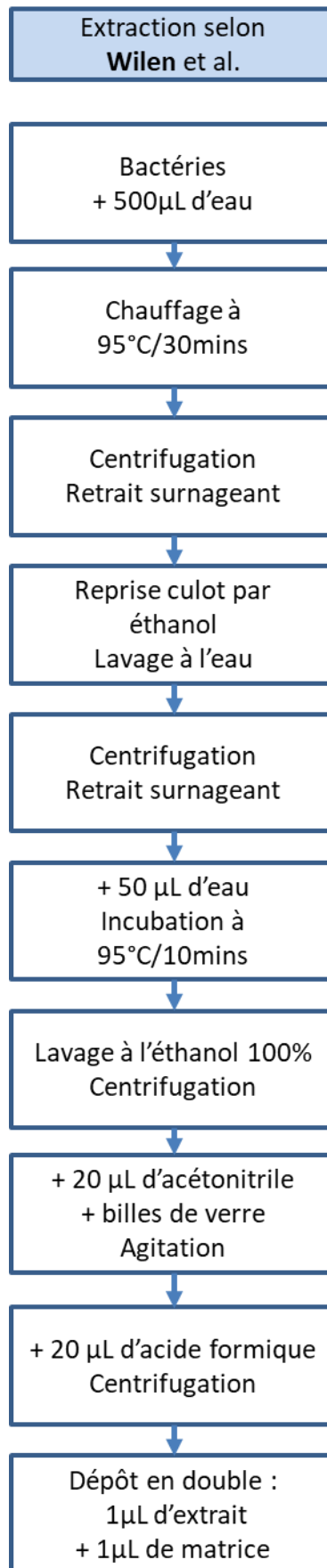
Deux ans plus tard, Farfour *et al.* publièrent un travail sur l'identification d'une collection de 659 bacilles à Gram positif dont 46 souches de *Nocardia* à l'aide de la base de données Andromas via le spectromètre MALDI-ToF Microflex (Bruker) (112). Cette base de données avait la particularité d'être composée de spectres générés sans étape de prétraitement des colonies. Les auteurs ont donc réalisé des dépôts directs qu'ils ont ensuite recouverts d'1 µL d'éthanol absolu puis d'1 µL de matrice saturée CHCA. Une identification correcte au niveau de l'espèce a été obtenue pour 42/46 isolats et 4/46 au niveau du genre. Les auteurs ont donc conclu qu'une approche simplifiée ne nécessitant pas d'étape d'extraction préalable des colonies était envisageable puisque de bons résultats avaient été obtenus de cette manière avec une base de données conçue également sans étape de prétraitement.

Figure 19 : Schéma résumé des différents protocoles d'extraction utilisés









En 2014, Hsueh *et al.* ont réalisé une étude similaire sur une collection de 147 bacilles à Gram positif issus d'isolats cliniques dont 74 souches de *Nocardia* représentant 14 espèces différentes afin d'évaluer les performances de la base de données BioTyper 3.1 (incluant alors 5627 entrées dont 32 espèces de *Nocardia*) sans supplémentation via le Microflex LT (Bruker). Un protocole d'extraction des colonies similaire à celui employé par Verroken *et al.* a été utilisé cependant, l'étape de chauffage à 100°C n'a pas été réalisée dans cette étude (figure 19). Ainsi, 15 % (11/74) des isolats ont pu être correctement identifiés au niveau de l'espèce et 65 % (48/74) au niveau du genre. Aucune erreur d'identification au niveau du genre n'a été observée, en revanche, 2 erreurs d'identification sur l'espèce ont été observées. Elles concernaient une souche de *N. asiatica* identifiée en tant que *N. cyriacigeorgica* (score à 2.256) et une souche de *N. elegans* identifiée en tant que *N. nova* (score à 2.071). A noter qu'un second dépôt en double du même extrait a été effectué pour les isolats dont l'identification par MALDI-ToF MS différait de celle obtenue via la méthode de référence (séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S et séquençage du gène *secA*) et qu'aucun bénéfice n'a été apporté par cette étape. Les auteurs ont donc conclu que l'identification des *Nocardia* par le système MALDI-ToF Bruker BioTyper n'était pas encore fiable à cause des limitations de la base de données du fournisseur, bien que cette dernière ait été complétée depuis l'étude de Verroken *et al.*.

En 2015, Segawa *et al.* ont publié une étude au cours de laquelle ils ont développé un nouveau protocole d'extraction qu'ils ont comparé à deux autres protocoles d'extraction préexistants, l'un employé par Alatoom *et al.* pour l'identification de cocci à Gram positif par MALDI-ToF MS (86), l'autre employé par Balada-Llasat *et al.* pour l'évaluation des performances du système BioTyper pour l'identification de mycobactéries (101) (figure 19). Ce nouveau protocole d'extraction est en fait largement inspiré de celui d'Alatoom *et al.* auquel s'ajoute l'utilisation de billes de verre, étape issue du protocole de Balada-Llasat *et al.*. Segawa *et al.* démontrèrent ainsi que leur nouveau protocole d'extraction permettait d'obtenir de bons scores d'identification. A l'aide de ce nouveau protocole d'extraction, ils développèrent par la suite une base de données « maison » à partir de 192 isolats cliniques représentant 73 espèces différentes. Elle sera par la suite combinée à la base de données BioTyper 3.3.1.0 (comprenant 32 espèces de *Nocardia*) puis évaluée en utilisant le Microflex LT. Ainsi un total de 64 isolats cliniques non utilisés pour la construction de la base de données a été testé afin de comparer les

scores obtenus avec ou sans addition de la base de données « maison ». La seule base de données du fournisseur a permis d'identifier seulement 15,6 % des isolats au niveau de l'espèce et 25 % au niveau du genre, tandis que la base de données « maison » combinée à celle du fournisseur a permis d'identifier 90,6 % des isolats au niveau de l'espèce et les 9,4 % restant au niveau du genre. Segawa *et al.* furent ainsi les premiers auteurs à démontrer que l'utilisation de billes de verre, qui se sont montrées efficaces pour l'extraction des mycobactéries, l'étaient également pour les *Nocardia*. Ils montrèrent aussi de nouveau que la base de données BioTyper était encore trop incomplète pour pouvoir identifier les *Nocardia* de manière fiable sans utilisation additionnelle d'une base de données « maison ».

La même année, Paściak *et al.* publièrent un article sous forme d'une sorte de « case report » dans lequel ils décrivent la comparaison de différents protocoles d'extraction puis le développement d'une base de données « maison » dans le but final d'identifier la souche décrite dans le « case report » (113). Ils comparèrent ainsi le dépôt direct des colonies, le protocole d'extraction éthanol/acide formique/acétonitrile d'Alatoom *et al.* et trois protocoles dérivés de ce dernier avec différentes modifications : (1) utilisation de billes de verre, (2) chauffage à 100°C pendant 30 min au bain marie ou (3) utilisation de billes de verre et chauffage à 100°C. Ils testèrent également le protocole utilisant du Tween 20 développé par El Khéchine *et al.* (102). Ainsi le protocole d'extraction éthanol/acide formique/acétonitrile associé à l'utilisation des billes de verre permit d'obtenir les meilleurs résultats, confirmant ainsi les données obtenues par Segawa *et al.*. Il fut par la suite employé pour la création de la base de données « maison » combinée à la base BioTyper (4613 entrées, version non précisée) et servit à identifier la souche clinique du « case report » à l'aide du spectromètre MALDI-ToF Autoflex III. Les auteurs conclurent une fois de plus que la base de données BioTyper était encore incomplète et qu'une supplémentation par une base « maison » permettait d'obtenir de meilleurs résultats.

Également en 2015, Khot *et al.* décrivent le développement d'une base de données « maison » en utilisant un protocole d'extraction assez similaire à celui d'Alatoom *et al.* (figure 19) et abordèrent des problématiques encore non discutées concernant les *Nocardia* que sont l'influence du temps de culture avant analyse des colonies et l'utilisation de seuils d'identification modifiés en ce qui concerne le système Bruker BioTyper (114). En se basant sur une de leur précédente étude (85) et d'autres

travaux (86,93), les auteurs choisirent donc d'utiliser un seuil d'identification modifié de 1,9 pour accepter une identification fiable au niveau de l'espèce. Lors des précédentes études concernant les *Nocardia*, seuls les seuils recommandés par Bruker (score  $\geq 2$  pour une identification fiable au niveau de l'espèce et score  $\geq 1,7$  pour une identification fiable au niveau du genre) avaient été utilisés. Pour la création de leur base de données « maison », les auteurs utilisèrent 13 isolats représentant 13 espèces différentes. Ils évaluèrent par la suite la base de données BioTyper 3.1 (contenant 5627 entrées dont 72 spectres de *Nocardia*) seule et combinée à leur base de données « maison » en testant 79 souches cliniques et 8 souches type. Avec la seule base de données du fournisseur, seulement 53 % des souches purent être identifiées au niveau de l'espèce et 62 % au niveau du genre. En revanche, la combinaison des deux bases de données permit d'identifier au niveau de l'espèce 83,1 % des isolats précédemment identifiés au niveau de l'espèce par biologie moléculaire et 94,8 % au niveau du genre. Pour les isolats seulement identifiés au niveau du complexe par la biologie moléculaire, 80 % ont pu être identifiés au complexe et 90 % au niveau du genre. Aucune erreur d'identification n'a été observée. Ainsi, l'utilisation de seuils modifiés semble pouvoir également être applicable pour les *Nocardia*. A noter que lorsque le seuil d'identification à l'espèce de 2 est appliqué, les taux d'identification à l'espèce diminuent de 83,1 % à 71,4 %, résultats se rapprochant de ceux obtenus par Verroken *et al.*. En ce qui concerne l'influence du temps de culture avant analyse des colonies, les auteurs ont démontré que l'utilisation de jeunes colonies améliorait les taux d'identification par rapport à l'utilisation de colonies plus âgées.

Le dernier article publié en 2015 fut celui de Buckwalter *et al.* (115) qui décrivent également le développement d'une base de données « maison » et discutèrent de nouveau de l'utilisation de seuils d'identification modifiés pour l'utilisation du spectromètre MALDI-ToF Microflex LT. Le protocole d'extraction qui fut employé dans cette étude (figure 19) était dérivé de celui précédemment décrit par Dunne *et al.* (103). Pour la création de leur base de données « maison », les auteurs utilisèrent 231 isolats de *Nocardia* représentant 53 espèces différentes. En ce qui concerne l'analyse des souches, un dépôt unique d'1  $\mu\text{L}$  d'extrait recouvert par 2  $\mu\text{L}$  de matrice a été effectué mais en cas de score  $< 2$  ou d'un nombre de pics insuffisants, un nouveau dépôt en triple a été réalisé. Par défaut, le seuil d'identification utilisé a été celui de  $\geq 2$  pour l'espèce, aucune identification au niveau du genre n'a été rapportée dans cette étude. Lorsque la seule base

de données BioTyper (version 3.3.1.0 comprenant 5627 entrées dont 72 pour les *Nocardia* représentant 32 espèces) a été utilisée, 42 % des isolats ont pu être identifiés au niveau de l'espèce et 90 % lorsque cette dernière a été utilisée en combinaison avec la base « maison ». Concernant l'utilisation d'un seuil d'identification modifié, avec l'application d'un seuil  $\geq 1,7$  pour accepter une identification correcte à l'espèce, 57 % et 95 % des souches ont pu être correctement identifiées, avec la base de données fournisseur seule et combinée respectivement. Cependant, avec le seuil de 1,7, une erreur d'identification s'est produite sur un isolat de *N. gamkensis* qui a été identifié en tant que *N. pneumoniae* en utilisant les deux bases en combinaison. Il s'agit d'une espèce rare qui ne faisait partie d'aucune base de données. Elle a pu cependant être correctement identifiée après avoir été incrémentée à la base « maison ». Ces résultats confirmèrent bien ceux de Khot *et al.* (114) quant à l'intérêt de l'utilisation d'un seuil d'identification modifié bien que l'abaissement de ce seuil à 1,7 puisse entraîner des erreurs d'identification. L'intérêt du développement d'une base de données « maison » est de nouveau souligné par les auteurs.

En 2015, notre équipe réalisa un travail de comparaison des performances des bases de données des spectromètres de masse Vitek MS (base de données Saramis destinée à des fins de recherche uniquement) et Microflex LT (base de données BioTyper 5) à l'aide de 132 souches cliniques de *Nocardia*. Deux protocoles de prétraitements différents avaient également été évalués, différant par la méthode « d'homogénéisation » des colonies, réalisée soit par l'intermédiaire d'une étape d'écrasement par micropilon, soit par l'intermédiaire d'une étape d'agitation en présence de billes de verre. Différents seuils d'identification avaient également été testés en ce qui concerne le Microflex LT. Nous avons alors pu montrer que la méthode d'extraction avec billes de verre permettait d'obtenir de meilleurs résultats puisqu'avec le Microflex LT, un score d'identification  $> 2$  avait pu être obtenu pour 58 % des isolats avec la méthode d'extraction avec billes contre 44 % avec la méthode d'extraction avec micropilon. En revanche, la méthode d'extraction n'avait pas affecté les résultats d'identification du Vitek MS. Dans l'ensemble le Vitek MS permettait d'obtenir une identification pour un plus grand nombre d'isolats que le Microflex LT quel que soit le protocole d'extraction. Seule la modification du seuil d'identification (1,8 au lieu de 2 pour accepter une identification à l'espèce) avait permis d'obtenir des résultats équivalents entre Vitek MS et Microflex LT pour les espèces de forte prévalence (*N. farcinica*, *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N.*

*abscessus*). De la même manière pour les espèces de faible prévalence, les deux analyseurs ont produit des résultats similaires avec des taux d'identification très faibles (29 % d'identification). Nous avons alors conclu que la méthode d'extraction avec billes de verre était préférable à l'extraction par micropilon bien que cette dernière ait l'avantage d'être économique et plus simple à mettre en place. Concernant le Microflex LT, la diminution du seuil d'identification à l'espèce à 1,8 semblerait être acceptable. Au global, ces deux systèmes de spectrométrie se révélèrent être intéressants pour les espèces de forte prévalence mais non fiables pour les espèces de moyenne et faible prévalence.

Au début de l'année 2016, Xiao *et al.* publièrent un travail comparant les techniques de MLSA au séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S et à la MALDI-ToF MS pour l'identification des *Nocardia* (12). Concernant l'analyse par le système MALDI-ToF Autoflex Speed TOF/TOF MS (Bruker), les auteurs utilisèrent l'extraction selon Dunne *et al.* pour prétraiter leurs souches et utilisèrent les seuils d'identification recommandés par le fournisseur. A l'aide de 5 souches cliniques appartenant à 5 espèces différentes (*N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. abscessus*, *N. wallacei* et *N. otitidiscaviarum*), ils construisirent une petite base de données « maison ». Par la suite, ils comparèrent les performances de la base de données du fournisseur utilisée seule (base de données BioTyper version 3.1 comprenant 4613 entrées) par rapport à la base de données du fournisseur combinée à la base de données « maison » à l'aide de 20 souches cliniques. En utilisant la seule base du fournisseur, aucune souche n'a pu être identifiée au niveau de l'espèce et seulement 32 % au niveau du genre. En revanche, l'utilisation de cette dernière combinée à la base « maison » a permis d'identifier 95 % des souches au niveau de l'espèce et les 5 % restant au niveau du genre. Les résultats concernant les performances de la base de données seule sont assez surprenants de par l'absence totale de souche identifiée au niveau de l'espèce d'autant plus que les souches testées appartenaient pour la très grande majorité à des espèces de forte prévalence (9 souches de *N. farcinica*, 12 de *N. cyriacigeorgica*, 2 de *N. abscessus*, 1 de *N. wallacei* et 1 de *N. otitidiscaviarum*). Les auteurs conclurent donc une fois encore qu'une supplémentation de la base de données brute, même minime, est nécessaire mais proposent tout de même un algorithme plaçant la MALDI-ToF MS en première intention pour l'identification des *Nocardia*, le séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S et la MLSA venant se placer en seconde et troisième intention respectivement.

Un mois plus tard, Blosser *et al.* publièrent une grande étude multicentrique réalisée au sein de 3 laboratoires différents (116). Ils comparèrent 3 bases de données différentes, utilisées seules ou en combinaison, pour l'identification d'un total de 150 souches de *Nocardia* représentant 30 espèces différentes, par le spectromètre MALDI-ToF Bruker Microflex LT. Un protocole d'extraction assez proche de celui de Dunne *et al.* a été employé par les auteurs (figure 19). A noter que les extraits ont été posés en double et que les isolats produisant des scores  $< 2$  ont été extraits une seconde fois et de nouveaux analysés. Les trois bases de données testées étaient la base de données du fournisseur (BioTyper reference library V4.0.0.1 comprenant 5627 entrées dont 72 pour les *Nocardia*) et les bases de données « maison » de la National Institutes of Health (NIH) comprenant 64 entrées et celle de la Ohio State University (OSU) comprenant 26 entrées. En réunissant les résultats des 3 centres, 84.2 % des souches ont pu être identifiées au niveau de l'espèce et 6 % au niveau du genre en utilisant la base fournisseur combinée aux 2 autres bases de données « maison », soit un bénéfice global de 36.9 % par rapport à la seule base de données du fournisseur. En effet, cette dernière permet d'obtenir une identification au niveau de l'espèce pour 47,3 % des isolats et 24,7 % au niveau du genre. L'accord entre les différents centres a également été analysé et un accord global de 86 % a été obtenu vis-à-vis des catégories de scores d'identification ( $\geq 2$ , entre 1,8 et 1,99,  $< 1,8$ ) et de l'identification. Les désaccords sont expliqués selon les auteurs par des temps d'incubation des cultures variables, la quantité variable de bactérie utilisée pour l'extraction, l'efficacité de l'extraction, les conditions de stockage des extraits, les variables liées à l'instrument utilisé (propreté des plaques, intensité du laser, propreté de la source, autres réglages). Lors de cette étude, les seuils d'identification de  $\geq 2$  pour une identification au niveau de l'espèce et entre 1,8 et 1,99 pour une identification au niveau du genre ont été utilisés mais l'application du score modifié de 1,8 pour l'identification au niveau de l'espèce a également été testée. L'utilisation de ce dernier a permis d'obtenir une augmentation du nombre d'isolats correctement identifiés sans apparition d'erreur d'identification, confirmant les données obtenues par Buckwalter *et al.* (115) et Khot *et al.* (114). Une amélioration du score lors de l'analyse d'un second extrait a été observé dans 21,2 % des cas, prouvant le réel intérêt de l'analyse d'un deuxième extrait si des scores  $< 2$  ont été obtenus avec le premier. En revanche, l'intérêt d'un dépôt en duplicate fut variable selon les centres, cependant pour un des 3 centres, une amélioration de l'identification a été observée pour 8.7 % des isolats. Une limitation soulevée par les

auteurs est l'incapacité de la MALDI-ToF MS à discriminer des espèces appartenant à un même complexe telles que celles des complexes *N. nova*, *N. brevicatena/N. paucivorans* et *N. transvalensis*, cependant le séquençage partiel du gène codant l'ARNr 16S ne permet pas non plus de les différencier systématiquement (2). Les auteurs conclurent donc à nouveau que l'utilisation d'une base de données supplémentaire permettait d'obtenir de bien meilleurs taux d'identification. L'utilisation du seuil d'identification modifié à 1,8 semble appropriée pour accepter une identification fiable au niveau de l'espèce. La réalisation d'un dépôt en duplicate a apporté un bénéfice significatif pour seulement un des 3 centres, cependant l'analyse d'un second extrait pour les isolats produisant des scores < 2 était clairement bénéfique.

Quelques mois plus tard, Carrasco *et al.* publièrent un article testant le séquençage complet du gène de l'ARNr 16S et le spectromètre MALDI-ToF Bruker Microflex LT pour l'identification de 100 isolats cliniques de *Nocardia* (73). En cas de désaccord entre les deux techniques, la MLSA fut utilisée comme arbitre. En ce qui concerne le protocole d'extraction, le prétraitement selon Verroken *et al.* a été utilisé (figure 19). Les seuils d'identification du fournisseur ont été utilisés. Aucune supplémentation de la base de données fournisseur (BioTyper library v4.0 comprenant 5627 entrées) n'a été employée. Au total, une concordance entre le séquençage du gène de l'ARNr 16S et l'identification par la MALDI-ToF MS a été obtenue pour seulement 33 isolats. Pour les 67 isolats restants, une concordance sur l'identification au niveau du genre a été obtenue pour 34 isolats. Pour les 33 isolats restants, aucune concordance n'a pu être obtenue que ce soit au niveau de l'espèce ou du genre. Afin de nuancer ces résultats, les auteurs ont subdivisé les 100 isolats testés en trois groupes en fonction de la prévalence de chaque espèce. Ainsi, pour les espèces de fortes prévalences (*N. farcinica*, *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. abscessus*), une concordance a été obtenue pour 19/25 isolats (76 %), 9/20 isolats (45 %) pour les espèces de prévalence intermédiaire (*N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. carnea*, complexe *N. transvalensis*) et seulement 5/55 isolats (9,1 %) pour les 22 espèces de faible prévalence. Les auteurs ont donc conclu que la seule base de données du fournisseur n'était pas suffisante pour pouvoir réaliser une identification fiable des *Nocardia*, en particulier pour les espèces de moyenne et faible prévalence. Ils ne recommandèrent donc pas l'utilisation de la MALDI-ToF MS pour l'identification des *Nocardia* en première intention et conseillèrent donc l'utilisation du séquençage complet du gène de l'ARNr 16S puis de la MLSA en cas de besoin. Ces conclusions sont

cependant à prendre avec précaution car plus de la moitié des isolats testés correspondaient à des espèces de faible prévalence et sur ces 55 isolats, 27 correspondaient à des espèces non incluses dans la base de données.

Quelques mois plus tard, un article de Girard *et al.* a été publié afin de décrire le développement d'une base de données destinée à l'identification des *Nocardia* et des mycobactéries via le spectromètre MALDI-ToF Vitek MS (bioMérieux) (117). En effet, la version 2.0 de la base de données du Vitek MS utilisée à ce moment-là par les laboratoires de microbiologie pour l'identification des bactéries et levures courantes ne contenait aucun spectre pour les mycobactéries ou les *Nocardia*. Il s'agit donc du premier article traitant du Vitek MS. Le protocole d'extraction utilisé était celui décrit par Dunne *et al.* (figure 19). Afin de construire la base de données, 84 isolats représentant 15 espèces (3 *N. abscessus*, 6 *N. africana*, 3 *N. asteroides*, 4 *N. beijingensis*, 9 *N. brasiliensis*, 10 *N. cyriacigeorgica*, 13 *N. farcinica*, 3 *N. neocaledoniensis*, 8 *N. nova*, 5 *N. otitidiscaviarum*, 5 *N. paucivorans*, 5 *N. pseudobrasiliensis*, 2 *N. transvalensis*, 3 *N. veterana*, 5 *N. wallacei*) ont été utilisés, 875 spectres ont pu ainsi être générés. Cinq milieux de cultures différents ont été utilisés pour la génération de ces spectres (gélose BCYE, gélose au sang de mouton Colombia [COS], gélose Sabouraud dextrose, gélose au sang cuit et gélose trypticase soja [TSA], toutes produites par bioMérieux). Une fois cette base de données créée, elle a été optimisée puis testée. A noter qu'au cours de cette phase d'optimisation, les 2 espèces *N. nova* et *N. africana* n'ont pas pu être différenciées et étaient donc rendues sous forme d'un résultat « *N. nova* 50 %/*N. africana* 50 % » par le Vitek MS. Concernant les résultats générés par le Vitek MS, ils sont idéalement présentés sous forme d'un nom d'espèce ou complexe d'espèce associé à une probabilité. Un choix unique (espèce ou autre niveau taxonomique) associé à une probabilité > 60 % était considéré comme une identification correcte. Ces critères d'identification ne sont pas modifiables. Ainsi, 213 isolats cliniques indépendants de ceux utilisés lors de la création de la base de données ont été analysés afin d'évaluer les performances de cette nouvelle base de données V3.0.0. Au total, 88 % des isolats ont pu être correctement identifiés. Vingt-trois isolats (11 %) n'ont pas pu être identifiés dont 12 qui appartenaient à des espèces absentes de la base de données ou qui ont été identifiés seulement au niveau du genre via le séquençage. En prenant en compte uniquement les isolats appartenant à des espèces présentes dans la base de données, soit 201 isolats, 93% ont pu être correctement identifiés. Des erreurs d'identification ont été observées pour 3 isolats. Deux de ces erreurs concernent des

espèces qui ont été identifiées comme étant une autre espèce appartenant à un même complexe, par exemple, un isolat de *N. kruczakiae* et un isolat de *N. veterana* ont été identifiés en tant que *N. nova* 50 %/*N. africana* 50 %. La dernière erreur d'identification concerne un isolat de *N. asiatica* identifié en tant que *N. cyriacigeorgica*. Cet article montra donc pour la première fois que l'identification des *Nocardia* semble fiable en utilisant le Vitek MS équipé de la nouvelle base de données V3.

Quelques mois plus tard, Girard *et al.* publièrent de nouveau un article traitant du développement de cette même base de données V3 sur le Vitek MS mais cette fois uniquement axé sur les *Nocardia* (118). Il était précisé dans l'article que l'ensemble des spectres générés au cours de cette étude seraient très prochainement intégrés dans la version V3 de la base de données du Vitek MS destinée au diagnostic *in vitro*. Cette fois ci, le dépôt direct des colonies et l'extraction ont été utilisés pour la création de la base de données. Le protocole d'extraction employé était toujours celui de Dunne *et al.* (figure 19). Quatre milieux de culture (BCYE, COS, gélose au sang cuit et Sabouraud) ont été utilisés pour la création de la base de données. La robustesse de la base de données a été assurée en générant plusieurs spectres à partir d'au moins 2 souches cultivées sur différents milieux et avec des temps d'incubation différents. Un total de 171 isolats cliniques indépendants des 84 utilisés pour la création de la base de données a été testé en utilisant la méthode avec extraction pour évaluer les performances de cette nouvelle base de données. En prenant l'ensemble des isolats, 91 % ont pu être correctement identifiés. En prenant en compte uniquement les isolats appartenant à des espèces présentes dans la base de données, 95 % ont pu être identifiés correctement. Deux erreurs d'identification ont été observées. Un isolat de *N. asteroides* a été identifié en tant que *N. neocaledoniensis*, et un isolat de *N. brasiliensis* a été identifié en tant que *N. farcinica*. Les auteurs ne trouvèrent aucune explication à ces mauvaises identifications, cependant, *N. neocaledoniensis* et *N. asteroides* sont deux espèces proches. Les auteurs ont ainsi conclu que la nouvelle version V3 de la base de données du Vitek MS permettait une identification fiable des *Nocardia* et annoncèrent qu'elle serait très prochainement disponible.

En 2017, Yarbrough *et al.* publièrent un article évaluant le spectromètre MALDI-ToF Bruker (modèle non précisé) pour l'identification de 60 isolats de *Nocardia* tout en comparant 3 protocoles différents de prétraitements des colonies, 2 versions différentes de base de données BioTyper, différents seuils d'identification et 2 milieux de culture

(119). Concernant les prétraitements, ont été comparés le protocole d'extraction selon Alatoon *et al.* (figure 19), l'extraction directe sur cible qui consistait en l'ajout d'1 µL d'acide formique 100 % sur les colonies qui avaient été préalablement déposées directement sur la cible et enfin le protocole selon Wilen *et al.* (104) (figure 19). Chaque extrait a été posé en double. Les bases de données testées correspondaient à des bases destinées uniquement à des fins de recherches (bases RUO) et non pour le diagnostic *in vitro*. Il s'agissait de la version BDAL 5989 (V5 comprenant 73 souches de *Nocardia*) et de sa mise à jour, la version BDAL 6903 (V6 comprenant 105 souches de *Nocardia*). Les seuils d'identification de 1,8 et 2 ont été testés pour accepter une identification fiable au niveau de l'espèce. Les milieux de cultures testés étaient le milieu Sabouraud et la gélose cœur-cerveille + 5 % de sang de mouton. Concernant la comparaison des deux bases de données, en utilisant le seuil d'identification fournisseur, les pourcentages cumulatifs d'identification au niveau de l'espèce quel que soit le protocole d'extraction ont été de 60 % avec la V5 et 68 % avec la V6, cependant, ces résultats n'étaient pas significativement différents ( $p=0.447$ ). Aucune erreur d'identification n'a été observée. Concernant les différents prétraitements, avec le seuil d'identification fournisseur, l'extraction selon Alatoon *et al.* a permis d'obtenir 43 % et 58 % d'identification à l'espèce avec la V5 et la V6 respectivement. Avec l'extraction directe, 43 % et 57 % des isolats ont pu être identifiés avec la V5 et la V6 respectivement et 21 % et 41 % avec l'extraction selon Wilen *et al.*. Ce dernier protocole ayant été moins efficace, il fut exclu de la suite de l'étude. Concernant la modification du seuil d'identification, la diminution du seuil fournisseur de 2 à 1,8 a permis d'augmenter significativement les taux d'identification (72 % contre 43 % avec la V5,  $p=0.003$  ; 80 % contre 58 % avec la V6,  $p=0.017$ ) avec l'extraction selon Alatoon *et al.* et ceci sans erreur d'identification. De la même manière avec l'extraction directe, un nombre significativement plus important d'isolats ont pu être correctement identifiés (73 % contre 43 % avec la V5,  $p=0.002$  ; 82 % contre 57 % avec la V6,  $p=0.0053$ ) et ce sans erreur d'identification. Au total, l'utilisation de l'extraction directe combinée à l'utilisation de la base de données BDAL V6 en employant le seuil d'identification de 1,8 permet d'obtenir un nombre d'isolats identifiés au niveau de l'espèce (82 %) significativement plus important ( $p < 0.001$ ) comparé à l'utilisation de la BDAL V5 et du seuil fournisseur (43 %). Une diminution du seuil d'identification à 1,5 au lieu de 1,7 a également été testée pour accepter une identification fiable au niveau du genre. Une augmentation des taux d'identification a également été obtenue mais des

erreurs d'identification sont apparues. Concernant l'influence du milieu de culture, il n'y a pas eu de différence significative du nombre d'isolats correctement identifiés en fonction du milieu de culture. Les auteurs ont également réalisé l'ensemble des dépôts en double afin de déterminer si cette pratique était bénéfique ou non. Ils ont ainsi montré que le dépôt en double permettait d'augmenter les taux d'identification, en particulier lorsque l'extraction directe était utilisée (14 % d'identification supplémentaire au niveau du genre et également 14 % supplémentaire au niveau de l'espèce). Au final, les auteurs ont de nouveau confirmé que le seuil modifié de 1,8 permettait d'augmenter les taux d'identification (22 % et 25 % d'identifications correctes en plus avec l'extraction selon Alatoon *et al.* et l'extraction directe respectivement) sans entraîner d'erreur d'identification. Le seuil de 1,7 est maintenu en ce qui concerne l'identification au niveau du genre. L'utilisation de l'extraction directe est préférable de par sa simplicité et ses bonnes performances. Les auteurs conseillèrent donc de réaliser une extraction directe avec dépôt en double en première intention et utilisation des seuils d'identification de 1,8 pour l'espèce et 1,7 pour le genre. Si cette méthode ne permet pas d'obtenir un résultat satisfaisant, une extraction selon la méthode d'Alatoon *et al.* doit être réalisée, un nouvel échec avec cette dernière devant conduire à une identification par biologie moléculaire. Contrairement aux publications antérieures, les auteurs ont donc conclu que le spectromètre MALDI-ToF Bruker équipé de la base de données BDAL V6, en utilisant des seuils d'identification modifiés, était fiable pour l'identification des *Nocardia*, même sans supplémentation.

En 2018, Body *et al.* réalisèrent une grande étude multicentrique au sein de 4 laboratoires différents afin d'évaluer les performances de la nouvelle base de données V3 du Vitek MS précédemment développée par Girard *et al.* et rendue entre temps disponible. Un total de 963 isolats appartenant aux genres *Mycobacterium* et *Nocardia* furent ainsi testés (120). La première partie de l'étude a consisté en l'évaluation de l'impact du milieu de culture et de l'âge des colonies au moment de l'analyse. Les milieux BCYE, gélose au sang cuit, gélose au sang et Sabouraud ont été testés. Une incubation aérobie à 35-37°C pendant 18 à 72 heures a été réalisée. Aucune différence d'identification n'a été mise en évidence quel que soit le milieu de culture et le temps d'incubation. Les auteurs ont expliqué ces résultats du fait de l'utilisation de conditions de culture similaires pour la création de la base de données V3. Les colonies testées ont été prétraitées selon les recommandations bioMérieux en utilisant le kit d'extraction *Mycobacterium/Nocardia*

(bioMérieux) et un dépôt unique a été réalisé. Si aucune identification n'était obtenue avec le premier dépôt, un second dépôt était réalisé à partir du même extrait. S'il se soldait à nouveau par un échec, une seconde extraction était réalisée et un nouveau dépôt unique effectué à partir de ce deuxième extrait. Si à nouveau aucune identification n'était obtenue, l'isolat était alors considéré comme « non identifié ». Au total, 312 isolats cliniques de *Nocardia* ont été testés. Une identification à l'espèce a été obtenue pour 76 % des isolats et une identification au complexe pour 14 %. Une mauvaise identification a été obtenue pour 3 % des isolats et les 7 % restant n'ont pas pu être identifiés malgré la réalisation de nouveaux dépôts. Pour 7 espèces fréquemment retrouvées (*N. farcinica*, *N. otitidiscaviarum*, *N. cyriacigeorgica*, *N. paucivorans*, *N. transvalensis*, *N. veterana* et *N. wallacei*), la totalité des isolats testés ont été correctement identifiés. Concernant *N. asteroides sensu stricto*, 15/19 (79 %) isolats ont pu être correctement identifiés au niveau de l'espèce, 1 isolat n'a pas pu être identifié et 3 isolats ont été identifiés en tant que *N. neocaledoniensis*. Cette erreur d'identification avait déjà été rapportée par Girard *et al.* mais s'explique par le fait que ces deux espèces sont très proches sur le plan phylogénétique. Concernant *N. nova*, la totalité des isolats ont été identifiés en tant que *N. nova* 50 %/ *N. africana* 50 %. Ces résultats sont en accord avec les explications données dans l'article de Girard *et al.* (117). De la même manière pour les 2 isolats de *N. elegans*, espèce pour laquelle aucun spectre n'est présent dans la base de données V3, un résultat *N. nova* 50 %/ *N. africana* 50 % a été obtenu. Les 6 isolats de *N. blacklockiae*, espèce faisant partie du complexe *N. transvalensis* mais pour laquelle aucun spectre n'est présent dans la base de données, ont été identifiés en tant que *N. wallacei*. Six autres espèces testées n'étaient pas présentes dans la base de données. Ceci inclut 2 isolats de *N. rhamnosiphila* et un isolat de *N. testacea* qui n'ont pas pu être identifiés ; un isolat de *N. beijingensis* et un isolat de *N. asiatica* qui ont été identifiés en tant que *N. abscessus* ; deux isolats de *N. asiatica* et un isolat de *N. arthritidis* identifiés en tant que *N. beijingensis* ; un isolat de *N. asiatica* identifié en tant que *N. abscessus*/*N. beijingensis* et un isolat de *N. vulneris* identifié en tant que *N. brasiliensis*. Sur l'ensemble des isolats de *Nocardia* testés, 280 (90 %) ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce ou du complexe. Concernant les repasses, 35/312 (11 %) isolats ont nécessité la réalisation de plusieurs dépôts. De cette manière, 47 % des isolats non identifiés lors du premier dépôt ont pu être identifiés. Un test de reproductibilité a également été réalisé sur 5 isolats (*M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. smegmatis*, *N. wallacei* et *N. otitidiscaviarum*) déposés en

double lors de deux passages par jour pendant 5 jours, sur chacun des 3 sites, pour un total de 300 passages. Une identification dès le premier dépôt a été obtenue pour 297 (99 %) isolats. Dans 2 cas, *M. smegmatis* n'a pas été identifié (passages au sein du même laboratoire), le dernier cas concernait *N. wallacei* qui n'a pas non plus pu être identifié. Il n'y a eu aucune erreur d'identification. Au final, il n'y a pas eu de différence concernant la précision de l'identification des isolats testés en fonction du site, de l'opérateur, des réactifs ou du jour. Les auteurs ont donc conclu qu'en standardisant les étapes de culture, d'extraction et d'analyse, le spectromètre MALDI-ToF Vitek MS équipé de sa base de données V3 permettait une identification fiable des mycobactéries et des *Nocardia* avec une précision de 93 %. Concernant les repasses, étant donné le faible nombre d'isolats ayant nécessité des repasses, les auteurs conseillèrent donc cette stratégie plutôt que la réalisation systématique du premier dépôt en double comme le proposèrent Yarbrough *et al.* (119).

Également en 2018, Marín *et al.* publièrent un travail évaluant les performances du spectromètre MALDI-ToF Bruker Microflex LT équipé de la nouvelle base de données BioTyper actualisée (BDAL V6 comprenant 6903 entrées contenant 105 spectres de *Nocardia* représentant 37 espèces) (121). Un total de 73 isolats cliniques a été testé. Les seuils d'identification fournisseur ont été utilisés et le prétraitement des colonies a consisté en une extraction directe sur cible avec 1 µL d'acide formique 100 % comme précédemment réalisée par Yarbrough *et al.* (119). Chaque dépôt a été réalisé en double. Une petite base de données « maison » a également été construite à l'aide de 9 isolats de 6 espèces différentes (deux souches de *N. abscessus*, une de *N. beijingensis*, une de *N. cyriacigeorgica*, une de *N. nova*, une de *N. otitidiscaviarum* et 3 de *N. veterana*) Ainsi les auteurs ont rapporté des taux d'identification de 94,5 % au niveau de l'espèce et de 5,5 % au niveau du genre avec la seule base de données du fournisseur contre 95,9 % au niveau de l'espèce et 4,1 % au niveau du genre en combinant les 2 bases de données. Cependant, ces résultats sont à considérer avec prudence car les auteurs ont bien précisé dans la section matériel et méthode qu'une identification à l'espèce était acceptée pour des scores  $\geq 2$  et au niveau du genre pour des scores  $\geq 1,7$ , les scores  $< 1,7$  étant considérés seulement si les 3 premières identifications rendues par l'analyseur étaient identiques. Or, seulement 42/73 (57,5 %) isolats ont obtenu des scores  $\geq 2$  et 27 (36,9 %) des scores  $\geq 1,7$  avec la base de données fournisseur utilisée seule. En combinant cette dernière avec la base « maison », 50/73 (68,5 %) isolats ont obtenus des scores  $\geq 2$  et 22/73 (30,1 %)

des scores compris entre  $\geq 1,7$  et  $< 2$ . Aucune explication claire n'a été donnée par les auteurs à propos des taux d'identification qu'ils décrivent. Par ailleurs, aucune erreur d'identification n'a été observée. Quatre isolats n'ont pas été identifiés mais correspondaient à des espèces peu (*N. asiatica*) ou pas (*N. beijingensis*) représentées dans la base de données. La supplémentation par la base « maison » a permis de passer de 4 à 1 seul isolat non identifié et a également permis d'augmenter le nombre d'isolats correctement identifiés au niveau de l'espèce. Les auteurs ont donc conclu que la nouvelle mise à jour de la base de données BioTyper était fiable pour l'identification des *Nocardia* cependant l'interprétation de leurs résultats est en contradiction avec leur section « matériel et méthode ». De plus, leurs résultats bruts sont tout à fait superposables à ceux retrouvés par Yarrow *et al.* s'ils sont interprétés en fonction des seuils d'identification. L'utilisation de la seule base de données BioTyper reste donc encore peu fiable si les seuils d'identification ne sont pas modifiés.

Le même mois, McTaggart *et al.* publièrent une étude afin d'évaluer l'influence de la durée d'incubation des cultures, du milieu de culture et de l'utilisation d'une étape d'agitation des colonies en présence de billes de verre pour l'identification des *Nocardia* par le spectromètre MALDI-ToF Bruker Microflex LT (122). Comme dans les articles précédents de Marín *et al.* et Yarrow *et al.*, c'est la base de données BioTyper BDAL V6 qui fut employée. L'étude se déroula en deux temps. Dans un premier temps, les auteurs testèrent sur 44 souches types et 231 souches cliniques la méthode qu'ils intitulèrent « standardized time » comprenant un temps d'incubation relativement long de 3 jours sur milieu Sabouraud avec prétraitement des colonies par un protocole d'extraction similaire à celui décrit par Hsueh *et al.* (figure 19) en y ajoutant une étape d'agitation de la suspension initiale en présence de billes de verre avant de poursuivre le reste du protocole. Avec cette méthode et en excluant 20 isolats d'espèces non présentes dans la base de données BioTyper V6, 36,4 % des 255 isolats restant ont été identifiés au niveau de l'espèce. Sur les 205 isolats représentant des espèces fréquentes (*N. farcinica*, complexe *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. abscessus*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*) seulement 40,5 % ont été identifiées au niveau de l'espèce. Une identification au genre a été obtenue pour 48,6 % des isolats. Des erreurs d'identification ont été observées pour 4 isolats (score  $> 2$ ) appartenant à des espèces fréquentes. Étant donné que ces résultats n'étaient pas du tout satisfaisants, les auteurs ont testé une seconde méthode intitulée « early growth ». Avec cette dernière, les souches ont été cultivées sur gélose au sang

pendant 18 à 72 heures mais les colonies ont été testées dès l'apparition d'une pousse significative. A noter que la majorité des isolats (80,6 %) ont nécessité seulement 18-24 heures d'incubation, 15,6 % ont nécessité 48 heures et 3,7 % ont nécessité 72 heures. Concernant le prétraitement, le même protocole que celui utilisé avec la méthode « standardized time » a été employé mais sans étape d'agitation en présence de billes de verre. Une petite base de données « maison » a également été créée à l'aide de souches de référence de *N. arthritidis*, *N. asiatica* et *N. brasiliensis* afin de pallier aux faibles nombres de spectres présents dans la base de données fournisseurs pour ces espèces. Sur les 251 isolats testés avec cette méthode et la seule base BioTyper, 80,9 % des isolats ont été identifiés au niveau de l'espèce. Sur les 202 isolats représentant des espèces fréquentes, 90 % ont été identifiés au niveau de l'espèce. Pour les 49 espèces rares testées, 42,9 % ont été identifiées au niveau de l'espèce. La combinaison de la base de données « maison » à la base fournisseur a permis d'identifier 16 isolats (6,4 %) supplémentaires. Trente-deux isolats produisant des scores  $< 2$  ont été testés une seconde fois en utilisant le protocole d'extraction de la méthode « standardized time » avec agitation par billes de verre. Ce prétraitement a ainsi permis d'identifier 6 (2,4 %) isolats supplémentaires. Au total, l'utilisation de la méthode « early growth » associée à un prétraitement par billes de verre en cas de besoin et à l'utilisation de la base de données BioTyper combinée à la base « maison » a permis d'identifier 89,6 % des isolats au niveau de l'espèce avec des taux d'identification atteignant 96 % pour les isolats d'espèces fréquentes. D'autre part, une identification au niveau du genre a été obtenue pour 6 % des isolats. Trois erreurs d'identification sur l'espèce ont été observées (1 isolat de *N. beijingensis* et 2 de *N. asteroides sensu stricto*). Concernant les espèces du complexe *N. nova*, la discrimination entre différentes espèces était difficile. Pour ces espèces, la MALDI-ToF MS a rendu des résultats proposant un choix multiple d'espèces avec des scores  $> 2$  pour 11 isolats (21,2 %) ou bien une identification erronée en tant qu'une autre espèce du complexe pour 9 (17,3 %) isolats. Concernant les isolats d'espèces rares non présentes dans la base de données, un score  $< 1,7$  ou une identification uniquement au niveau du genre a été obtenue. Concernant l'impact du milieu de culture et de son temps d'incubation, un groupe de 10 isolats a été cultivé sur géloses au sang et Sabouraud pendant 18, 24, 48 et 72 heures et ont par la suite été prétraités avec ou sans étape d'agitation en présence de billes de verre. Ainsi, quel que soit le milieu de culture, plus le temps d'incubation était long et plus les scores d'identification diminuaient. Au final, le milieu de culture impacte

indirectement l'identification dans le sens où la gélose au sang permet une pousse plus abondante et plus rapide des colonies comparée au milieu Sabouraud. En ce qui concerne l'étape d'agitation en présence de billes de verre, elle permet une légère augmentation des scores. Suite à l'ensemble de cette première partie, une étude prospective menée sur 6 mois visant à identifier par MALDI-ToF MS les isolats de *Nocardia* reçus au laboratoire du Public Health Ontario a été réalisée. La majorité des isolats (82,6 %) (5 *N. farcinica*, 3 *N. nova*, 5 *N. cyriacigeorgica*, 1 *N. abscessus*, 2 *N. otitidiscaviarum*, 1 *N. brasiliensis*, 1 *N. arthritidis*, 1 *N. asiatica*) ont été correctement identifiés au niveau de l'espèce (scores  $\geq 2$ ). Les auteurs ont donc conclu comme Khot *et al.*(114) que le milieu de culture et son temps d'incubation avaient bien un impact sur l'identification et que l'analyse de colonies jeunes était un point crucial pour obtenir des taux d'identification satisfaisants. L'utilisation d'une étape d'agitation en présence de billes de verre semble d'un intérêt limité mais semble bénéfique pour certains isolats. Les auteurs conseillent donc l'utilisation de la méthode « early growth » en première intention pour l'identification des *Nocardia*, en revanche une technique de séquençage doit être employée lorsque les scores obtenus sont  $< 2$ . L'utilisation d'une base de données « maison » permet d'élargir le panel d'espèces identifiables et ainsi d'obtenir des taux d'identification élevés pour les isolats cliniques de *Nocardia*.

### 3.3. Synthèse de la revue de la littérature

Cette revue de la littérature permet ainsi de mettre en évidence les problématiques encore non résolues en ce qui concerne l'identification des *Nocardia* par MALDI-ToF MS.

Concernant les conditions de culture, deux études ont mis en évidence que les milieux de culture qui sembleraient les plus appropriés pour obtenir des spectres de bonne qualité seraient les milieux riches telle que la gélose au sang car elle favoriserait une pousse rapide et abondante(114,122). Cependant, d'autres études ne rapportent aucun effet du choix du milieu de culture (119,120). Le temps d'incubation, de la même manière, semblerait avoir un impact sur la qualité des spectres, certaines études rapportant que plus les colonies sont analysées jeunes et meilleurs sont les résultats (114,122)mais ceci n'a pas été confirmé par d'autres études. Il est ainsi difficile de faire la part des choses

concernant les conditions de culture, mais les milieux riches qui sont souvent employés pour la création des bases de données semblent tout de même les plus appropriés.

Concernant le dépôt, de nombreuses publications ont proposé et évalué différentes méthodes. Le dépôt direct des colonies sur la cible ayant initialement donné de mauvais résultats (110), la majorité des auteurs ont par la suite développé différents protocoles d'extraction des colonies. Dans l'ensemble, ils sont assez similaires, mais aucune standardisation de ceux-ci n'a encore été établie. Les dernières études concernant le Microflex LT tendent à favoriser le dépôt avec extraction sur cible par de l'acide formique, technique moins contraignante que l'extraction en tube et qui donnerait d'aussi bons résultats (119,122). Le bénéfice de la réalisation d'un second dépôt en cas d'échec d'identification lors du premier dépôt puis d'une réextraction des colonies en cas de nouvel échec a été montré par plusieurs études mais là encore, aucune standardisation n'a été obtenue (116,120). En ce qui concerne l'intérêt de déposer l'échantillon en double, de nouveaux les études se contredisent (119,120). La commercialisation par bioMérieux d'un kit d'extraction dédié à l'identification des mycobactéries et des *Nocardia* permettra peut-être dans l'avenir d'harmoniser ces pratiques.

Concernant les bases de données des différents fournisseurs, cela fait déjà un peu moins d'une dizaine d'années que Bruker a inclus différentes espèces de *Nocardia* dans sa base de données BioTyper qui est régulièrement mise à jour, comptant donc de plus en plus de spectres pour ce genre. Cependant, les dernières études ont encore montré que cette base de données demeure incomplète (121), en particulier pour les espèces rares (73) et qu'une modification des seuils proposés par le fournisseur était possible (119,121) mais là encore, aucun consensus n'a été établi. Concernant la base de données bioMérieux, c'est seulement depuis l'année 2018 avec la mise à disposition de la nouvelle version V3 (118) de cette base de données que les *Nocardia* sont désormais identifiables via le Vitek MS. Encore très peu d'études ont pu évaluer ses performances mais ce système semble donner de bons résultats (120). Cependant, seulement 15 espèces de *Nocardia* sont disponibles avec la base V3, limitant ses capacités aux espèces les plus courantes.

De manière générale, la MALDI-ToF MS se heurte actuellement à la même problématique que la technique de séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S en ce qui concerne la discrimination des différentes espèces des complexes d'espèces comme le complexe *N. nova* ou le complexe *N. abscessus* (120). Cependant, la génération d'un plus

grand nombre de spectres pour ces espèces permettra peut-être aux bases de données de pouvoir mieux les différencier.

En conclusion, la MALDI-ToF MS est une technique d'intérêt majeur pour l'identification des *Nocardia* mais de gros efforts de standardisation des conditions pré-analytiques et d'implémentation des bases de données restent à faire concernant ce genre bactérien.

## **PARTIE 3 : EVALUTATION DES PERFORMANCES DE LA BASE DE DONNEE V3 DU SPECTROMETRE DE MASSE MALDI-TOF VITEK MS POUR L'IDENTIFICATION DES BACTERIES DU GENRE *NOCARDIA***

### **1. Objectifs**

Au cours de ces 20 dernières années, les techniques d'identification des bactéries du genre *Nocardia* ont largement évoluées. Aujourd'hui, la méthode d'identification de référence est le séquençage partiel du gène de l'ARN ribosomal 16S. Néanmoins différentes méthodes d'identification doivent souvent être combinées pour caractériser une souche. Ainsi, la MLSA utilisant les gènes *rpoB*, *gyrB*, ARNr 16S, *secA1*, *sod* et *hsp65*, est la méthode de référence pour l'identification précise des différentes espèces du genre *Nocardia*. Cependant ces techniques demeurent peu accessibles pour les laboratoires de routine et sont donc l'apanage de laboratoires de référence. Ainsi, le délai d'obtention d'une identification est souvent long alors qu'une identification rapide et précise de ces bactéries est nécessaire en raison de la gravité des infections dont elles sont responsables. La spectrométrie de masse MALDI-ToF largement utilisée pour l'identification rapide des bactéries et des levures communes, semblerait être une alternative intéressante pour l'identification des *Nocardia*. Actuellement, deux spectromètres de masse sont couramment employés, le Microflex LT (Bruker) et le Vitek MS (bioMérieux).

L'objectif de cette étude est d'évaluer les performances d'identification phénotypique de la nouvelle base de données V3 du système Vitek MS sur l'ensemble des souches de *Nocardia* reçues sur l'année 2014 à l'Observatoire Français des Nocardioses (OFN) et sur une collection de souches incluant 18 espèces pathogènes de *Nocardia*.

### **2. Matériel et méthode**

#### **2.1. Souches**

Un groupe de 131 souches de *Nocardia* issues d'isolats cliniques envoyés à l'Observatoire Français des Nocardioses (OFN) (Institut des Agents Infectieux,

Université Claude Bernard, Lyon, France) durant l'année 2014 et un autre groupe de 204 souches de *Nocardia* appartenant aux 18 principales espèces pathogènes rencontrées en clinique ont été inclus dans cette étude. L'ensemble des souches a été préalablement identifié par séquençage partiel du gène de l'ARNr 16S à l'OFN. Les amorces Noc1 et Noc2 ont ainsi été utilisées pour amplifier un fragment de 600 nucléotides du gène de l'ARNr 16S (68). Le séquençage a par la suite été réalisé par Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). L'analyse a été effectuée sur des cultures fraîches des souches décongelées (stockées à -80°C) et repiquées au moins une fois. Deux milieux de culture différents ont été testés : une gélose Columbia au sang de mouton (COS) (bioMérieux Ref. 43041) et une gélose au bromocrésol pourpre (BCP) (bioMérieux Ref. 43021). Elles ont ensuite été incubées à 37°C pendant 72 heures.

## 2.2. Prétraitement des isolats

Chaque isolat a subi un prétraitement selon le protocole recommandé par bioMérieux à l'aide du kit VITEK® MS *Mycobacterium/Nocardia* (bioMérieux Ref. 415659). Lors de ce prétraitement, les colonies à identifier ont été récupérées à l'aide d'une oese de 1 µL, et une oese complète de ces colonies a été transférée dans un tube Eppendorf contenant approximativement 200 µL de billes de verre de 0,5 mm additionnés de 500 µL d'éthanol à 70°. Une fois fermé, le tube a été agité 15 minutes à l'aide d'un vortex Genie 2 (Scientific Industries) muni d'un adaptateur MoBio (Qiagen). Le tube a ensuite été incubé à température ambiante pendant 10 minutes. Le tube a été rapidement passé au vortex, le surnageant transféré dans un autre tube Eppendorf vide en évitant tout transfert de bille de verre puis centrifugé à 14,000 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant a été enlevé, le culot remis en suspension à l'aide de 10 µL d'acide formique à 70 % et le tube de nouveau vortexé. Dix µL d'acétonitrile ont été ajoutés, le tube de nouveau vortexé puis centrifugé à 14,000 rpm pendant 2 minutes. Le surnageant ainsi formé a été par la suite utilisé pour analyse par le Vitek MS. Pour des raisons pratiques, tous les extraits utilisés ont été congelés suite au premier dépôt. Ainsi, dans le cas où un second dépôt du même extrait était nécessaire, l'extrait était décongelé puis réanalysé.

### **2.3. Dépôt des échantillons**

Pour chaque milieu, l'isolat cultivé a été déposé de deux manières différentes : le premier dépôt a consisté en l'application d'une petite quantité de colonies à tester à l'aide d'une oese de 1 µL directement sur la cible d'une plaque de 48 cibles. Le deuxième dépôt a consisté en l'application sur la cible d'1 µL de surnageant de l'extrait précédemment préparé. Quel que soit le type de dépôt, il a ensuite été laissé à sécher quelques instants puis recouvert par 1 µL de matrice à base d'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA) puis de nouveau laissé à sécher. La plaque a finalement été chargée dans le spectromètre de masse Vitek MS.

### **2.4. Calibration de l'appareil**

La souche de référence *E. coli* ATCC 8739 a été utilisée sur chaque plaque afin de permettre la calibration de l'appareil, comme les instructions du fournisseur le recommandent.

### **2.5. Analyse des échantillons**

Chaque dépôt a été analysé par le spectromètre de masse en utilisant les réglages du fournisseur et le spectre de masse ainsi obtenu a ensuite été comparé à la base de données V3 afin de rendre une identification associée à un pourcentage correspondant au niveau de confiance via le logiciel Myla.

### **2.6. Critères d'identification**

Une identification à l'espèce a été acceptée lorsqu'un unique nom d'espèce était obtenu avec un niveau de confiance > 60 %. Une identification au complexe a été acceptée lorsque 2 noms d'espèce appartenant au même complexe (espèces des complexes *N. nova* ou *N. veterana* par exemple) associés à un niveau de confiance à 50 % pour chaque proposition a été obtenu. En ce qui concerne les dépôts réalisés à partir des extraits, si aucune identification n'a été rendue par l'analyseur, un nouveau dépôt en double a été

réalisé à partir du même extrait congelé. Si de nouveau aucune identification n'a été rendue par l'analyseur, l'isolat a été extrait une seconde fois et un nouveau dépôt réalisé. Si aucune identification n'a été rendue par l'analyseur, l'isolat a alors été considéré comme « non identifié ». Aucune repasse n'a été réalisée en ce qui concerne les dépôts directs.

### 3. Résultats

#### 3.1. Performances pour l'identification des souches de l'année 2014

Concernant les dépôts directs, peu d'isolats ont été correctement identifiés puisque seulement 11 % et 9 % des isolats sont associés à une identification correcte, à partir des milieux BCP et COS respectivement.

Concernant les dépôts à partir des extraits, le premier dépôt a permis d'identifier correctement 69 % des isolats à partir du milieu BCP et 82 % des isolats à partir du milieu COS. La réalisation d'un second dépôt en double pour les isolats non identifiés lors du premier dépôt a permis d'augmenter les taux d'identification correcte à 80 % (soit une augmentation de 11 %) pour le milieu BCP et 87 % (soit une augmentation de 5 %) pour le milieu COS. La réalisation d'une seconde extraction avec un nouveau dépôt pour les isolats non identifiés lors du second dépôt a permis d'augmenter les taux d'identification correcte à 89 % (soit une augmentation de 8 % par rapport au second dépôt) pour le milieu BCP et 92 % (soit une augmentation de 5 %) pour le milieu COS. Au total, 73 % des souches non identifiées lors du premier dépôt de l'extrait ont pu l'être grâce aux seconds dépôts puis une nouvelle extraction si nécessaire pour le milieu BCP et 78 % pour le milieu COS.

Concernant les espèces de forte prévalence (*N. farcinica*, complexe *N. nova*, *N. abscessus*, *N. cyriacigeorgica*), des taux d'identification cumulés élevés ont pu être obtenus puisque 92 % et 94 % des souches appartenant à ces 4 espèces ont été correctement identifiées à partir des milieux BCP et COS respectivement. *N. farcinica* et *N. cyriacigeorgica* sont les 2 espèces les mieux identifiées puisque la totalité de ces isolats ont été identifiés et le plus souvent dès le premier dépôt. Concernant, le complexe *N. nova*, la totalité des isolats identifiés l'ont été uniquement au niveau du complexe, le Vitek MS proposant systématiquement un unique résultat sous la forme d'un choix de type « *N.*

*nova* 50 %/*N. africana* 50 % ». Concernant *N. abscessus*, les isolats ont pu être correctement identifiés dès le premier dépôt dans seulement un peu plus d'une fois sur deux, cependant, la réalisation d'un second dépôt puis si nécessaire, d'une seconde extraction a permis d'obtenir au total des taux d'identification satisfaisants (84 % quel que soit le milieu utilisé).

**Tableau 4 : Taux d'identification en fonction du nombre de dépôt (collection 2014)**

Espèces	Nombre de souche	Nombre de souches identifiées (espèce + complexe)							
		1 <sup>ère</sup> Extraction/ 1 <sup>er</sup> dépôt (%)		1 <sup>ère</sup> Extraction/ 2 <sup>ème</sup> dépôt (%)		2 <sup>ème</sup> Extraction (%)		Total cumulé (%)	
		BCP	COS	BCP	COS	BCP	COS	BCP	COS
<b>Forte prévalence</b>	<b>102</b>	<b>72 (71)</b>	<b>86 (84)</b>	<b>14 (14)</b>	<b>6 (6)</b>	<b>8 (8)</b>	<b>4 (4)</b>	<b>94 (92)</b>	<b>96 (94)</b>
<i>N. farcinica</i>	42	32 (76)	40 (95)	8 (19)	1 (2)	2 (5)	1 (2)	42 (100)	42 (100)
<i>N. nova</i>	25	15 (60)	21 (84)	3 (12)	1 (4)	2 (8)	0 (0)	20 (80)	22 (88)
<i>N. abscessus/asiatica</i>	19	10 (53)	11 (58)	3 (16)	3 (16)	3 (16)	2 (11)	16 (84)	16 (84)
<i>N. cyriacigeorgica</i>	16	15 (94)	14 (88)	0 (0)	1 (6)	1 (6)	1 (6)	16 (100)	16 (100)
<b>Prévalence intermédiaire</b>	<b>21</b>	<b>18 (86)</b>	<b>18 (86)</b>	<b>1 (5)</b>	<b>1 (5)</b>	<b>1 (5)</b>	<b>2 (10)</b>	<b>20 (95)</b>	<b>21 (100)</b>
<i>N. wallacei/transvalensis</i>	8	6 (75)	5 (63)	1 (13)	1 (13)	1 (13)	2 (25)	8 (100)	8 (100)
<i>N. brasiliensis</i>	5	4 (80)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (80)	5 (100)
<i>N. veterana</i>	5	5 (100)	5 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (100)	5 (100)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	3	3 (100)	3 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3 (100)
<b>Faible prévalence</b>	<b>8</b>	<b>1 (13)</b>	<b>3 (38)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>1 (13)</b>	<b>1 (13)</b>	<b>2 (25)</b>	<b>4 (50)</b>
<i>N. paucivorans</i>	2	1 (50)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	2 (100)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	2	0 (0)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	1 (50)	2 (100)
<i>N. asteroides</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. cerradoensis</i> *	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. altamirensis</i> *	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total général</b>	<b>131</b>	<b>91 (69)</b>	<b>107 (82)</b>	<b>15 (11)</b>	<b>7 (5)</b>	<b>10 (8)</b>	<b>7 (5)</b>	<b>116 (89)</b>	<b>121 (92)</b>

\* espèce absente de la base de données V3

Concernant les espèces de prévalence intermédiaire (complexe *N. wallacei/transvalensis*, *N. brasiliensis*, *N. veterana*, *N. otitidiscaviarum*), des taux d'identification cumulés élevés ont été obtenus (95 % à partir du milieu BCP et 100 % à partir du milieu COS) et ceci dès le premier dépôt dans la très grande majorité des cas.

Concernant les espèces de faible prévalence (*N. paucivorans*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. asteroides*, *N. cerradoensis*, *N. altamirensis*), les taux d'identification cumulés obtenus ont été nettement moins satisfaisants, puisque seulement 25 % des isolats ont pu être identifiés à partir de la gélose BCP et 50 % à partir de la gélose COS. Cependant, ces résultats sont à nuancer en fonction des espèces et surtout de leur présence ou non dans la base de données V3. En effet, en ce qui concerne les espèces *N. paucivorans* et *N. pseudobrasiliensis*, 100 % des isolats ont pu être identifiés à partir de la gélose COS mais seulement 50 % à partir de la gélose BCP. Les espèces *N. cerradoensis* et *N. altamirensis*

n'étant pas incluses dans la base de données V3, ces isolats n'ont pas pu être correctement identifiés. L'unique isolat de *N. asteroides* n'a pu être identifié correctement.

Concernant les erreurs d'identification, 5 % des isolats ont été incorrectement identifiés quel que soit le milieu utilisé. Une souche de *N. nova* a été identifiée comme étant une *N. veterana* aussi bien à partir du milieu BCP que COS. Une souche de *N. abscessus* a été identifiée en tant que *N. veterana*. Une souche de *N. asteroides* a été identifiée en tant que *N. neocaledoniensis* et ceci à partir des deux milieux. Les deux souches de *N. cerradoensis* ont été identifiées en tant que *N. nova/africana* et l'unique souche de *N. altamirensis* en tant que *N. brasiliensis*, ceci à partir des deux milieux.

### **3.2. Performances sur une collection de souches de 18 espèces différentes**

Concernant les dépôts directs, peu d'isolats ont été correctement identifiés puisque seulement 15 % et 11 % des isolats sont associés à une identification correcte, à partir des milieux BCP et COS respectivement.

Concernant les dépôts à partir des extraits, le premier dépôt a permis d'identifier correctement 60 % des isolats à partir du milieu BCP et 71 % des isolats à partir du milieu COS. La réalisation d'un second dépôt en double pour les isolats non identifiés lors du premier dépôt a permis d'augmenter les taux d'identification correcte à 71 % (soit une augmentation de 12 %) pour le milieu BCP et 78 % (soit une augmentation de 7 %) pour le milieu COS. La réalisation d'une seconde extraction avec un nouveau dépôt pour les isolats non identifiés lors du second dépôt a permis d'augmenter les taux d'identification correcte à 80 % (soit une augmentation de 9 % par rapport au second dépôt) pour le milieu BCP et 83 % (soit une augmentation de 5 %) pour le milieu COS. Au total, 53 % des souches non identifiées lors du premier dépôt ont pu l'être grâce aux seconds dépôts puis une nouvelle extraction si nécessaire aussi bien pour le milieu BCP que pour le milieu COS.

**Tableau 5 : Taux d'identification en fonction du nombre de dépôt (collection 2014 à 2016)**

Espèces	Nombre de souche	Nombre de souches identifiées (espèce + complexe)							
		1 <sup>ère</sup> Extraction/ 1 <sup>er</sup> dépôt (%)		1 <sup>ère</sup> Extraction/ 2 <sup>ème</sup> dépôt (%)		2 <sup>ème</sup> Extraction (%)		Total cumulé (%)	
		BCP	COS	BCP	COS	BCP	COS	BCP	COS
<b>Forte prévalence</b>	<b>105</b>	<b>74 (70)</b>	<b>88 (84)</b>	<b>14 (13)</b>	<b>6 (6)</b>	<b>9 (9)</b>	<b>4 (4)</b>	<b>97 (92)</b>	<b>98 (93)</b>
<i>N. farcinica</i>	42	32 (76)	40 (95)	8 (19)	1 (2)	2 (5)	1 (2)	42 (100)	42 (100)
<i>N. nova</i>	25	15 (60)	21 (84)	3 (12)	1 (4)	3 (12)	0 (0)	21 (84)	22 (88)
<i>N. abscessus/asiatica</i>	20	10 (50)	11 (55)	3 (15)	3 (15)	3 (15)	2 (10)	16 (80)	16 (80)
<i>N. cyriaciageorgica</i>	18	17 (94)	16 (89)	0 (0)	1 (6)	1 (6)	1 (6)	18 (100)	18 (100)
<b>Prévalence intermédiaire</b>	<b>50</b>	<b>36 (72)</b>	<b>36 (72)</b>	<b>5 (10)</b>	<b>4 (8)</b>	<b>3 (6)</b>	<b>4 (8)</b>	<b>44 (88)</b>	<b>44 (88)</b>
<i>N. wallacei/transvalensis</i>	15	11 (73)	9 (60)	2 (13)	2 (13)	1 (7)	3 (20)	14 (93)	14 (93)
<i>N. veterana</i>	13	10 (77)	9 (69)	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	10 (77)	10 (77)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	12	7 (58)	10 (83)	2 (17)	0 (0)	2 (17)	1 (8)	11 (92)	11 (92)
<i>N. brasiliensis</i>	10	8 (80)	8 (80)	1 (10)	1 (10)	0 (0)	0 (0)	9 (90)	9 (90)
<b>Faible prévalence</b>	<b>49</b>	<b>12 (24)</b>	<b>20 (41)</b>	<b>5 (10)</b>	<b>5 (10)</b>	<b>6 (12)</b>	<b>3 (6)</b>	<b>23 (47)</b>	<b>28 (57)</b>
<i>N. beijingensis</i>	11	4 (36)	5 (45)	2 (18)	1 (9)	1 (9)	1 (9)	7 (64)	7 (64)
<i>N. paucivorans</i>	10	3 (30)	8 (80)	2 (20)	2 (20)	3 (30)	0 (0)	8 (80)	10 (100)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	9	4 (44)	5 (56)	0 (0)	2 (22)	2 (22)	2 (22)	6 (67)	9 (100)
<i>N. neocaledoniensis</i>	2	1 (50)	2 (100)	1 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	2 (100)
<i>N. asteroides</i>	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. cerradoensis*</i>	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. altamirensis*</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. puris*</i>	5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. goodfellowi*</i>	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. arthritidis*</i>	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Total</b>	<b>204</b>	<b>122 (60)</b>	<b>144 (71)</b>	<b>24 (12)</b>	<b>15 (7)</b>	<b>18 (9)</b>	<b>11 (5)</b>	<b>164 (80)</b>	<b>170 (83)</b>

\* espèce absente de la base de données V3

Concernant les espèces de prévalence intermédiaire (complexe *N. wallacei/transvalensis*, *N. brasiliensis*, *N. veterana*, *N. otitidiscaviarum*) des taux cumulés d'identification élevés ont également été obtenus (88 % aussi bien à partir du milieu BCP qu'à partir du milieu COS). On observe cependant des taux d'identification un peu moins bons pour *N. veterana* par rapport aux 3 autres espèces qui ont des taux d'identification très similaires.

Concernant les espèces de faible prévalence (*N. paucivorans*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. asteroides*, *N. cerradoensis*, *N. altamirensis*, *N. beijingensis*, *N. neocaledoniensis*, *N. puris*, *N. goodfellowi*, *N. arthritidis*), les taux d'identification cumulés obtenus sont nettement moins satisfaisants, puisque seulement 47 % des isolats ont pu être identifiés à partir de la gélose BCP et 57 % à partir de la gélose COS. Cependant, ces résultats sont à nuancer en fonction des espèces et surtout de leur présence ou non dans la base de données V3. En effet, en ce qui concerne les espèces *N. paucivorans* et *N. pseudobrasiliensis*, 100 % des isolats ont pu être identifiés à partir de la gélose COS, des résultats moins bons étant obtenus à partir de la gélose BCP puisque 80 % des isolats de *N. paucivorans* ont pu être identifiés et seulement 67 % pour *N. pseudobrasiliensis*. Concernant *N.*

*beijingensis*, des résultats mitigés sont obtenus avec 64 % d'isolats identifiés aussi bien à partir du milieu BCP que COS. Les 2 isolats de *N. neocaledoniensis* ont été correctement identifiés quel que soit le milieu. Concernant les 5 espèces non présentes dans la base de données V3 (*N. cerradoensis*, *N. altamirensis*, *N. puris*, *N. goodfellowi*, *N. arthritidis*), aucun isolat n'a pu être correctement identifié.

Concernant les erreurs d'identification, 7 % et 5 % des isolats ont été incorrectement identifiés à partir du milieu BCP et du milieu COS respectivement. Une souche de *N. nova* a été identifiée comme étant une *N. veterana* aussi bien à partir du milieu BCP que COS. Une souche de *N. abscessus* a été identifiée en tant que *N. veterana* et une seconde en tant que *N. beijingensis* à partir des milieux COS et BCP. Une souche de *N. veterana* a été identifiée comme une *N. cyriacigeorgica*. Une souche de *N. pseudobrasiliensis* a été identifiée comme un *Pseudomonas oryzihabitans* à partir du milieu BCP. Une souche de *N. asteroides* a été identifiée en tant que *N. neocaledoniensis* ceci à partir des deux milieux. Une deuxième souche de *N. asteroides* a été identifiée comme étant une *N. neocaledoniensis* sur BCP mais un résultat *N. asteroides* 50 %/*N. neocaledoniensis* 50 % a été obtenu à partir du milieu COS. Les 4 souches de *N. arthritidis* ont été mal identifiées, 3 l'ont été en tant que *N. abscessus* et la dernière en tant que *N. beijingensis* aussi bien sur milieu BCP que COS. Les deux souches de *N. cerradoensis* ont été identifiées en tant que *N. nova* 50 %/*N. africana* 50 % et l'unique souche de *N. altamirensis* en tant que *N. brasiliensis*, ceci à partir des deux milieux.

**Tableau 6 : Erreurs d'identification**

Espèces	Identification rendue par le Vitek MS	
	BCP	COS
<i>N. nova</i>	<i>N. veterana</i>	<i>N. veterana</i>
<i>N. abscessus</i>	<i>N. veterana</i>	<i>N. veterana</i>
<i>N. abscessus</i>	<i>N. beijingensis</i>	<i>N. beijingensis</i>
<i>N. veterana</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>	<i>N. cyriacigeorgica</i>
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	<i>N. pseudobrasiliensis</i>
<i>N. asteroides</i>	<i>N. neocaledoniensis</i>	<i>N. asteroides</i> 50 % / <i>N. neocaledoniensis</i> 50 %
<i>N. asteroides</i>	<i>N. wallacei</i>	no Id
<i>N. asteroides</i>	<i>N. neocaledoniensis</i>	<i>N. neocaledoniensis</i>
<i>N. arthritidis</i>	<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritidis</i>	<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritidis</i>	<i>N. abscessus</i>	<i>N. abscessus</i>
<i>N. arthritidis</i>	<i>N. beijingensis</i>	no Id
<i>N. cerradoensis</i>	<i>N. nova</i> 50 % / <i>N. africana</i> 50 %	<i>N. nova</i> 50 % / <i>N. africana</i> 50 %
<i>N. cerradoensis</i>	<i>N. nova</i> 50 % / <i>N. africana</i> 50 %	<i>N. nova</i> 50 % / <i>N. africana</i> 50 %
<i>N. altamirensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. brasiliensis</i>

\* espèce absente de la base de données V3

#### 4. Discussion

De nombreuses études ont déjà permis d'évaluer les performances du spectromètre de masse MALDI-ToF Microflex LT (Bruker) et de sa base de données BioTyper qui est régulièrement mise à jour pour l'identification des espèces du genre *Nocardia* (12,73,110,112–116,119,121–124). Jusqu'à présent, la plupart des auteurs ont constaté qu'une supplémentation de la base de données fournisseur était nécessaire pour obtenir des taux d'identification corrects bien que les études les plus récentes aient montré que les dernières mises à jour permettent d'obtenir des taux d'identification satisfaisants (119). A l'inverse, encore peu d'études ont permis l'évaluation des performances du Vitek MS (117,118,120), les espèces du genre *Nocardia* étant disponibles sur la base de données IVD du Vitek MS depuis peu.

Dans notre étude, la méthode du dépôt direct sur cible a été évaluée pour la première fois avec le Vitek MS. Bien que la base de données V3 ait été construite à l'aide de spectres générés à partir de colonies déposées directement sur cible (118), cette technique ne nous a pas permis d'obtenir de bon résultats et n'est donc pas fiable. Bien que les dernières études concernant le Microflex LT recommandent l'utilisation du dépôt direct avec extraction sur cible (119,122), nous ne pouvons pour le moment pas en dire autant en ce qui concerne le Vitek MS puisque cette technique n'a pas été évaluée avec cet appareil mais nous déconseillons néanmoins l'utilisation du dépôt direct seul.

En revanche, la méthode avec extraction a permis d'obtenir de bien meilleurs résultats, bien que la réalisation d'un second dépôt à partir du même extrait ou à partir d'une nouvelle extraction soit nécessaire dans 12 à 22 % des cas afin d'obtenir une identification. L'intérêt de la réalisation d'un second dépôt plus ou moins associé à une nouvelle extraction a déjà été montré notamment par Body *et al.* qui avait observé un taux de répétition de 11 % (116,120) et nos résultats vont également dans ce sens. En effet, environ 50 à 75 % des souches non identifiées lors du premier dépôt ont pu l'être grâce à ces analyses supplémentaires.

L'analyse des souches isolées sur l'année 2014, échantillon représentatif de l'épidémiologie française, a permis de montrer que le Vitek MS équipée de sa base de données V3 était un outil fiable pour l'identification des différentes espèces de *Nocardia* impliquées lors des infections humaines puisque 89 et 92 % des souches ont pu être correctement identifiées sur BCP et COS respectivement. Ces résultats sont très proches

de ceux de Body *et al.* pour qui avait obtenu une identification pour 280/312 (90 %) des isolats testés.

Pour les espèces de forte prévalence, qui représente 78 % des souches isolées en 2014, plus de 92 % des souches ont pu être correctement identifiées. Concernant le complexe *N. nova*, comme expliqué dans l'article de Girard *et al.* (117), les espèces *N. nova* et *N. africana* ne sont pour le moment pas différenciables par le Vitek MS et sont donc systématiquement associées à une identification sous forme d'un choix entre *N. nova* 50 % et *N. africana* 50 %. La taxonomie du genre *Nocardia* a beaucoup évolué ces dernières années, ainsi l'espèce *N. nova* forme actuellement un clade phylogénétique qui regroupe plusieurs espèces, notamment, *N. cerradoensis*, *N. kruczakiae*, *N. aobensis*, *N. mikamii* et *N. africana* (8,11). Bien que *N. africana* fasse partie de ces espèces proches phylogénétiquement de *N. nova*, aucun cas d'infection par cette espèce n'a été rapportée en France pour le moment. Il est donc conseillé de rendre une identification finale sous la forme « complexe *N. nova* » dans le cas où un choix entre *N. nova* 50 % et *N. africana* 50 % est proposé. Dans l'avenir, il serait donc intéressant d'inclure ces espèces dans la base de données du Vitek MS afin de pouvoir rendre des identifications plus précises au niveau de ce clade. Concernant *N. abscessus*, plus d'un quart des souches identifiées ne l'ont pas été dès le premier dépôt. La même constatation avait été faite au cours de l'étude de Body *et al.* (120). Ainsi pour cette espèce, l'intérêt de la réalisation d'un second dépôt et d'une nouvelle extraction si nécessaire est clairement montré. Ces données sont en partie explicables par le fait que parmi les 4 espèces de forte prévalence, un nombre de spectres très nettement inférieur aux 3 autres espèces a été généré pour la création de la base de données (30 spectres pour *N. abscessus* contre plus d'une centaine pour les 3 autres espèces) (118).

Concernant les espèces de prévalence intermédiaire, des taux d'identification très satisfaisants ont été obtenus puisque plus de 95 % des souches de l'année 2014 ont été correctement identifiées et 88 % sur la seconde collection qui comprend en plus grand nombre de souches pour ces espèces. Sur la seconde collection, l'espèce *N. veterana* présente des taux d'identification un peu moins bons (77 %) par rapport aux 3 autres espèces testées pour lesquelles plus de 90 % des isolats ont pu être correctement identifiés. Cependant, un nombre réduit de souches de *N. veterana* (5) avait été testé en 2014, la seconde collection permettant d'obtenir un meilleur reflet de la variabilité inter-souche pour cette espèce (13 souches testées). D'autre part, la réalisation d'un second dépôt plus

ou moins associé à une nouvelle extraction a cependant été nécessaire dans environ 17 % des cas afin obtenir une identification.

Concernant les espèces de faible prévalence, les taux d'identification sont nettement inférieurs à ceux observés pour les espèces précédentes quel que soit la collection. Cependant il est nécessaire de distinguer les espèces présentes des espèces absentes de la base de données. Ainsi, concernant les 5 espèces présentes dans la base de données (*N. asteroides*, *N. beijingensis*, *N. paucivorans*, *N. pseudobrasiliensis*, *N. neocaledoniensis*), 28/35 souches (80 %) testées sur la seconde collection à partir du milieu COS ont pu être correctement identifiées bien qu'un second dépôt plus ou moins associé à une nouvelle extraction ait été nécessaire pour 8 souches (23 %). En revanche, seulement 23/35 (66 %) souches ont été correctement identifiées à partir du milieu BCP dont 11 (31 %) souches ayant nécessité un second dépôt plus ou moins associé à une nouvelle extraction. Ces plus faibles taux d'identification sont comme pour *N. abscessus* en partie explicables par le fait que pour ces espèces, un nombre moindre de spectres a été généré pour la création de la base de données. Sur les 3 isolats de *N. asteroides sensu stricto*, des erreurs d'identification se sont produites avec une identification en tant que *N. neocaledoniensis* pour 2 isolats. Des erreurs d'identification similaires avaient été observées par Body *et al.* avec 3/19 isolats de *N. asteroides sensu stricto* identifiés en tant que *N. neocaledoniensis*. Concernant la souche de *N. pseudobrasiliensis* identifiée en tant que *Pseudomonas oryzihabitans* sur le milieu BCP, une réextraction de la souche avait permis d'obtenir la bonne identification, ainsi l'hypothèse d'une contamination est probable bien que cela n'ait pas pu être vérifié. En ce qui concerne les 14 isolats des 5 espèces absentes de la base de données V3 (*N. altamirensis*, *N. arthritidis*, *N. cerradoensis*, *N. goodfellowi*, *N. puris*), aucun d'entre eux n'a pu être correctement identifié, cependant pour 7 d'entre eux, une identification a été rendue par l'analyseur. Ainsi, 3/4 isolats de *N. arthritidis* ont été identifiés en tant que *N. abscessus* et le dernier isolat en tant que *N. beijingensis*. Les 2 isolats de *N. cerradoensis* ont été identifiés en tant que *N. nova* 50 % / *N. africana* 50 % par l'analyseur et l'unique isolat de *N. altamirensis* a été identifié en tant que *N. brasiliensis*. Bien que ces identifications soient erronées, elles ne sont pas totalement aberrantes au vu des dernières données taxonomiques (2,8) et des erreurs d'identification similaires avaient été observées par Body *et al.*. En effet, comme vu précédemment, *N. cerradoensis* fait partie d'un clade phylogénétique comprenant entre autres *N. nova*, l'ensemble de ces espèces faisant donc partie du complexe *N. nova*. De la même manière,

le complexe *N. abscessus* comprend différentes espèces, notamment *N. abscessus*, *N. arthritidis*, *N. asiatica* et *N. beijingensis* (2,8). Body *et al.* avaient également observé plusieurs erreurs d'identification concernant ce complexe avec un isolat de *N. asiatica* et un isolat de *N. beijingensis* identifiés en tant que *N. abscessus*, 2 isolats de *N. asiatica* et 1 isolat de *N. arthritidis* identifiés en tant que *N. beijingensis* et 1 isolat de *N. asiatica* identifié en tant que *N. abscessus/ N. beijingensis* (120). Ainsi, de la même manière que pour le complexe *N. nova*, il serait plus raisonnable de rendre une identification en tant que « complexe *N. abscessus* » lorsque le Vitek MS rend comme résultat d'identification *N. abscessus*, *N. asiatica*, *N. arthritidis* ou *N. beijingensis*. Concernant *N. altamirensis*, il s'agit également d'une espèce très proche de *N. brasiliensis*. Bien que les différentes espèces du complexe *N. nova* présentent des profils de sensibilité aux antibiotiques très similaires, il n'en est pas de même pour *N. abscessus*, *N. asiatica*, *N. arthritidis* et *N. beijingensis* qui présentent des profils de sensibilité différents les uns des autres (10). Ces données rappellent donc que la réalisation d'un antibiogramme est indispensable étant donnée l'hétérogénéité des profils de résistance des différentes espèces du genre *Nocardia*. Elles soulignent également de nouveau l'intérêt de la supplémentation de la base de données avec des isolats d'espèces de faible prévalence. Bien que ces erreurs d'identification soient gênantes, il est important de rappeler que le séquençage partiel du gène de l'ARNr16 est lui aussi le plus souvent insuffisamment discriminant pour pouvoir différencier les différentes espèces de ces complexes (125). En revanche, certaines erreurs d'identification n'ont pas pu être expliquées, elles concernent un isolat de *N. abscessus* identifié en tant que *N. veterana*, un isolat de *N. veterana* identifié en tant que *N. cyriacigeorgica* et un isolat de *N. nova* identifié en tant que *N. veterana*.

L'impact du milieu de culture et de sa durée d'incubation sur la qualité des spectres a déjà été exploré au cours de différentes études (110,120,122) cependant les résultats sont contradictoires. En effet, pour Body *et al.*, des résultats d'identification identiques ont été obtenus quel que soit la durée d'incubation et le milieu utilisé. En revanche pour Khot *et al.* et pour McTaggart *et al.*, le temps d'incubation semble clairement avoir un impact sur la qualité des spectres puisque de meilleurs résultats sont obtenus en analysant des colonies les plus jeunes possibles. Pour McTaggart *et al.*, le type de milieu de culture utilisé a également un impact indirect puisque des milieux riches tel que le milieu COS permettent une pousse plus rapide et plus abondante qui permet d'obtenir des spectres d'une meilleure qualité. Nos résultats vont également dans ce sens puisque les taux

d'identification obtenus lors du premier dépôt sont plus faibles avec le milieu BCP, cependant, les taux d'identification totaux cumulés avec le milieu COS ou BCP sont presque identiques. Ainsi, l'emploi d'un milieu riche tel que le milieu COS permettrait d'obtenir une identification plus facilement qu'avec un milieu plus pauvre tel que le milieu BCP, du fait d'une pousse plus rapide et abondante. De plus, le milieu BCP n'a pas été employé lors de la création de la base de données.

Bien que notre étude ait été réalisée sur un nombre de souches important, quelques limitations sont à souligner. En ce qui concerne les espèces de faibles prévalences, le nombre limité de souches analysées ne permet pas d'avoir une vision représentative de la diversité intra-espèce et des performances de l'analyseur pour ces espèces. Il serait donc souhaitable de pouvoir analyser un plus grand nombre de souches peu fréquentes pour avoir un meilleur aperçu des taux d'identification pour ces isolats. L'impact du temps d'incubation n'a pas été étudié et toutes les souches testées l'ont été au bout de 72 heures de culture or, le temps d'incubation pourrait avoir un impact sur les taux d'identification.

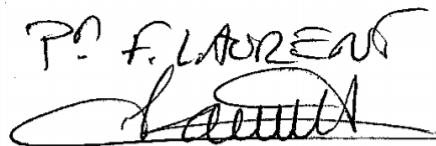
## CONCLUSIONS

MÉMOIRE SOUTENU PAR M. Thibaut DURAND

L'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-ToF, une technique d'identification fréquemment utilisée sein des laboratoires de bactériologie clinique de nos jours, est maintenant largement démontré. Cependant, encore très peu d'études ont permis l'évaluation des performances du spectromètre de masse MALDI-ToF Vitek MS<sup>®</sup> (bioMérieux) pour l'identification des espèces du genre *Nocardia*. En effet, la mise à jour de sa base de données (version V3) qui a été effectuée il y a moins d'un an comprend maintenant 15 espèces différentes de *Nocardia*. C'est dans ce cadre que nous avons voulu évaluer les performances de cette nouvelle base de données V3. Pour cela, nous avons analysé un échantillon représentatif de l'épidémiologie française en constituant une première collection correspondant à l'ensemble des isolats cliniques reçu par l'OFN en 2014. Nous avons ensuite analysé une seconde collection comprenant 18 espèces différentes afin d'avoir un plus grand nombre de souches d'espèces de moyenne et faible prévalence. Deux milieux de culture différents (BCP et gélose au sang COS) et deux méthodes de dépôt de l'échantillon (dépôt direct et dépôt d'un extrait) ont également été testés. Nous avons ainsi pu montrer que le système Vitek MS équipé de sa base de données V3 se révélait être un outil efficace et intéressant pour l'identification des espèces de *Nocardia* les plus fréquemment impliquées en pathologie humaine. En effet, pour les espèces de forte prévalence (*N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. nova*, *N. abscessus*), 70 % et 84 % des isolats ont été correctement identifiés lors du premier dépôt de l'extrait, à partir des milieux BCP et COS respectivement. Lorsqu'un second dépôt du même extrait plus ou moins associé à un troisième dépôt à partir d'un nouvel extrait est réalisé, le total cumulé d'identification atteint plus de 92 % pour ces isolats quel que soit le milieu. Cependant, les espèces appartenant aux complexes *N. nova* et *N. abscessus* sont parfois difficilement différenciables. Les espèces de prévalence intermédiaire sont dans

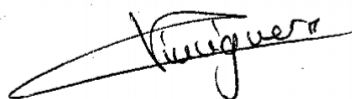
l'ensemble très bien identifiées. Des taux d'identification moins satisfaisants ont été obtenus avec les espèces de faible prévalence cependant un certain nombre d'entre elles ne sont actuellement pas comprises dans la base de données. Concernant l'influence du milieu de culture, l'utilisation d'un milieu riche tel que la gélose au sang est préférable à l'utilisation d'un milieu plus pauvre tel que la gélose BCP. La réalisation d'une étape d'extraction demeure indispensable afin d'obtenir des résultats fiables. En effet, le dépôt direct des colonies sur la cible n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants puisque dans le meilleur des cas moins de 15 % des isolats ont pu être correctement identifiés. Il est également important de procéder à un second dépôt puis à une seconde extraction en cas d'échec d'identification lors du premier dépôt, ceci ayant permis d'identifier 73 % (première collection) et 53 % (deuxième collection) des isolats qui ne l'avaient pas été lors du premier dépôt. Au final, la spectrométrie de masse MALDI-ToF semble être un outil intéressant pour l'identification des bactéries du genre *Nocardia* au niveau de l'espèce ou du complexe d'espèce cependant son utilisation en première intention paraît encore peu envisageable pour les laboratoires de routine. Ainsi, le rendu de telles identifications nous semble encore être du ressort de laboratoires de référence. Elle pourrait cependant permettre à ces derniers de rendre au minimum une identification au niveau du genre voire une identification au niveau de l'espèce en fonction du résultat rendu par l'analyseur. L'inclusion de nouvelles espèces dans la base de données par le fournisseur permettra très certainement de résoudre un certain nombre de problèmes, en particulier en ce qui concerne les espèces rares et celles appartenant à des complexes d'espèces, permettant peut-être alors son utilisation raisonnable en routine.

**Le Président du Jury,  
(Nom et Signature)**

P. F. LAURENT  


**VU ET PERMIS D'IMPRIMER**  
Lyon, le 6 décembre 2018

**Vu, La Directrice de l'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon  
Pour le Président de l'Université Claude Bernard  
Professeure Christine VINCIGUERRA**





## BIBLIOGRAPHIE

1. Hamid ME. Epidemiology, pathology, immunology and diagnosis of bovine farcy: A review. *Prev Vet Med.* juin 2012;105(1-2):1-9.
2. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. Kraft CS, éditeur. *J Clin Microbiol.* 8 nov 2017;56(1):e01419-17.
3. Fatahi-Bafghi M. Nocardiosis from 1888 to 2017. *Microb Pathog.* janv 2018;114:369-84.
4. Wallace RJ, Steele LC, Sumter G, Smith JM. Antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1988;32(12):1776–1779.
5. Gilquin JM, Riviere B, Jurado V, Audouy B, Kouatche J-B, Bergeron E, et al. First Case of Actinomycetoma in France Due to a Novel *Nocardia* Species, *Nocardia boironii* sp. nov. *mSphere* [Internet]. 23 nov 2016 [cité 10 juin 2018];1(6).
6. Huang J-R, Ming H, Duan Y-Y, Li S, Zhang L-Y, Ji W-L, et al. *Nocardia heshunensis* sp. nov., an actinomycete isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 sept 2017;67(9):3467-73.
7. Ding P, Bai J-L, Wang T-T, Sun Y, Cao C-L, Jiang J-H, et al. *Nocardia rhizosphaerihabitans* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a coastal soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 janv 2018;68(1):192-7.
8. Tamura T, Ohji S, Ichikawa N, Hosoyama A, Yamazoe A, Hamada M, et al. Reclassification of *Nocardia* species based on whole genome sequence and associated phenotypic data. *J Antibiot (Tokyo).* juill 2018;71(7):633-41.
9. Goodfellow M, Orchard VA. Antibiotic Sensitivity of Some Nocardioform Bacteria and its Value as a Criterion for Taxonomy. *J Gen Microbiol.* 1 août 1974;83(2):375-87.
10. McTaggart LR, Doucet J, Witkowska M, Richardson SE. Antimicrobial Susceptibility among Clinical *Nocardia* Species Identified by Multilocus Sequence Analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2015;59(1):269-75.
11. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and Identification of *Nocardia* Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *J Clin Microbiol.* déc 2010;48(12):4525-33.
12. Xiao M, Pang L, Chen SC-A, Fan X, Zhang L, Li H-X, et al. Accurate Identification of Common Pathogenic *Nocardia* Species: Evaluation of a Multilocus Sequence Analysis Platform and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. Woo PC, éditeur. *PLOS ONE.* 25 janv 2016;11(1):e0147487.

13. Liu WL, Lai CC, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YL, et al. Clinical and microbiological characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study from 1998 to 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. nov 2011;30(11):1341-7.
14. Rodriguez-Nava V, Khan ZU, Potter G, Kroppenstedt RM, Boiron P, Laurent F. *Nocardia coubleae* sp. nov., isolated from oil-contaminated Kuwaiti soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 juill 2007;57(7):1482-6.
15. Yang R, Liu G, Chen T, Li S, An L, Zhang G, et al. Characterization of the genome of a *Nocardia* strain isolated from soils in the Qinghai-Tibetan Plateau that specifically degrades crude oil and of this biodegradation. *Genomics* [Internet]. févr 2018 [cité 21 juill 2018].
16. Zhao P, Xue Y, Gao W, Li J, Zu X, Fu D, et al. Actinobacteria –Derived peptide antibiotics since 2000. *Peptides*. mai 2018;103:48-59.
17. Dong J-F. Ristocetin-dependent, but not botrocetin-dependent, binding of von Willebrand factor to the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex correlates with shear-dependent interactions. *Blood*. 1 janv 2001;97(1):162-8.
18. Lebeaux D, Bergeron E, Berthet J, Djadi-Prat J, Mouniée D, Boiron P, et al. Antibiotic susceptibility testing and species identification of *Nocardia* isolates: a retrospective analysis of data from a French expert laboratory, 2010–2015. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. juin 2018 [cité 8 nov 2018].
19. Rodriguez-Nava V, Lebeaux D, Lortholary O, Boiron P. NOCARDIA ET ACTINOMYCÈTES AÉROBIES N° 75 APPARENTÉS. 2017;20.
20. Schlager R, Fisher MA, Hanson KE. Susceptibility Profiles of *Nocardia* Isolates Based on Current Taxonomy. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2014;58(2):795-800.
21. Uhde KB, Pathak S, McCullum Jr I, Jannat-Khah DP, Shadomy SV, Dykewicz CA, et al. Antimicrobial-Resistant *Nocardia* Isolates, United States, 1995–2004. *Clin Infect Dis*. 15 déc 2010;51(12):1445-8.
22. Tremblay J, Thibert L, Alarie I, Valiquette L, Pépin J. Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988–2008. *Clin Microbiol Infect*. mai 2011;17(5):690-6.
23. Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, et al. Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 20 déc 2016;dkw489.
24. Minero MV, Marín M, Cercenado E, Rabadán PM, Bouza E, Muñoz P. Nocardiosis at the Turn of the Century: *Medicine (Baltimore)*. juill 2009;88(4):250-61.
25. Mazzaferri F, Cordioli M, Segato E, Adami I, Maccacaro L, Sette P, et al. *Nocardia* infection over 5 years (2011-2015) in an Italian tertiary care hospital. 2017;5.

26. Wei M, Wang P, Qu J, Li R, Liu Y, Gu L, et al. Identification and antimicrobial susceptibility of clinical *Nocardia* species in a tertiary hospital in China. *J Glob Antimicrob Resist*. déc 2017;11:183-7.
27. Tan C-K, Lai C-C, Lin S-H, Liao C-H, Chou C-H, Hsu H-L, et al. Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998–2008. *Clin Microbiol Infect*. juill 2010;16(7):966-72.
28. Kosova-Maali D, Bergeron E, Maali Y, Durand T, Gonzalez J, Mounié D, et al. High Intraspecific Genetic Diversity of *Nocardia brasiliensis*, a Pathogen Responsible for Cutaneous Nocardiosis Found in France: Phylogenetic Relationships by Using *sod* and *hsp65* Genes. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1-10.
29. Jiang Y, Huang A, Fang Q. Disseminated nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum* in an immunocompetent host: A case report and literature review. *Exp Ther Med*. nov 2016;12(5):3339-46.
30. Majeed A, Beatty N, Iftikhar A, Mushtaq A, Fisher J, Gaynor P, et al. A 20-year experience with nocardiosis in solid organ transplant (SOT) recipients in the Southwestern United States: A single-center study. *Transpl Infect Dis*. 9 mai 2018;e12904.
31. Hemmersbach-Miller M, Stout JE, Woodworth MH, Cox GM, Saullo JL. *Nocardia* infections in the transplanted host. *Transpl Infect Dis*. 7 mai 2018;e12902.
32. Haussaire D, Fournier P-E, Djiguiba K, Moal V, Legris T, Purgus R, et al. Nocardiosis in the south of France over a 10-years period, 2004–2014. *Int J Infect Dis*. avr 2017;57:13-20.
33. Le Coustumier EM, Denes E, Martin C, Weinbreck P. Nocardiose : analyse rétrospective d’une série de 19 cas. *Rev Médecine Interne*. févr 2017;38(2):81-9.
34. Paige EK, Spelman D. NOCARDIOSIS: 7-YEAR experience at an australian tertiary hospital: Nocardiosis in Melbourne, Australia. *Intern Med J [Internet]*. 8 août 2018 [cité 14 août 2018].
35. Eschle-Meniconi ME, Guex-Crosier Y, Wolfensberger TJ. Endogenous Ocular Nocardiosis—An Interventional Case Report With a Review of the Literature. *Surv Ophthalmol*. sept 2011;56(5):383-415.
36. Kurahara Y, Tachibana K, Tsuyuguchi K, Akira M, Suzuki K, Hayashi S. Pulmonary nocardiosis: A clinical analysis of 59 cases. *Respir Investig*. mai 2014;52(3):160-6.
37. Hémar V, Danjean M-P, Imbert Y, Rispal P. Retrospective analysis of nocardiosis in a general hospital from 1998 to 2017. *Médecine Mal Infect*. déc 2018;48(8):516-25.
38. Vuotto F, Faure K, Queyre V, Dessein R, Pasquet A, Lambert M, et al. Vascular nosocomial *Nocardia farcinica* infection after arterial stenting in an immunocompetent patient. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2011;22(1):e10-1.

39. Mrozek N, Hamizi S, Gourdon F, Laurichesse H, Beytout J, Lesens O. Nocardiose disséminée nosocomiale probable après chirurgie prothétique ostéoarticulaire chez un patient immunocompétent. *Rev Médecine Interne*. déc 2008;29(12):1034-7.
40. Munoz J, Mirelis B, Aragon LM, Gutierrez N, Sanchez F, Espanol M, et al. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997-2003. *J Med Microbiol*. 1 avr 2007;56(4):545-50.
41. Ambrosioni J, Lew D, Garbino J. Nocardiosis: Updated Clinical Review and Experience at a Tertiary Center. *Infection*. avr 2010;38(2):89-97.
42. Steinbrink J, Leavens J, Kauffman CA, Miceli MH. Manifestations and outcomes of nocardia infections: Comparison of immunocompromised and nonimmunocompromised adult patients. *Medicine (Baltimore)*. oct 2018;97(40):e12436.
43. Martínez R, Reyes S, Menéndez R. Pulmonary nocardiosis: risk factors, clinical features, diagnosis and prognosis: *Curr Opin Pulm Med*. mai 2008;14(3):219-27.
44. Woodworth MH, Saullo JL, Lantos PM, Cox GM, Stout JE. Increasing *Nocardia* Incidence Associated with Bronchiectasis at a Tertiary Care Center. *Ann Am Thorac Soc*. mars 2017;14(3):347-54.
45. Rodriguez-Nava V, Durupt S, Chyderiotis S, Freydière A-M, Karsenty J, de Montclos M, et al. A French multicentric study and review of pulmonary *Nocardia* spp. in cystic fibrosis patients. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. août 2015;204(4):493-504.
46. Dagan A, Keller N, Vilozni D, Ramon-Saraf R, Bar B-E, Sarouk I, et al. *Nocardia* Colonization: A Risk Factor for Lung Deterioration in Cystic Fibrosis Patients? *Med Sci Monit*. 2015;21:1889-94.
47. Anagnostou T, Arvanitis M, Kourkoumpetis TK, Desalermos A, Carneiro HA, Mylonakis E. Nocardiosis of the Central Nervous System. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2 janv 2014 [cité 9 nov 2018];93(1).
48. Rafiei N, Peri AM, Righi E, Harris P, Paterson DL. Central nervous system nocardiosis in Queensland. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 18 nov 2016 [cité 9 nov 2018];95(46).
49. Chaudhari DM, Renjen PN, Sardana R, Butta H. *Nocardia Farcinica* Brain Abscess in an Immunocompetent Old Patient: A Case Report and Review of Literature. *Ann Indian Acad Neurol*. 2017;20(4):399-402.
50. Kim S, Lee KL, Lee DM, Jeong JH, Moon SM, Seo Y-H, et al. *Nocardia* Brain Abscess in an Immunocompetent Patient. *Infect Chemother*. mars 2014;46(1):45-9.
51. Arrache D, Zait H, Rodriguez-Nava V, Bergeron E, Durand T, Yahiaoui M, et al. Nocardiose cérébrale et pulmonaire à *Nocardia abscessus* chez un patient algérien immunocompétent. *J Mycol Médicale*. sept 2018;28(3):531-7.

52. Yang M, Xu M, Wei W, Gao H, Zhang X, Zhao H, et al. Clinical findings of 40 patients with nocardiosis: A retrospective analysis in a tertiary hospital. *Exp Ther Med.* juill 2014;8(1):25-30.
53. Rosman Y, Grossman E, Keller N, Thaler M, Eviatar T, Hoffman C, et al. Nocardiosis: A 15-year experience in a tertiary medical center in Israel. *Eur J Intern Med.* sept 2013;24(6):552-7.
54. Dodiuk-Gad R, Cohen E, Ziv M, Goldstein LH, Chazan B, Shafer J, et al. Cutaneous nocardiosis: report of two cases and review of the literature: Cutaneous nocardiosis. *Int J Dermatol.* déc 2010;49(12):1380-5.
55. Chen B, Tang J, Lu Z, Wang N, Gao X, Wang F. Primary Cutaneous Nocardiosis in a Patient With Nephrotic Syndrome. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 22 janv 2016 [cité 8 nov 2018];95(3).
56. Kim MS, Choi H, Choi KC, Shin BS. Primary cutaneous nocardiosis due to *Nocardia vinacea*: first case in an immunocompetent patient: Correspondence. *Clin Exp Dermatol.* oct 2011;36(7):812-4.
57. Derancourt C, Theodose R, Deschamps L, Liautaud B, Briand E, Derancourt S, et al. Primary cutaneous nocardiosis caused by *Nocardia beijingensis*: Correspondence. *Br J Dermatol.* juill 2012;167(1):216-8.
58. Lasker BA, Bell M, Klenk H-P, Spröer C, Schumann P, Brown JM. *Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America. *Antonie Van Leeuwenhoek.* sept 2014;106(3):543-53.
59. Bosamiya SS, Vaishnani JB, Momin AM. Sporotrichoid nocardiosis with cutaneous dissemination. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 7 janv 2011;77(4):535.
60. Verma P, Jha A. Mycetoma: reviewing a neglected disease. *Clin Exp Dermatol* [Internet]. [cité 12 nov 2018];0(0).
61. Sampaio FMS, Wanke B, Freitas DFS, Coelho JMC de O, Galhardo MCG, Lyra MR, et al. Review of 21 cases of mycetoma from 1991 to 2014 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 13 févr 2017 [cité 12 nov 2018];11(2).
62. Mishra SK, Gordon RE, Barnett DA. Identification of nocardiae and streptomycetes of medical importance. *J Clin Microbiol.* juin 1980;11(6):728-36.
63. Conville PS, Fischer SH, Cartwright CP, Witebsky FG. Identification of *Nocardia* Species by Restriction Endonuclease Analysis of an Amplified Portion of the 16S rRNA Gene. *J CLIN MICROBIOL.* 2000;38:7.
64. Laurent FJ, Provost F, Boiron P. Rapid Identification of Clinically Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16S rRNA Gene PCR. *J CLIN MICROBIOL.* :4.
65. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Sáez-Nieto JA. *gyrB* Analysis as a Tool for Identifying *Nocardia* Species and Exploring Their Phylogeny. *J Clin Microbiol.* mars 2015;53(3):997-1001.

66. Conville PS, Zelazny AM, Witebsky FG. Analysis of *secA1* Gene Sequences for Identification of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol.* 1 août 2006;44(8):2760-6.
67. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Villalón P, Medina-Pascual MJ, Sáez-Nieto JA. Identification, Typing, and Phylogenetic Relationships of the Main Clinical *Nocardia* Species in Spain According to Their *gyrB* and *rpoB* Genes. *J Clin Microbiol.* nov 2013;51(11):3602-8.
68. Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois J-P, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-Restriction Enzyme Pattern Analysis and Sequencing Database for *hsp65* Gene-Based Identification of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2006;44(2):536-46.
69. Sánchez-Herrera K, Sandoval H, Mouniee D, Ramírez-Durán N, Bergeron E, Boiron P, et al. Molecular identification of *Nocardia* species using the *sod A* gene. *New Microbes New Infect.* sept 2017;19:96-116.
70. Roth A, Andrees S, Kroppenstedt RM, Harmsen D, Mauch H. Phylogeny of the Genus *Nocardia* Based on Reassessed 16S rRNA Gene Sequences Reveals Underspeciation and Division of Strains Classified as *Nocardia asteroides* into Three Established Species and Two Unnamed Taxons. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2003;41(2):851-6.
71. Cloud JL, Conville PS, Croft A, Harmsen D, Witebsky FG, Carroll KC. Evaluation of Partial 16S Ribosomal DNA Sequencing for Identification of *Nocardia* Species by Using the MicroSeq 500 System with an Expanded Database. *J Clin Microbiol.* 1 févr 2004;42(2):578-84.
72. Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, et al. Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol.* sept 2005;3(9):733-9.
73. Carrasco G, de Dios Caballero J, Garrido N, Valdezate S, Cantón R, Sáez-Nieto JA. Shortcomings of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter in the Identification of *Nocardia* Species. *Front Microbiol* [Internet]. 21 avr 2016 [cité 27 mars 2017];7.
74. Salinas-Carmona MC. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serological Diagnosis of *Nocardia brasiliensis* and Clinical Correlation with Mycetoma Infections. *J CLIN MICROBIOL.* 1993;31:6.
75. Salinas-Carmona MC. Anticuerpos Anti-*Nocardia brasiliensis* en pacientes con actinomicetoma y su utilidad clínica. 2001;137(1):9.
76. Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace RJ, Witebsky FG, Koziol D, Hall GS, et al. Multisite Reproducibility of the Broth Microdilution Method for Susceptibility Testing of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol.* 1 avr 2012;50(4):1270-80.
77. Lowman W, Aithma N. Antimicrobial Susceptibility Testing and Profiling of *Nocardia* Species and Other Aerobic Actinomycetes from South Africa: Comparative Evaluation of Broth Microdilution versus the Etest. *J Clin Microbiol.* déc 2010;48(12):4534-40.

78. Brown-Elliott BA, Wallace RJ. *In Vitro* Susceptibility Testing of Tedizolid against Isolates of *Nocardia*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. déc 2017 [cité 13 nov 2018];61(12).
79. Mootsikapun P, Intarapoka B, Liawnoraset W. Nocardiosis in Srinagarind Hospital, Thailand: review of 70 cases from 1996–2001. *Int J Infect Dis*. mai 2005;9(3):154-8.
80. De La Cruz O, Minces LR, Silveira FP. Experience with linezolid for the treatment of nocardiosis in organ transplant recipients. *J Infect*. janv 2015;70(1):44-51.
81. Lebeaux D, Freund R, van Delden C, Guillot H, Marbus SD, Matignon M, et al. Outcome and Treatment of Nocardiosis After Solid Organ Transplantation: New Insights From a European Study. *Clin Infect Dis*. 15 mai 2017;64(10):1396-405.
82. Coussement J, Lebeaux D, Rouzaud C, Lortholary O. *Nocardia* infections in solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients: *Curr Opin Infect Dis*. déc 2017;30(6):545-51.
83. Anagnostou T, Arvanitis M, Kourkoumpetis TK, Desalermos A, Carneiro HA, Mylonakis E. Nocardiosis of the Central Nervous System: Experience From a General Hospital and Review of 84 Cases From the Literature. *Medicine (Baltimore)*. janv 2014;93(1):19-32.
84. Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo M-C, Bekal S, Lefebvre B, et al. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. Chaturvedi V, éditeur. *PLOS ONE*. 10 déc 2015;10(12):e0144878.
85. Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. Optimization of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Analysis for Bacterial Identification. *J Clin Microbiol*. déc 2012;50(12):3845-52.
86. Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Direct Colony Method versus Extraction Method for Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry ▽. *J Clin Microbiol*. août 2011;49(8):2868-73.
87. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1 juill 2013;26(3):547-603.
88. Marvin LF, Roberts MA, Fay LB. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*. nov 2003;337(1-2):11-21.
89. Krishnamurthy T, Rajamani U, Ross PL. Detection of Pathogenic and Non-pathogenic Bacteria by Matrix-assisted Laser Desorption/ Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 10 juin 1996;10(8):883-8.
90. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. Rapid Identification of Intact Whole Bacteria Based on Spectral Patterns using

- Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization with Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 31 juill 1996;10(10):1227-32.
91. Wunschel SC, Jarman KH, Petersen CE, Valentine NB, Wahl KL, Schauki D, et al. Bacterial analysis by MALDI-TOF mass spectrometry: An inter-laboratory comparison. *J Am Soc Mass Spectrom.* avr 2005;16(4):456-62.
  92. Wang Z, Russon L, Li L, Roser DC, Long SR. Investigation of spectral reproducibility in direct analysis of bacteria proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 30 avr 1998;12(8):456-64.
  93. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P, 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.* 15 août 2009;49(4):543-51.
  94. Sogawa K, Watanabe M, Sato K, Segawa S, Miyabe A, Murata S, et al. Rapid identification of microorganisms by mass spectrometry: improved performance by incorporation of in-house spectral data into a commercial database. *Anal Bioanal Chem.* juin 2012;403(7):1811-22.
  95. Mesureur J, Arend S, Cellière B, Courault P, Cotte-Pattat P-J, Totty H, et al. A MALDI-TOF MS database with broad genus coverage for species-level identification of *Brucella*. *Munoz-Zanzi C, éditeur. PLoS Negl Trop Dis.* 18 oct 2018;12(10):e0006874.
  96. Suarez S, Nassif X, Ferroni A. Applications de la technologie MALDI-TOF en microbiologie clinique. *Pathol Biol.* févr 2015;63(1):43-52.
  97. Rychert J, Burnham C-AD, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, Jennemann R, et al. Multicenter Evaluation of the Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Gram-Positive Aerobic Bacteria. *J Clin Microbiol.* 1 juill 2013;51(7):2225-31.
  98. Hettick JM, Kashon ML, Simpson JP, Siegel PD, Mazurek GH, Weissman DN. Proteomic Profiling of Intact Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal Chem.* oct 2004;76(19):5769-76.
  99. Hettick JM, Kashon ML, Slaven JE, Ma Y, Simpson JP, Siegel PD, et al. Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: A combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis. *PROTEOMICS.* déc 2006;6(24):6416-25.
  100. Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of Mycobacteria in Solid-Culture Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 1 mai 2011;49(5):1790-4.
  101. Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Media by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of

- Flight Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *J Clin Microbiol.* 1 sept 2013;51(9):2875-9.
102. El Khéchine A, Couderc C, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Identification of Mycobacteria in Routine Clinical Practice. Heimesaat MM, éditeur. *PLoS ONE.* 13 sept 2011;6(9):e24720.
  103. Dunne WM, Doing K, Miller E, Miller E, Moreno E, Baghli M, et al. Rapid Inactivation of Mycobacterium and Nocardia Species before Identification Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 1 oct 2014;52(10):3654-9.
  104. Wilen CB, McMullen AR, Burnham C-AD. Comparison of Sample Preparation Methods, Instrumentation Platforms, and Contemporary Commercial Databases for Identification of Clinically Relevant Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol.* juill 2015;53(7):2308-15.
  105. Machen A, Kobayashi M, Connelly MR, Wang YF. Comparison of Heat Inactivation and Cell Disruption Protocols for Identification of Mycobacteria from Solid Culture Media by Use of Vitek Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 1 déc 2013;51(12):4226-9.
  106. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Mycobacteria Using Simplified Protein Extraction Protocols. *J Clin Microbiol.* janv 2014;52(1):130-8.
  107. O'Connor JA, Lynch-Healy M, Corcoran D, O'Reilly B, O'Mahony J, Lucey B. Improved Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)-Based Identification of Mycobacterium spp. by Use of a Novel Two-Step Cell Disruption Preparatory Technique. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol.* févr 2016;54(2):495-6.
  108. Adams LL, Dionne K, Fisher S, Parrish N. A rapid, standardized protein extraction method using adaptive focused acoustics for identification of mycobacteria by MALDI-ToF MS. *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2016;86(3):284-8.
  109. Moreno E, Miller E, Miller E, Totty H, Deol P. A novel liquid media mycobacteria extraction method for MALDI-TOF MS identification using VITEK® MS. *J Microbiol Methods.* janv 2018;144:128-33.
  110. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nocardia Species. *J Clin Microbiol.* 1 nov 2010;48(11):4015-21.
  111. van Veen SQ, 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.* mars 2010;48(3):900-7.
112. Farfour E, Leto J, Barritault M, Barberis C, Meyer J, Dauphin B, et al. Evaluation of the Andromas matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of aerobically growing Gram-positive bacilli. *J Clin Microbiol.* août 2012;50(8):2702-7.
  113. Paściak M, Dacko W, Sikora J, Gurlaga D, Pawlik K, Miękisiak G, et al. Creation of an In-House Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Corynebacterineae Database Overcomes Difficulties in Identification of *Nocardia farcinica* Clinical Isolates. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol.* août 2015;53(8):2611-21.
  114. Khot PD, Bird BA, Durrant RJ, Fisher MA. Identification of *Nocardia* Species by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol.* oct 2015;53(10):3366-9.
  115. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, et al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Mycobacterium* species, *Nocardia* species, and Other Aerobic Actinomycetes. Forbes BA, éditeur. *J Clin Microbiol.* févr 2016;54(2):376-84.
  116. Blosser SJ, Drake SK, Andrasko JL, Henderson CM, Kamboj K, Antonara S, et al. Multicenter Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Study for Identification of Clinically Relevant *Nocardia* spp. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol.* mai 2016;54(5):1251-8.
  117. Girard V, Mailler S, Welker M, Arsac M, Cellière B, Cotte-Pattat P-J, et al. Identification of *mycobacterium* spp. and *nocardia* spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagn Microbiol Infect Dis.* nov 2016;86(3):277-83.
  118. Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, et al. Routine identification of *Nocardia* species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis.* janv 2017;87(1):7-10.
  119. Yarbrough ML, Lainhart W, Burnham C-AD. Identification of *Nocardia*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper. *Diagn Microbiol Infect Dis.* oct 2017;89(2):92-7.
  120. Body BA, Beard MA, Slechta ES, Hanson KE, Barker AP, Babady NE, et al. Evaluation of the Vitek MS v3.0 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Mycobacterium* and *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol.* 2018;56(6):12.
  121. Marín M, Ruiz A, Iglesias C, Quiroga L, Cercenado E, Martín-Rabadán P, et al. Identification of *Nocardia* species from clinical isolates using MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. juin 2018 [cité 25 juill 2018].

122. McTaggart LR, Chen Y, Poopalarajah R, Kus JV. Incubation time and culture media impact success of identification of *Nocardia* spp. by MALDI-ToF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. juin 2018 [cité 14 août 2018].
123. Hsueh P-R, Lee T-F, Du S-H, Teng S-H, Liao C-H, Sheng W-H, et al. Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* Species. *J Clin Microbiol*. juill 2014;52(7):2371-9.
124. Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, et al. Identification of *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass spectrometry. *Clin Proteomics* [Internet]. déc 2015 [cité 22 mars 2017];12(1).
125. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and Identification. Kraft CS, éditeur. *J Clin Microbiol* [Internet]. 8 nov 2017 [cité 15 oct 2018];56(1).
126. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. *Mayo Clin Proc*. avr 2012;87(4):403-7.
127. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and Laboratory Features of the *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. avr 2006;19(2):259-82.
128. Girard V, Mailler S, Welker M, Arzac M, Cellière B, Cotte-Pattat P-J, et al. Identification of mycobacterium spp. and nocardia spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagn Microbiol Infect Dis*. nov 2016;86(3):277-83.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Tableau récapitulatif de la littérature évaluant le MALDI-ToF pour l'identification des espèces du genre *Nocardia*

Date de publication	Auteurs	Méthode d'identification de référence	Conditions de culture	Dépôt	Système MALDI-ToF	Critères d'identification	Nb d'isolats testés	Espèces testées	Version	Résultats	Nb d'isolats pour création BD	Résultats
2010	Verroken et al.	méthodes biochimiques et enzymatiques séquençage entier ARN 16S	milieu TSA à 37°C/48-72h + 10 souches sur milieu Sabouraud et Lowenstein Jensen	dépôt unique : 1 µl d'extrait + 1 µl de matrice également 3 dépôts testés	Bruker Microflex LT	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	43	10 espèces : <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. abscessus</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. carnei</i> , <i>N. shimojuzensis</i> , <i>N. asteroides</i>	Biotyper 3.0.2	Id espèce : 23% Id genre : 21%	153 dont 19 souches de référence	Id espèce : 79% Id genre : 9%
2012	Farfour et al.	séquençage ARN 16S ± séquençage <i>hsp 65</i>	milieu COS à 37°C sous 10% CO <sub>2</sub> /24-48h	dépôt direct recouvert d'1 µl d'éthanol absolu puis 1 µl de matrice	Bruker Microflex LT	Id espèce : >68% de pics en commun avec un des profils de la BD et 10% de différence entre les 2 premiers choix Id genre : si pas de différence de 10% entre les 2 premiers choix et qu'ils appartiennent au même genre.	46	12 espèces : <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. abscessus</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. asteroides</i> , <i>N. paucivarans</i> , <i>N. otitidiscavarium</i>	Andromas	Id espèce : 91% Id genre : 9%	NP	NP
2014 (Avril)	Hueh et al.	séquençage partiel ARN 16S + séquençage sec A1	milieu TSA à 37°C/48h	dépôt unique : 1 µl d'extrait + 1 µl de matrice redépôt en double si discordance entre id séquençage et MALDI-ToF	Bruker Microflex LT	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	74	14 espèces : <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. abscessus</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. carnei</i> , <i>N. transvaaliensis</i> , <i>N. asteroides</i> , <i>N. rharnosiphila</i> , <i>N. otitidiscavarium</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. puris</i>	Biotyper 3.1	Id espèce : 15% Id genre : 53%	NP	NP
2015 (mars)	Segawa et al.	méthodes biochimiques et enzymatiques séquençage ARN 16S	COS à 37°C/72h	dépôt unique : 1 µl d'extrait + 1 µl de matrice	Bruker Microflex LT	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	64	22 espèces : <i>N. cohenensis</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. abscessus</i> , <i>N. cyriacigeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. transvaaliensis</i> , <i>N. asteroides</i> , <i>N. otitidiscavarium</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. puris</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. concava</i> , <i>N. exalbidata</i> , <i>N. nigritensis</i> , <i>N. paucivarans</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. vinacea</i> , <i>N. wallacei</i>	Biotyper 3.1	Id espèce : 15,6% Id genre : 25%	192 isolats cliniques (73 espèces)	Id espèce : 90,6% Id genre : 9,4%
2015 (juin)	Pasciak	séquençage partiel ARN 16S + séquençage sec A1	gélules glucose yeast extract et COS à 37°C/24-48h	dépôt unique : 1 µl d'extrait + 1 µl de matrice	Bruker Autoflex III	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	1	<i>N. farcinica</i>	Biotyper (version non précisée)	1 seule souche testée	7 isolats	1 seule souche testée

TSA : gélose trypticase soja

COS : gélose au sang de mouton Colombia

NP = non précisé


NC = non concerné

Date de publication	Auteurs	Méthode d'identification de référence	Conditions de culture	Dépôt	Système Malidi-Tof	Critères d'identification	Nb d'isolats testés	Espèces testées	Version	Résultats	Nb d'isolats pour création BD	Résultats
2015 (août)	Khot	séquençage partiel ARN16S ± séquençage <i>hsp65</i> et <i>secA1</i>	COS à 35°C/18-48h selon croissance 56 isolats testés après 48h	dépôt unique : 1,25 µL d'extrait + 1,75 µL de matrice	Braker (modèle non précisé)	Id espèces : ≥1,9 Id genre : <1,9 et ≥1,7	79 (souches cliniques) 8 (souches type)	26 espèces : <i>N. abensis</i> , <i>N. abscessus</i> complexe, <i>N. africana</i> , <i>N. araneensis</i> , <i>N. brevicatena</i> , <i>N. carnei</i> , <i>N. higoensis</i> , <i>N. ignarata</i> , <i>N. testacea</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. abscessus</i> , <i>N. cyrtacegeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. transvalensis</i> complexe, <i>N. asteroides</i> , <i>N. ottidiscaviarum</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. puris</i> , <i>N. nigatensis</i> , <i>N. paucivarans</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. vinacea</i> , <i>N. wallacei</i>	Biotyper 3.1	Id espèce : 53% Id genre : 62%	13 isolats (13 espèces)	Id espèce : 83% Id genre : 11%
2015 (decembre)	Buckwalter	séquençage partiel ARN16S	milieu middlebrook 7H10 ou COS à 37°C	dépôt unique : 1 µL d'extrait + 1 µL de matrice repassé en triplicata si score <2 ou nb pics faibles	Braker MicroFlex LT	Id espèces : ≥2	148	15 espèces : <i>N. abscessus</i> complexe, <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. cyrtacegeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. veterana/elegans</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. ottidiscaviarum</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. vinacea</i> , <i>N. wallacei</i> , <i>N. gamkensis</i> , <i>N. kruzkakiae</i> , <i>N. arthritidis</i>	Biotyper 3.1	Id espèce : 42% Id genre : 15%	232 entrées (53 espèces)	Id espèce : 90% Id genre : 5%
2016 (janvier)	Xiao	MLSA : ARN16S, <i>secA1</i> , <i>gyrB</i> , <i>rpoB</i> , <i>hsp65</i> .	milieu COS à 37°C/72-96h	NP	Braker Autoflex Speed	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	25*	5 espèces** : <i>N. farcinica</i> , <i>N. abscessus</i> , <i>N. cyrtacegeorgica</i> , <i>N. ottidiscaviarum</i> , <i>N. wallacei</i>	Biotyper 3.1	Id espèce : 0% Id genre : 32%	5 isolats (5 espèces)	Id espèce : 95% Id genre : 5%
2016 (février)	Blosser	étude multicentrique avec différentes méthodes d'identification : pyroséquençage ARN16S, séquençage <i>secA1</i> ± ARN16S complet, séquençage partiel ARN16S	milieu Sabouraud à 35°C/5% CO <sub>2</sub> /3-4j, maxi 7j	Dépôt en double : 1 µL d'extrait + 2 µL de matrice, ré-extraction si score <2	Braker MicroFlex LT	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	150	30 espèces : <i>N. abscessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. brevicatena</i> , <i>N. paucivarans</i> , <i>N. testacea</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. cyrtacegeorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. asteroides sensu stricto</i> , <i>N. ottidiscaviarum</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. puris</i> , <i>N. nigatensis</i> , <i>N. paucivarans</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. wallacei</i> , <i>N. pneumoniae</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. kruzkakiae</i> , <i>N. anaeminae</i> , <i>N. blacklockiae</i> , <i>N. exalbidia</i> , <i>N. mexicana</i> , <i>N. sienata</i> , <i>N. thailandica</i> , <i>N. sp.</i>	Biotyper 4.0.0.1	Id espèce : 47,3% Id genre : 24,7%	2 bases de données "maison" - base NIH : 64 isolats - base OSU : 26 isolats	<b>Biotyper + NIH :</b> - Id espèce : 68,7% - Id genre : 17,8% <b>Biotyper + OSU :</b> - Id espèce : 72,4% - Id genre : 7,3% <b>Biotyper + NIH + OSU :</b> - Id espèce : 84,2% - Id genre : 6%

\* pour tester la base Biotyper seule, 25 isolats furent analysés pour construire la base de données "maison", 5/25 isolats furent utilisés, les 20 autres servir à tester la combinaison de ces deux bases de données  
\*\* les 5 espèces différentes furent analysées pour tester la base Biotyper seule, en revanche, seules les espèces *N. farcinica*, *N. abscessus*, *N. cyrtacegeorgica* servir à tester la combinaison des 2 bases.

Date de publication	Auteurs	Méthode d'identification de référence	Conditions de culture	Dépôt	Système Maldi-Tof	Critères d'identification	Nb d'isolats testés	Espèces testées	Version	Résultats	Nb d'isolats pour création BD	Résultats
2017	Yarbrough	méthodes biochimiques et enzymatiques + séquençage complet ARN 16S ou secA1	Sabouraud ou BHI avec sang mouton à 30°C en air / 2-6j	dépôt unique des extraits et dépôt en duplicate pour le dépôt direct : 1 µL d'extrait + 1 µL de matrice	Bruker (modèle non précisé)	Id espèces : 2 seuls testés : ≥2 et ≤1,8 Id genre : <2 et ≥1,7	60	17 espèces : <i>N. absessus</i> , <i>N. paucivirans</i> , <i>N. testacea</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. cyriacageorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. beijingensis/asiatica</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. takadensis</i> , <i>N. asteroides</i> complexe, <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. puris</i> , <i>N. wallacei</i> , <i>N. krucakiae</i> , <i>N. vinacea</i> .	BDAL V5 et BDAL V6	Id espèce avec extraction directe : - ≥2 : 43% (V5) et 58% (V6) - ≥1,8 : 72% (V5) et 80% (V6) Id genre avec extraction directe : - 34% (V5) et 27% (V6)	NC	NC
2018 (avril)	Body	séquençage partiel ARN16S, secA1, rpoB, hsp65, ITQ, gyrB et erm et si nécessaire séquençage complet de l'ARN 16S	BCYE, COS, gélose au sang cuit, Sabouraud à 35-37°C en air ambiant / 18-72h	dépôt unique : 1 µL d'extrait + 1 µL de matrice	Vitek MS	id espèces : 1 seule id proposée et concordante avec l'id de référence id complexe : 1 seule id ou plusieurs dans le même genre et même complexe si pas d'id, repasse du même extrait et si toujours pas d'id, nouvelle extraction et repasse, si pas d'id alors considéré comme non identifié	312	21 espèces : <i>N. absessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. paucivirans</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. elegans</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. wallacei</i> , <i>N. blacklockiae</i> , <i>N. asteroides sensu stricto</i> , <i>N. cyriacageorgica</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>N. rhamnosiphila</i> , <i>N. testacea</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. vulneris</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. mexicana</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. sp</i>	V3	Id espèce : 76% Id complexe : 14%	NC	NC
2018 (juin)	Marin	séquençage partiel ARN16S et séquençage secA1 et si besoin séquençage complet 16S	COS à 36°C / 48h	dépôt en double : 1 µL d'extrait + 1 µL de matrice	Bruker Microflex LT	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7 si score <1,7, id acceptés si les 3 premières id sont cohérentes	73	13 espèces : <i>N. absessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. carneae</i> , <i>N. concava</i> , <i>N. cyriacageorgica</i> , <i>N. farcinica</i> , <i>N. nova</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. veterana</i>	BDAL V6	Id espèce : 57,5% Id genre : 36,9%	9 isolats (6 espèces)	Id espèce : 68,5% Id complexe : 30,1%
2018 (juin)	McTaggart	séquençage partiel secA1 ou MISA sur gyrB-secA1-rpoB-hsp65	2 types de conditions de culture : - "standardized time" : culture sur SAB à 35°C/3j avec prétraitement des billes par agitation avec billes - "early growth" : culture sur COS à 35°C/18-72h jusqu'à observation d'une pousse significative sans prétraitement par billes.	dépôt en double : 1 µL d'extrait + 1 µL de matrice	Bruker Microflex LT	Id espèces : ≥2 Id genre : <2 et ≥1,7	"standardized time" : 44 souches types + 231 souches cliniques "early growth" : 251 isolats etude prospective sur 6 mois : 23 souches cliniques	23 espèces : <i>N. absessus</i> , <i>N. arthritidis</i> , <i>N. paucivirans</i> , <i>N. farcinica</i> , complexe <i>N. nova</i> , <i>N. cyriacageorgica</i> , <i>N. brasiliensis</i> , <i>N. beijingensis</i> , <i>N. carneae</i> , <i>N. couleae/ignarata</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. transvalensis</i> , <i>N. asteroides sensu stricto</i> , <i>N. otitidiscaviarum</i> , <i>N. asiatica</i> , <i>N. neocaledoniensis</i> , <i>N. pseudobrasiliensis</i> , <i>N. wallacei</i> , <i>N. pneumaniae</i> , <i>N. anaemiae</i> , <i>N. exalbida</i> , <i>N. sienata</i> , <i>N. thailandica</i>	BDAL V6	"standardized time" : - Id espèce : 36,9% - Id genre : 48,6% "early growth" : - Id espèce : 80,9% - Id genre : 6%	souches de référence de <i>N. asiatica</i> , <i>N. arthritidis</i> et <i>N. brasiliensis</i> (nb de souches non précisé)	"early growth" : - Id espèce : 87,3% - Id genre : NP <b>étude prospective</b> : - Id espèce : 82,6% - Id genre : 8%

# Annexe 2 : Poster concernant l'étude sur la base de données V3 du Vitek MS présenté au congrès de l'ECCMID 2018 à Madrid



## Evaluation of VITEK MS V3 for *Nocardia* pathogenic species. Comparison of two different growth media

Durand T<sup>1</sup>, Vautrin F<sup>2</sup>, Bergeron E<sup>3</sup>, Polsinelli S<sup>4</sup>, Girard V<sup>1</sup>, Durand G<sup>3</sup>, Laurent F<sup>1</sup>, Dauwalder O<sup>1</sup>, Dumitrescu O<sup>1</sup>, Rodrigueux-Nava V<sup>1,2,4</sup>  
 1. Institut des Agents Infectieux, Centre de Biologie et pathologies Nord, Hôpital de la Croix Rousse  
 2. UMR CNRS 5557, Ecologie Microbiome – Groupe de recherche "Pathogènes opportunistes et environnement" – Faculté de Pharmacie de Lyon.  
 3. bioMérieux, Microbiology R&D  
 4. Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lyon, Lyon, France.

### Introduction- Purpose

- Nocardia* = opportunistic pathogens
- expensive, time-consuming and difficult identification (PCR + gene sequencing)
- a recent alternative : mass spectrometry (Maldi-ToF with sample extraction)

**Purpose :** Evaluation of the new Vitek MS V3 database for identification of *Nocardia* subcultured on 2 different growth media, BCP and COS through analysis of :

- 1<sup>st</sup> set = all isolates sent to the French Observatory of Nocardiosis (OFN) during one year
- 2<sup>nd</sup> set = 12 species among the more frequently isolated.

### Results

**Table 3. Benefit of the 2<sup>nd</sup> deposit and 2<sup>nd</sup> extraction**

1 <sup>st</sup> deposit (1 <sup>st</sup> set)	BCP : Cumulative number of isolates correctly identified (%)	COS : Cumulative number of isolates correctly identified (%)
1 <sup>st</sup> deposit	89 (68)	107 (82)
1 <sup>st</sup> deposit + 2 <sup>nd</sup> deposit	104 (79)	114 (87)
1 <sup>st</sup> deposit + 2 <sup>nd</sup> deposit + 2 <sup>nd</sup> extraction	114 (87)	121 (92)

**2<sup>nd</sup> set :**

- Reliable identification of the more frequent species, especially *N. farcinica*, *N. nova* and *N. cyriacigeorgica*,
- mixed results for *N. abscessus*, *N. pseudobrasiliensis* and *N. beijingensis*

### Materials/methods

**Nocardia tested strains :** All isolates were previously identified by *rrs* gene sequencing.

- 1<sup>st</sup> set = 131 clinical isolates sent to the OFN during the year 2014
- 2<sup>nd</sup> set = 186 clinical isolates of 12 species

**Method :**

- subcultured on blood agar (COS) and BCP simultaneously during 72h
- analyzed by the Vitek MS with V3 database :
  - direct deposit
  - an extract deposit (following bioMérieux recommendations).
- if no identification : 2<sup>nd</sup> deposit (same extract)
- if no identification again : new extraction

### Conclusion

Direct deposit is not recommended, only extract deposit enables to obtain reliable results with the Vitek MS V3.

Although the BCP medium was not used to generate spectra for V3 database building, use of this medium could be an interesting alternative for *Nocardia* identification with Vitek MS.

In case of no identification with the first extract deposit, doing a second deposit and then a re-extraction if necessary increase the identification rate.

Analysis of the 1<sup>st</sup> set, representative of nocardiosis French prevalence, shows that Vitek MS is a reliable tool for *Nocardia* routine identification.

Analysis of the 2<sup>nd</sup> set, which includes a greater number of rare species isolates confirms the reliability of the Vitek MS to identify the more frequently isolated species, especially the 3 more prevalent species *N. farcinica*, *N. nova* and *N. cyriacigeorgica*, but as well as rare species like *N. otitidiscaviarum*, *N. paucivorans*, *N. veterana*. However, reserved results are obtained for *N. abscessus*, 1 of the 4 more frequent species and for *N. pseudobrasiliensis* and *N. beijingensis*, 2 rare species.

### Table 1. Results of extract deposits after subculture on BCP and COS (1<sup>st</sup> set)

Medium	Correct identification (%)	No identification (%)	Misidentifications (%)
BCP	89 (68)	34 (26)	8 (6)
COS	107 (82)	18 (14)	6 (4)

### Table 2. Results by prevalence group (1<sup>st</sup> set)

Prevalence group	No. of isolates	BCP : Correct ID (%)	COS : Correct ID (%)
High prevalence <sup>a</sup>	102	71 (70)	86 (84)
Intermediate prevalence <sup>b</sup>	18	16 (89)	18 (100)
Low prevalence <sup>c</sup>	11	2 (18)	3 (27)

<sup>a</sup> *N. farcinica*, *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. abscessus*  
<sup>b</sup> *N. pseudobrasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*  
<sup>c</sup> *N. asteroides*, *N. parvovulvatis*, *N. paucivorans*, *N. crassa*, *N. crenulata*, *N. albiverticillata*

### Table 4. Results of extract deposits by species (2<sup>nd</sup> set)

Species	No. of isolates	Extraction with BCP	Extraction with COS
<i>N. farcinica</i>	42	32 (76)	40 (95)
<i>N. nova</i>	25	14 (56)	21 (84)
<i>N. abscessus/asiatica</i>	20	10 (50)	11 (55)
<i>N. cyriacigeorgica</i>	18	17 (94)	16 (89)
<i>N. brasiliensis</i>	10	8 (80)	8 (80)
<i>N. veterana</i>	13	10 (77)	9 (69)
<i>N. wallacei</i>	14	10 (71)	9 (64)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	12	7 (58)	10 (83)
<i>N. paucivorans</i>	10	3 (30)	8 (80)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	9	4 (44)	5 (56)
<i>N. neooleidophilensis</i>	2	1 (50)	2 (100)
<i>N. beijingensis</i>	11	4 (36)	5 (46)
Total	186	120 (65)	144 (77)

### Table 5. Results of extract deposits by species (2<sup>nd</sup> set)

Species	No. of isolates	Extraction with BCP	Extraction with COS
<i>N. farcinica</i>	42	32 (76)	40 (95)
<i>N. nova</i>	25	14 (56)	21 (84)
<i>N. abscessus/asiatica</i>	20	10 (50)	11 (55)
<i>N. cyriacigeorgica</i>	18	17 (94)	16 (89)
<i>N. brasiliensis</i>	10	8 (80)	8 (80)
<i>N. veterana</i>	13	10 (77)	9 (69)
<i>N. wallacei</i>	14	10 (71)	9 (64)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	12	7 (58)	10 (83)
<i>N. paucivorans</i>	10	3 (30)	8 (80)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	9	4 (44)	5 (56)
<i>N. neooleidophilensis</i>	2	1 (50)	2 (100)
<i>N. beijingensis</i>	11	4 (36)	5 (46)
Total	186	120 (65)	144 (77)

### **Annexe 3 : Premier travail traitant de la comparaison des performances des systems de spectrométrie Bruker et bioMérieux pour l'identification des *Nocardia***

1           **Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-**  
2           **Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass**  
3           **Spectrometry Systems for the Identification of *Nocardia***

4   Durand T<sup>1</sup>, Vautrin F<sup>2</sup>, Chanard E<sup>3</sup>, Mallet B<sup>3</sup>, Bergeron E<sup>2</sup>, Dumitrescu O<sup>1</sup>, Dauwalder  
5   O<sup>1</sup>, Laurent F<sup>1</sup>, Rodriguez-Nava V<sup>1,2</sup>

6   **1. Institut des Agents infectieux, Centre de Biologie et pathologies Nord, Hôpital de la**  
7   **Croix Rousse**

8   **2. UMR CNRS 5557, Ecologie Microbienne – Groupe de recherche "Pathogènes**  
9   **opportunistes et environnement" - Faculté de Pharmacie de Lyon**

10 **3. Laboratoire CERBALLIANCE Rhône-Alpes Site VILLON, Groupe CERBA**  
11 **HealthCare**

12

13 **Abstract**

14

15 *Nocardia* species are opportunistic pathogens that are isolated from human samples with  
16 increasing frequency, but their identification remains difficult for standard laboratories.  
17 However, matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry  
18 (MALDI-TOF MS) is an interesting alternative, even though a pretreatment step is necessary  
19 to maximize identification rates. The aim of this study was to compare the performances of the  
20 Vitek MS (bioMérieux) and Biotyper (Bruker Daltonics) mass spectrometers for *Nocardia*  
21 identification using two different pretreatment protocols, the BioMérieux extraction protocol  
22 (BMPEP) and micropestle extraction protocol (MPEP). Using the Biotyper, the BMPEP protocol  
23 yielded a greater number of identifications associated with a  $\geq 2$  score than the MPEP protocol  
24 (58% vs 44%). By contrast, with the Vitek MS, the extraction protocol did not affect the number  
25 of isolates identified (90% with the BMPEP vs 89% with the MPEP). Concerning the

26 identifications rates, the Vitek MS correctly identified a greater number of isolates than the  
27 Bruker Biotyper, regardless of the extraction protocol or identification score threshold.  
28 However, these results have to be evaluated as a function of the species and the choice of score  
29 threshold with the Biotyper. Interestingly, the 1.8 modified score threshold for species  
30 identification enabled an increase in species identification rates without changing the  
31 misidentification rates.

32

### 33 **Introduction**

34

35 *Nocardia* species are filamentous gram-positive bacteria belonging to the order  
36 Corynebacteriales, which also includes the genus *Mycobacterium*. More than 100 *Nocardia*  
37 species are currently well characterized, among which approximately half are of medical  
38 importance (1). Members of this genus are cosmopolitan and ubiquitous in the environment.  
39 Nocardiosis are primarily opportunistic infections affecting immunocompromised patients  
40 (2,3), although immunocompetent patients can also be affected (4). In these cases, primary  
41 cutaneous and soft tissue infections predominate, but serious pulmonary and central nervous  
42 system infections have also been reported (5,6). The most common presentation is pulmonary  
43 nocardiosis (7), although dissemination to the central nervous system frequently occurs. The  
44 mortality associated with these infections remains high (8), which justifies beginning of an  
45 effective treatment as quickly as possible. However, antimicrobial susceptibility patterns differ  
46 tremendously between species (9), making identification of the species involved in the infection  
47 is essential. Currently, *Nocardia* identification is primarily based on molecular methods (10).  
48 The most frequently used technique is 16S rRNA gene sequencing, although other loci can be  
49 analyzed if the 16S rRNA gene is not sufficiently discriminative, such as *hsp65*, *secA1*, *rpoB*,  
50 and *gyrB* (11,12). Although these techniques are specific and sensitive, they are expensive,  
51 time-consuming and their limited accessibility to standard laboratories are drawbacks. Thus,

52 samples must often be transferred to larger laboratories, delaying the identification of the  
53 pathogen. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry  
54 (MALDI-TOF MS), a tool that is now widely used in standard laboratories to identify common  
55 bacteria and yeasts, appears to be a promising technology for *Nocardia* identification. As it is  
56 easy-to-use, fast, and cost-effective, MALDI-TOF MS could be a very interesting alternative  
57 to molecular methods. However, recent publications on the topic have revealed several  
58 limitations of this approach. While common bacteria can be identified by direct deposition,  
59 *Nocardia* species appear to require a sample extraction step to allow access to cell proteins, as  
60 the cell wall is rich in mycolic acids, similar to *Mycobacterium*. In recent years, many extraction  
61 protocols have been proposed that consist of using different steps in different orders, including  
62 ethanol-formic acid extraction, a sample boiling step, and sample agitation with glass beads  
63 (13–17), among others, but no consensus has been reached. The Bruker Biotyper system has  
64 been widely evaluated for clinical *Nocardia* identifications (11,18–22), and the authors from  
65 these studies concluded that the manufacturer’s database is not complete enough to allow low-  
66 prevalence species to be identified correctly. The creation of a custom library appears to be the  
67 best solution until the manufacturer completes the database. However, this is not possible for  
68 all laboratories. By contrast, although few studies have evaluated the Vitek MS system for  
69 *Nocardia* identification, it appears to be an effective tool (23,24). In this study, we evaluated  
70 the performances of the Bruker Biotyper and Vitek MS systems for the identification of  
71 *Nocardia* strains using two different extraction protocols.

72

### 73 **Material and Methods**

74

75 **Bacterial strains.** A total of 192 *Nocardia* strains and 15 non-*Nocardia* (Actinobacteria) strains  
76 were tested in this study (Table 1). Among the *Nocardia* strains, 132 were from human clinical

77 specimens collected in 2014 and 60 were from environmental samples collected in different  
78 years. All the studied strains were obtained from the Observatoire Français des Nocardioses  
79 (Université Claude Bernard, Lyon, France), where they have been previously identified by  
80 DNA sequencing of the 16S rRNA gene. PCR amplification of a 600 nt fragment of 16S rRNA  
81 gene using the primers Noc17S1 and Noc 17S2 was performed according to Rodriguez-Nava  
82 et al. (25), and DNA sequencing was performed by Biofidal (Vaulx-en-Velin, France). Isolates  
83 were stored at -80°C and subcultured on Bennett agar medium at 37°C for 72 h.

84

85 **BioMérieux extraction protocol (BMEP).** Extractions were performed according to the  
86 manufacturer's recommended protocol. A 1- $\mu$ L loopful of organisms was transferred into a 1.5  
87 mL Eppendorf tube containing 500  $\mu$ L of 70% ethanol (HPLC grade) and approximately 200  
88  $\mu$ L of 0.5 mm glass beads. The mixture was vortexed for 15 minutes with a Genie 2 Vortex  
89 with a 13000-V1-24 Vortex adaptor MoBio (Qiagen) and then was incubated at room  
90 temperature for 10 minutes. The suspension was briefly vortexed and then was transferred into  
91 an empty 1.5 mL Eppendorf tube, avoiding the transfer of any glass beads, and then was  
92 centrifuged for 2 minutes at 14,000 rpm. The ethanol supernatant was removed, and the pellet  
93 was resuspended in 10  $\mu$ L of 70% formic acid (Fluka grade LC-MS). The tube was briefly  
94 vortexed, 10  $\mu$ L of acetonitrile was added, and the tube was vortexed again and then centrifuged  
95 for 2 minutes at 14,000 rpm. The resulting supernatant was used for analysis by MALDI-TOF  
96 MS. Each strain was only extracted once.

97

98 **Micropestle extraction protocol (MPEP).** A 1- $\mu$ L loopful of organisms was transferred in a  
99 1.5 mL Eppendorf tube containing 300  $\mu$ L of distilled water. Bacterial material was crushed  
100 with an Eppendorf micropestle until a homogenous suspension was obtained. Nine hundred  
101 microliters of absolute ethanol (HPLC grade) was added, and the suspension was homogenized

102 with pipette. The tube was centrifuged for 2 minutes at 13,000 rpm, after which the supernatant  
103 was completely removed. The pellet was air-dried for 15 minutes and then was resuspended in  
104 20  $\mu$ L of 70% formic acid, homogenized by pipetting and then was mixed with 20  $\mu$ L of  
105 acetonitrile. The tube was centrifuged for 2 minutes at 13,000 rpm, and the resulting supernatant  
106 was used for MALDI-TOF MS analysis. Each strain was only extracted once.

107 **MALDI-TOF MS analysis: BioMérieux Vitek MS.** One microliter of supernatant was spotted  
108 once onto a 48-target plate (bioMérieux Vitek MS-DS) and allowed to dry. Next, the spot was  
109 overlaid with 1  $\mu$ L of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution and was  
110 allowed to dry. The *E. coli* reference strain ATCC 8739 was used on each plate for instrument  
111 calibration according to the manufacturer's specifications. Finally, the plate was loaded into the  
112 instrument. Analysis was performed on a Vitek MS, and spectra were acquired with LaunchPad  
113 software and were analyzed using SARAMIS (RUO database). The spectra were compared to  
114 both SuperSpectra and ReferenceSpectra in SARAMIS. In instances where a sample could be  
115 identified by comparison to SuperSpectra, the most precise taxonomic data are given with a  
116 percentage corresponding to the confidence level. When no matching SuperSpectrum with a  
117 confidence level of at least 75% was observed, a comparison with ReferenceSpectra was  
118 performed. When some ReferenceSpectra have significant similarities with the sample  
119 spectrum, a "show details" window can be opened and a list of a maximum of 30  
120 ReferenceSpectra is available. A percentage value, which is unrelated to the percentage  
121 mentioned above, is associated with all proposed ReferenceSpectra. The acceptable  
122 identification threshold was set to 40% for comparisons with ReferenceSpectra. In our study,  
123 identification was accepted when the software provided an identification associated with a  
124 confidence score > 75% by SuperSpectra comparison and when only the "show details" results  
125 were available, the first proposed identification associated with a percentage >40 % by the  
126 ReferenceSpectra comparison was accepted.

127

128 **MALDI-TOF MS analysis: Bruker MALDI Biotyper.** One microliter of supernatant was  
129 spotted once onto a polished steel 96-target plate (Bruker Daltonics Inc.) and allowed to dry.  
130 Next, the spot was overlaid with 1  $\mu$ L of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix  
131 solution and was allowed to dry. A bacterial test standard (BTS) (Bruker Daltonics Inc.) was  
132 used on each plate for instrument calibration according to the manufacturer's recommendations.  
133 Finally, the plate was loaded into the instrument. Analysis was performed on a MALDI  
134 Biotyper Microflex LT system using the manufacturer's settings. Spectra were analyzed in the  
135 MALDI Biotyper software with library version 5.0.0.0 (5989 entries). The manufacturer  
136 specified that a log score  $\geq 2$  is required for identification of samples to the species level, and a  
137 log score between 1.99 and 1.7 is required for identification to the genus level.

138

## 139 **Results**

140

### 141 **Comparison of combinations of Bruker Biotyper and Vitek MS systems and extraction** 142 **protocols for *Nocardia* identification.**

143 **Clinical *Nocardia* strains.** We evaluated the impact of the extraction protocols on the  
144 identification scores/percentages while testing the performances of the Bruker Biotyper and the  
145 Vitek MS for the identification of 132 clinical isolates. Using the Bruker Biotyper instrument,  
146 77/132 (58%) and 58/132 (44%) of the isolates had scores of  $\geq 2$  following the BMEP and  
147 MPEP, respectively ( $p < 0.05$ ). Thus, for the Bruker Biotyper, the use of BMEP resulted in the  
148 acquisition of significantly more isolates with a score of  $\geq 2$  than did the MPEP. For the Vitek  
149 MS instrument, 119/132 (90%) and 118/132 (89%) of isolates were identified using the BMEP  
150 and MPEP, respectively. Therefore, for the Vitek MS, the extraction protocol did not affect the  
151 number of isolates associated with an identification. Overall, the Vitek MS correctly identified

152 more isolates to the species and genus levels than the Bruker Biotyper, regardless of the  
153 extraction protocol (Table 2) or identification score threshold used (Table 5). However, some  
154 differences could be observed according to the prevalence of the species (Table 3). Concerning  
155 highly prevalent species, with the BMEP, using the identification score threshold recommended  
156 by Bruker, fewer isolates were identified to the species level compared to the Vitek MS (70%  
157 versus 86%), although similar results were obtained regarding the identification to at least at  
158 the genus level (87% versus 91%). Nevertheless, using the modified 1.8 score threshold, the  
159 performances of the two systems were nearly the same for identifying isolates to species or  
160 genus levels. With the MPEP, the Bruker Biotyper identified fewer isolates to the species and  
161 genus levels than the Vitek MS, even though the species identification rates with the Bruker  
162 Biotyper could be improved with use of the modified 1.8 score threshold. Concerning  
163 intermediately prevalent species, the Vitek MS identified many more isolates to the species and  
164 genus levels than the Bruker Biotyper, regardless the extraction protocol or the score threshold  
165 used. Concerning species with a low prevalence, the two systems yielded similar results, with  
166 few isolates being identified. No misidentifications occurred with the Bruker Biotyper when  
167 the manufacturer's score threshold was used, and only 5/132 misidentifications occurred with  
168 the Vitek MS (Table 4).

169

170 **Environmental *Nocardia* strains.** We tested the performance of the Bruker Biotyper and Vitek  
171 MS for the identification of 60 environmental *Nocardia* isolates (Table 1). Only *N.*  
172 *abscessus/asiatica* and *N. cyriaci/georgica* isolates were correctly identified to the species level  
173 with both systems (data not shown). Concerning *N. asteroides* isolates, only the Bruker  
174 Biotyper correctly identified these isolates to species level, as the Vitek MS failed to identify  
175 them or misidentified them as *N. neocaledoniensis*. All other environmental species (*N.*  
176 *salmonicida*, *N. takedensis*, *N. ignorata/fluminea*, *N. fluminea/soli*, *N. jejuensis*, *N.*

177 *pseudovaccinii*, *N. goodfellowii*, *N. bhagyanarayanae*, *N. rhammosiphila*, *N. vinacea*, and *N.*  
178 *iowensis*) were not identified using either instrument.

179

180 **Non-*Nocardia* Actinobacteria strains.** We tested 15 non-*Nocardia* Actinobacteria isolates  
181 (Table 1) to evaluate the specificity of the Bruker Biotyper and the Vitek MS. No isolate was  
182 identified as *Nocardia* by either instrument.

183

184 **Impact of the score threshold on isolate identification with the Bruker Biotyper.** We  
185 evaluated whether modification of the score threshold could influence the identification rates  
186 and misidentifications with the Bruker Biotyper. Regardless the extraction protocol used,  
187 lowering the score threshold did not decrease the number of unidentified isolates (Table 5).  
188 Nevertheless, the lower the score threshold, the fewer isolates had only a genus level  
189 identification in favor of a species level identification. However, with the BMPEP, lowering the  
190 score threshold to 1.7 caused the misidentification of 2 isolates.

191

## 192 **Discussion**

193

194 Different extraction methods for *Nocardia* and *Mycobacterium* have previously been tested in  
195 different studies, and it appears that the addition of an agitation step with beads to improve cell  
196 disruption increases identification rates (15). In this study, we compared two different  
197 extraction methods, one with a step involving sample agitation with beads and one with a step  
198 involving organism crushing with a micropestle. The results showed that the use of the BMPEP  
199 allowed for better species identification than MPEP, regardless of the analyzer used. We also  
200 observed other benefits using the BMPEP: it is safer because MPEP exposes the operator to a  
201 splash risk during the crushing step, which can also lead to sample inter-contamination; it is  
202 more adapted to large series of samples than the MPEP, which can become rapidly time-

203 consuming when more than 20 samples have to be extracted; and the BMEP agitation step is  
204 standardized, whereas the time and quality of the micropestle crushing step depends  
205 substantially on the operator. In summary, the BMEP yields better identification  
206 scores/percentages, but it is not well adapted to laboratories that rarely attempt to identify  
207 *Nocardia*. Indeed, the use of the BMEP requires the acquisition of supplementary materials,  
208 whereas the MPEP is inexpensive, easy to implement and can yield acceptable results.

209 Concerning the identification rates obtained with the Bruker Biotyper, Blosser et al. identified  
210 47.3% of their isolates to the species level and 24.7% to the genus level with an extraction  
211 protocol similar to BMEP (20). Using the same score threshold, we obtained slightly different  
212 results, as we identified 10% more isolates than they did. This slight difference could be  
213 explained 75% of our clinical isolates corresponding to highly prevalence species, including *N.*  
214 *farcinica*, *N. nova*, *N. cyriacigeorgica* and *N. abscessus/asiatica*. For these species, Bruker used  
215 a greater number of strains than for others species to generate its spectrum database. Thus, better  
216 identification rates were obtained for these highly prevalence species, as 70% and 54% of these  
217 isolates were correctly identified to the species level with the BMEP and MPEP, respectively  
218 (Table 3). By contrast, a greater number of rare species were tested by Blosser et al., which  
219 could explain the lower identification they obtained compared to ours. Indeed, species with an  
220 intermediate and low prevalence, such as *N. beijingensis*, *N. cerradoensis*, *N. flavorosea*, *N.*  
221 *pseudobrasiliensis*, *N. rhamnosiphila*, *N. shimofusensis* and *N. wallacei* were not in the Bruker  
222 database, which could explain why none of these species were identified by either Blosser et  
223 al. or by us. For the species that were absent from the database, even a genus level identification  
224 was rarely obtained, as only the two *N. cerradoensis* isolates yielded a score >1.7. The few  
225 isolates identified by MALDI-TOF MS for these species with an intermediate and low  
226 prevalence again show the importance of identifying isolates by molecular biology methods.  
227 Thus, we recommend systematic use of this reference method when no identification is obtained

228 by mass spectrometry for colonies that potentially belong to the genus *Nocardia*. Similarly, for  
229 *N. brasiliensis* and *N. transvalensis*, only one strain of each species was available in the  
230 database. Although *N. brasiliensis* was identified at the genus level in most cases, the  
231 identification of isolates to the species level should be improved because of its resistance profile  
232 and large prevalence in countries such as Taiwan (7,26). These results again demonstrate the  
233 necessity of database supplementation. In the literature, no studies have described *Nocardia*  
234 identification using the Vitek MS and SARAMIS database. In our study, as with the Bruker  
235 Biotyper, highly prevalent species have greater identification rates than other species, with  
236 species identification rates of 86 % and 85 % observed using the BMEP and MPEP,  
237 respectively, which likely occurred for the same reasons described above. Similarly, *N.*  
238 *cerradoensis*, *N. flavorosea*, *N. rhamnosiphila*, and *N. shimofusensis*, which are not in the  
239 SARAMIS database, are never identified by the Vitek MS either to species or genus level. In  
240 contrast to the Bruker Biotyper, *N. brasiliensis* isolates have always been correctly identified  
241 and *N. wallacei/transvalensis* in half of the cases by the Vitek MS. Although the Vitek MS  
242 yields better identification rates for intermediately prevalent species, identification by  
243 molecular biology techniques remains the reference method and should be use if no  
244 identification is obtained. Regarding misidentifications, the genus reported by either analyzer  
245 was always correct. This result demonstrates the reliability of MALDI-TOF MS to identify  
246 *Nocardia* at the genus level, especially as no false positives were observed with other  
247 Actinobacteria tested in this study. This reliability of identification at the genus level is an  
248 important point because even in absence of species identification, identifying an isolate as a  
249 member of the genus *Nocardia* allows an efficient probabilistic treatment to be initiated. At the  
250 species level, for the Vitek MS, the two misidentifications for *N. cerradoensis* could be  
251 explained by their absence in the database and its phylogenetic proximity with *N. nova*. Another  
252 misidentification occurred for a strain of *N. nova* that was identified as *N. veterana*. Because

253 these two species belong to the *N. nova* complex, this misidentification is also unsurprising. By  
254 contrast, the two other misidentifications cannot be explained. Concerning environmental  
255 isolates, only species present in the databases were correctly identified (*N. abscessus*, *N.*  
256 *cyriacigeorgica*, and *N. asteroides*), and all other unidentified species corresponded to species  
257 that were absent from the manufacturer's databases, except *N. ignorata* and *N. salmonicida*, for  
258 which one strain of each is present in the Bruker database. Thus, if only commercial databases  
259 are used, MALDI-TOF MS is not currently a good tool for identifying environmental species,  
260 as a very few spectra have been generated for these species.

261 The impact of the threshold modification with the Bruker Biotyper is an important point that  
262 has been discussed in many publications (17,19,25,26,27). It appears particularly relevant for  
263 *Mycobacterium* and *Nocardia* because of the difficulties associated with identifying these  
264 organisms. For Blosser et al., a score threshold of 1.8 was sufficient to identify *Nocardia* to the  
265 species/species complex level. Our data suggest that 1.8 could be an acceptable score threshold,  
266 since as with the 1.7 score threshold, two misidentifications were observed for the two  
267 *N.cerradonensis* isolates. Thus, a threshold lowering from 2 to 1.8 enables the species level  
268 identification of 10% more isolates with the BMEP and 16% more with the MPEP, even though  
269 the number of unidentified isolates remains the same.

270 Recently, BioMérieux updated their VITEK MS IVD database, and this new version (version  
271 3.0) includes the 14 species that are available in the SARAMIS database. The performance of  
272 this new database is interesting, as 90% of tested isolates were identified (23,24). However,  
273 other studies need to be performed using the VITEK MS to confirm these results.

274 Several limitations of our study should be noted. First, Bennett agar is a medium that is rarely  
275 used in routine laboratories, but it is often employed by the Observatoire Français des  
276 Nocardioses. However, it was not used to build databases, and the influence of medium on  
277 spectra is well established. Thus, the use of more common media employed to cultivate

278 *Nocardia*, such as BCYE, sheep blood agar, chocolate agar may have increased the  
279 identification rates, as these media were used to build the databases. In our study, deposits were  
280 not performed in duplicate, and no re-extractions were made. Some authors have noted that  
281 duplicate deposits and re-extractions can improve identification rates (20); thus, it would be  
282 interesting to evaluate if these supplementary steps could improve our identification rates.  
283 Although direct deposits were not tested, a recent study yielded good results using this approach  
284 (29); thus, it would be interesting to evaluate this type of depositing method.  
285 In conclusion, the results of this study highlight the advantages and drawbacks of two different  
286 extraction protocols. Concerning the Bruker Biotyper, we confirmed that a score of 1.8 is an  
287 acceptable threshold for species identification. Although highly prevalent species have been  
288 well identified, the improvement of databases is needed with respect to species with  
289 intermediate and low prevalence. However, when at least a *Nocardia* genus level identification  
290 is obtained, it is an acceptable result. Thus, we recommended use of MALDI-TOF MS for first  
291 line identification of isolates, and if no identification is obtained for colonies suspected of being  
292 *Nocardia*, the use of DNA sequencing is imperative.

293

#### 294 REFERENCES

- 295 1. Conville PS, Brown-Elliott BA, Smith T, Zelazny AM. The Complexities of *Nocardia* Taxonomy and  
296 Identification. Kraft CS, editor. J Clin Microbiol. 2017 Nov 8;56(1).
- 297 2. Haussaire D, Fournier P-E, Djiguiba K, Moal V, Legris T, Purgus R, et al. Nocardiosis in the south  
298 of France over a 10-years period, 2004–2014. Int J Infect Dis. 2017 Apr;57:13–20.
- 299 3. Le Coustumier EM, Denes E, Martin C, Weinbreck P. Nocardiose : analyse rétrospective d'une  
300 série de 19 cas. Rev Médecine Interne. 2017 Feb;38(2):81–9.
- 301 4. Wilson JW. Nocardiosis: Updates and Clinical Overview. Mayo Clin Proc. 2012 Apr;87(4):403–7.
- 302 5. Anagnostou T, Arvanitis M, Kourkoumpetis TK, Desalermos A, Carneiro HA, Mylonakis E.  
303 Nocardiosis of the Central Nervous System: Experience From a General Hospital and Review of  
304 84 Cases From the Literature. Medicine (Baltimore). 2014 Jan;93(1):19–32.

- 305 6. Jiang Y, Huang A, Fang Q. Disseminated nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum* in an  
306 immunocompetent host: A case report and literature review. *Exp Ther Med*. 2016  
307 Nov;12(5):3339–46.
- 308 7. Liu WL, Lai CC, Ko WC, Chen YH, Tang HJ, Huang YL, et al. Clinical and microbiological  
309 characteristics of infections caused by various *Nocardia* species in Taiwan: a multicenter study  
310 from 1998 to 2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Nov;30(11):1341–7.
- 311 8. Munoz J, Mirelis B, Aragon LM, Gutierrez N, Sanchez F, Espanol M, et al. Clinical and  
312 microbiological features of nocardiosis 1997-2003. *J Med Microbiol*. 2007 Apr 1;56(4):545–50.
- 313 9. Valdezate S, Garrido N, Carrasco G, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Navarro AM, et al.  
314 Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain. *J*  
315 *Antimicrob Chemother*. 2016 Dec 20;dkw489.
- 316 10. Brown-Elliott BA, Brown JM, Conville PS, Wallace RJ. Clinical and Laboratory Features of the  
317 *Nocardia* spp. Based on Current Molecular Taxonomy. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Apr;19(2):259–  
318 82.
- 319 11. Xiao M, Pang L, Chen SC-A, Fan X, Zhang L, Li H-X, et al. Accurate Identification of Common  
320 Pathogenic *Nocardia* Species: Evaluation of a Multilocus Sequence Analysis Platform and  
321 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Woo PC, editor.  
322 *PLOS ONE*. 2016 Jan 25;11(1):e0147487.
- 323 12. McTaggart LR, Richardson SE, Witkowska M, Zhang SX. Phylogeny and Identification of *Nocardia*  
324 Species on the Basis of Multilocus Sequence Analysis. *J Clin Microbiol*. 2010 Dec;48(12):4525–  
325 33.
- 326 13. Alatoon AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. Comparison of Direct Colony  
327 Method versus Extraction Method for Identification of Gram-Positive Cocci by Use of Bruker  
328 Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry . *J*  
329 *Clin Microbiol*. 2011 Aug;49(8):2868–73.
- 330 14. Verroken A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang T-D, Wauters G, et al. Evaluation of  
331 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification  
332 of *Nocardia* Species. *J Clin Microbiol*. 2010 Nov 1;48(11):4015–21.
- 333 15. Segawa S, Nishimura M, Sogawa K, Tsuchida S, Murata S, Watanabe M, et al. Identification of  
334 *Nocardia* species using matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight mass  
335 spectrometry. *Clin Proteomics* [Internet]. 2015 Dec [cited 2017 Mar 22];12(1). Available from:  
336 <http://www.clinicalproteomicsjournal.com/content/12/1/6>
- 337 16. Wilen CB, McMullen AR, Burnham C-AD. Comparison of Sample Preparation Methods,  
338 Instrumentation Platforms, and Contemporary Commercial Databases for Identification of  
339 Clinically Relevant Mycobacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight  
340 Mass Spectrometry. Land GA, editor. *J Clin Microbiol*. 2015 Jul;53(7):2308–15.
- 341 17. Dunne WM, Doing K, Miller E, Miller E, Moreno E, Baghli M, et al. Rapid Inactivation of  
342 Mycobacterium and *Nocardia* Species before Identification Using Matrix-Assisted Laser  
343 Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2014 Oct  
344 1;52(10):3654–9.

- 345 18. Buckwalter SP, Olson SL, Connelly BJ, Lucas BC, Rodning AA, Walchak RC, et al. Evaluation of  
346 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification  
347 of Mycobacterium species, Nocardia species, and Other Aerobic Actinomycetes. Forbes BA,  
348 editor. *J Clin Microbiol*. 2016 Feb;54(2):376–84.
- 349 19. Carrasco G, de Dios Caballero J, Garrido N, Valdezate S, Cantón R, Sáez-Nieto JA. Shortcomings  
350 of the Commercial MALDI-TOF MS Database and Use of MLSA as an Arbiter in the Identification  
351 of Nocardia Species. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Apr 21 [cited 2017 Mar 27];7. Available  
352 from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4838697/>
- 353 20. Blosser SJ, Drake SK, Andrasko JL, Henderson CM, Kamboj K, Antonara S, et al. Multicenter  
354 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Study for  
355 Identification of Clinically Relevant Nocardia spp. Land GA, editor. *J Clin Microbiol*. 2016  
356 May;54(5):1251–8.
- 357 21. Khot PD, Bird BA, Durrant RJ, Fisher MA. Identification of Nocardia Species by Matrix-Assisted  
358 Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. Land GA, editor. *J Clin*  
359 *Microbiol*. 2015 Oct;53(10):3366–9.
- 360 22. Hsueh P-R, Lee T-F, Du S-H, Teng S-H, Liao C-H, Sheng W-H, et al. Bruker Biotyper Matrix-  
361 Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for  
362 Identification of Nocardia, Rhodococcus, Kocuria, Gordonia, Tsukamurella, and Listeria Species.  
363 *J Clin Microbiol*. 2014 Jul;52(7):2371–9.
- 364 23. Girard V, Mailler S, Welker M, Arsac M, Cellière B, Cotte-Pattat P-J, et al. Identification of  
365 mycobacterium spp. and nocardia spp. from solid and liquid cultures by matrix-assisted laser  
366 desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Diagn Microbiol Infect*  
367 *Dis*. 2016 Nov;86(3):277–83.
- 368 24. Girard V, Mailler S, Polsinelli S, Jacob D, Saccomani MC, Celliere B, et al. Routine identification  
369 of Nocardia species by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017  
370 Jan;87(1):7–10.
- 371 25. Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, Flandrois J-P, Boiron P, Laurent F. Use of PCR-  
372 Restriction Enzyme Pattern Analysis and Sequencing Database for hsp65 Gene-Based  
373 Identification of Nocardia Species. *J Clin Microbiol*. 2006 Feb 1;44(2):536–46.
- 374 26. Tan C-K, Lai C-C, Lin S-H, Liao C-H, Chou C-H, Hsu H-L, et al. Clinical and microbiological  
375 characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging Nocardia species in Taiwan,  
376 1998–2008. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Jul;16(7):966–72.
- 377 27. Khot PD, Couturier MR, Wilson A, Croft A, Fisher MA. Optimization of Matrix-Assisted Laser  
378 Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Analysis for Bacterial Identification. *J*  
379 *Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):3845–52.
- 380 28. Mather CA, Rivera SF, Butler-Wu SM. Comparison of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-  
381 Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for  
382 Identification of Mycobacteria Using Simplified Protein Extraction Protocols. *J Clin Microbiol*.  
383 2014 Jan;52(1):130–8.
- 384 29. Yarbrough ML, Lainhart W, Burnham C-AD. Identification of Nocardia, Streptomyces, and  
385 Tsukamurella using MALDI-TOF MS with the Bruker Biotyper. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017  
386 Oct;89(2):92–7.

387

388

389

390 **Table1** Organisms tested

Species	No.of strains
<b>Clinical <i>Nocardia</i> species</b>	132
<b>High prevalence species</b>	99
<i>N. farcinica</i>	42
<i>N. nova</i>	23
<i>N. cyriaci-georgica</i>	17
<i>N. abscessus/asiatica</i>	17
<b>Intermediate prevalence species</b>	26
<i>N. wallacei/transvalensis</i>	8
<i>N. brasiliensis</i>	7
<i>N. veterana</i>	5
<i>N. otitidiscaviarum</i>	3
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	3
<b>Low prevalence species</b>	7
<i>N. paucivorans</i>	2
<i>N. cerradoensis</i>	2
<i>N. shimofusensis/higoensis</i>	1
<i>N. beijingensis</i>	1
<i>N. flavorosea/rhamnosiphila/sienata</i>	1
<b>Environmental <i>Nocardia</i> species</b>	60
<i>N. abscessus/asiatica</i>	7
<i>N. cyriaci-georgica</i>	8
<i>N. asteroides</i>	18
Other <i>Nocardia</i> species	27
<i>N. salmonicida</i>	9
<i>N. takedensis</i>	4
<i>N. ignorata/fluminea</i>	2
<i>N. fluminea/soli</i>	2
<i>N. jejuensi</i>	2
<i>N. pseudovaccinii</i>	2
<i>N. goodfellowii</i>	2
<i>N. bhagyanarayanae</i>	1
<i>N. rhamnosiphila</i>	1
<i>N. vinacea</i>	1
<i>N. iowensis</i>	1
<b>Other Actinobacteria</b>	15
<i>Gordonia sputi</i>	2
<i>Gordonia terrae</i>	1
<i>Gordonia bronchialis</i>	1

<i>Rhodococcus equii</i>	1
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	1
<i>Rhodococcus rhodnii</i>	1
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	1
<i>Streptomyces somaliensis</i>	1
<i>Streptomyces albofaciens</i>	1
<i>Streptomyces griseus</i>	1
<i>Rothia aeria</i>	1
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1
<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	1
<i>Actinomadura madurae</i>	1

391

**Table 2** Identification results

Analyzer	Extraction protocol	BMEP	MPEP
Bruker Biotyper	No. of isolates with a correct species ID <sup>a</sup> (%)	76 (57.6)	57 (43.2)
	No. of isolates with only a correct genus ID <sup>b</sup> (%)	26 (19.7)	27 (20.4)
	No. of isolates with no ID (%)	30 (22.7)	48 (36.4)
	No. of isolates with an incorrect species ID (%)	0 (0)	0 (0)
	No. of isolates with an incorrect genus ID (%)	0 (0)	0 (0)
Vitek MS	No. of isolates with a correct species ID (%)	112 (84.8)	110 (83.3)
	No. of isolates with no ID (%)	13 (9.8)	14 (10.6)
	No. of isolates with only a correct genus ID (%)	7 (5.3)	3 (2.3)
	No. of isolates with an incorrect species ID (%)	0 (0)	5 (3.8)
	No. of isolates with an incorrect genus ID (%)	0 (0)	0 (0)

<sup>a</sup>score  $\geq 2$

<sup>b</sup>score between 1.99 and 1.7

392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401

402  
403  
404  
405  
406  
407

**Table 3** Identification rates by species

Species	No. of isolates (n = 132)	Bruker Biotyper				Vitek MS	
		No. of isolates with a species ID (score ≥ 2) (%)		No. of isolates with a species ID (score ≥ 1.8) (%)		No. of isolates with a species ID (%)	
		BMEP	MPEP	BMEP	MPEP	BMEP	MPEP
<b>High prevalence species</b>	99	69 (70)	53 (54)	81 (82)	73 (74)	85 (86)	84 (85)
<i>N. farcinica</i>	42	35 (83)	23 (55)	37 (88)	30 (71)	39 (93)	41 (98)
<i>N. nova</i>	23	17 (74)	17 (74)	19 (83)	19 (83)	18 (78)	17 (74)
<i>N. cyriaciageorgica</i>	17	10 (59)	5 (29)	12 (71)	12 (71)	14 (82)	11 (65)
<i>N. abscessus/asiatica</i>	17	7 (41)	8 (47)	13 (76)	12 (71)	14 (82)	15 (88)
<b>Intermediate prevalence species</b>	26	5 (19)	2 (8)	6 (23)	3 (12)	25 (96)	24 (92)
<i>N. wallacei/transvalensis</i>	8	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (88)	7 (88)
<i>N. brasiliensis</i>	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	7 (100)	7 (100)
<i>N. veterana</i>	5	2 (40)	0 (0)	3 (60)	1 (20)	5 (100)	4 (80)
<i>N. pseudobrasiliensis</i>	3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (100)	3 (100)
<i>N. otitidiscaviarum</i>	3	3 (100)	2 (67)	3 (100)	2 (67)	3 (100)	3 (100)
<b>Low prevalence species</b>	7	2 (29)	2 (29)	2 (29)	2 (29)	2 (29)	2 (29)
<i>N. paucivorans</i>	2	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)	2 (100)
<i>N. cerradoensis</i>	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. shimofusensis/higoensis</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. beijingensis</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>N. flavorosea/rhamnosiphila/sienata</i>	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
total	132	76	57	89	78	112	110

408  
409  
410  
411  
412  
413  
414  
415  
416

417  
418  
419  
420  
421

**Table 4** Misidentifications

Species	Bruker Biotyper		Vitek MS	
	BMEP	MPEP	BMEP	MPEP
<i>N. cerradoensis</i>	<i>N. nova</i> (1.78)	no ID (1.219)	<i>N. sp</i> (79.9)	<i>N. nova</i> (show details)
<i>N. cerradoensis</i>	<i>N. nova</i> (1.728)	no ID (1.338)	<i>N. sp</i> (75.2)	<i>N. nova</i> (show details)
<i>N. wallacei/transvalensis</i>	no ID (1.307)	no ID (1.334)	<i>N. wallacei</i> (show details)	<i>N. farcinica</i> (99.9)
<i>N. nova</i>	no ID (0)	no ID (0)	<i>N. sp</i> (79.9)	<i>N. veterana</i> (show details)
<i>N. abscessus/asiatica</i>	<i>N. abscessus</i> (2.05)	no ID (0)	no identification (0)	<i>N. farcinica</i> (show details)

422  
423

**Table 5** Impact of threshold modification

Extraction protocol	BMEP				MPEP			
	≥ 1.7	≥ 1.8	≥ 1.9	≥ 2	≥ 1.7	≥ 1.8	≥ 1.9	≥ 2
Score threshold								
Species identification rate (%)	95 (72)	89 (67.4)	84 (63.7)	76 (57.6)	80 (60.6)	78 (59.1)	72 (54.5)	57 (43.2)
Only genus identification rate (%)	5 (3.8)	13 (9.9)	18 (13.6)	26 (19.7)	4 (3)	6 (4.5)	12 (9.1)	27 (20.4)
No identification (%)	30 (22.7)	30 (22.7)	30 (22.7)	30 (22.7)	48 (36.4)	48 (36.4)	48 (36.4)	48 (36.4)
Species misidentification rate (%)	2 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

424

## Annexe 4 : Collaboration sur le sujet des infections à *N. brasiliensis* ayant conduit à une publication.

Hindawi  
BioMed Research International  
Volume 2018, Article ID 7314054, 10 pages  
<https://doi.org/10.1155/2018/7314054>



### Research Article

## High Intraspecific Genetic Diversity of *Nocardia brasiliensis*, a Pathogen Responsible for Cutaneous Nocardiosis Found in France: Phylogenetic Relationships by Using *sod* and *hsp65* Genes

D. Kosova-Maali,<sup>1</sup> E. Bergeron,<sup>1</sup> Y. Maali,<sup>2</sup> T. Durand,<sup>3</sup> J. Gonzalez,<sup>4</sup> D. Mounié,<sup>1</sup> H. Sandoval Trujillo,<sup>4</sup> P. Boiron,<sup>1</sup> M.-C. Salinas-Carmona,<sup>5</sup> and V. Rodriguez-Nava<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Research Group on "Bacterial Opportunistic Pathogens and Environment", UMR Ecologie Microbienne, CNRS 5557, INRA 1418, UCBL, Université de Lyon, VetAgro Sup, Faculté de Pharmacie, 8 avenue Rockefeller, Lyon, France

<sup>2</sup>Centre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Team "Pathogenesis of Staphylococcal Infections", Université de Lyon 1, Lyon, France

<sup>3</sup>Laboratoire de Bactériologie, Institut des Agents Infectieux, Centre de Biologie et Pathologie Nord, 103 grande rue de la Croix-Rouisse, 69004 Lyon, France

<sup>4</sup>Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, 04960 Ciudad de México, Mexico

<sup>5</sup>Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo Leon, Monterrey, NL, Mexico

Correspondence should be addressed to V. Rodriguez-Nava; [veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr](mailto:veronica.rodriguez-nava@univ-lyon1.fr)

Received 9 February 2018; Accepted 31 March 2018; Published 20 May 2018

Academic Editor: Charles Spencer

Copyright © 2018 D. Kosova-Maali et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study aims at genetic characterization and phylogenetic relationships of *Nocardia brasiliensis* focusing by using housekeeping *rrs*, *hsp65*, and *sodA* genes. *N. brasiliensis* is the species responsible for 80% of cases of actinomycetoma, one form of cutaneous nocardiosis which occurs mainly in tropical regions reaching immunocompetent patients in which the disease can lead to amputation. We analyze 36 indigenous cases of *N. brasiliensis* that happened in France. Phylogenetic analysis targeting *rrs* gene showed no robustness at phylogenetic nodes level. However, the use of a concatenation of *hsp65* and *sodA* genes showed that the tested strains surprisingly ranked in 3 well-defined genotypes. Genotypes 2 and 3 were phylogenetically closer to each other and both diverged from genotype 1 sustained by a high bootstrap of 81%. This last genotype hosts all the cases of pulmonary forms (3), the sole cerebral form, and almost all the cases of immunocompromised patients (3 out of 4). Moreover, excepting one of them, all the strains belonging to this group present a susceptibility to imipenem which is not the case in the other genotypes that rarely count among them strains being susceptible to this drug. The haplotype diversity (Hd) of *hsp65* (0.927) and *sodA* (0.885) genes was higher than that of *rrs* (0.824). For this gene, we obtained 16 polymorphic sites whereas, for *hsp65* and *sodA* genes, up to 27 and 29 were identified, respectively. This study reveals that these two genes have an important genetic discriminatory power for the evaluation of the intraspecific genetic variability of *N. brasiliensis* and they may be useful for identification purposes at species level. This study also reveals the possible existence of a new species harbored by genotype 1.

### 1. Introduction

*Nocardia* is a genus belonging to the aerobic actinomycetes group of bacteria which are Gram-positive bacilli and showing branching filamentous forms [1]. They are

saprophytic ubiquitous bacteria which can be found in several environments such as fresh water and saltwater, soil, dust, decaying vegetation, and decaying fecal deposits from animals [1]. Nevertheless, these environmental bacteria can be opportunistic pathogens and lead to human

infectious diseases called “nocardiosis” [2]. Nocardiosis can be discriminated into two groups: invasive infection, mainly caused by *N. asteroides*, presenting commonly as pneumonia in patients who are immunocompromised, have underlying chronic lung disease, and are with a possible dissemination to other organs [3], and cutaneous infection via a cut or abraded skin, which can be manifest clinically as (i) abscess and cellulitis, (ii) lymphangitis, (iii) skin infection secondary to dissemination, and (iv) actinomycetoma. This latter group is the most amazing infection due to their severity characterized by the presence of tumefaction, subcutaneous nodules, destructive granulomata, fistulas, and pus [2, 4].

*N. brasiliensis* is the species isolated from the majority (approximately 80%) of cases of cutaneous nocardiosis, especially in actinomycetoma [2]. This species is more commonly isolated in areas with tropical or subtropical climates such as South America, Asia, and Africa. Due to false diagnosis, rural lifestyles, and poor access to care in these countries, *N. brasiliensis* nocardiosis constitutes a real public health problem that can lead, in the absence of treatment, to amputations and death in young populations. On the basis of epidemiological surveys conducted in France, the number of cases of nocardiosis between 2000 and 2007 according to the French Nocardiosis Observatory (OFN) was 607 with *N. farcinica* and *N. nova* being the most frequent species [5]. However, no data currently exists on the phylogenetic relationships between the indigenous *N. brasiliensis* strains of tropical origin and native strains isolated in France. Routine genus/species identification of *Nocardia* was based on macroscopic, microscopic, and biochemical characteristics. The methods described by Boiron et al. [6] were used to determine the decomposition of adenine, casein, hypoxanthine, tyrosine, and xanthine. In addition to the phenotype-based methods, species-level identification is mainly genetically based, nowadays. Classically, 16S rRNA (*rrs*) gene sequencing is generally used for the species-level identification [7, 8], but it fails to discriminate among some species of *Nocardia* because it does not have enough polymorphism to differentiate them at the species level. Multilocus sequence analysis (MLSA) using concatenated sequences of several housekeeping genes such as superoxide dismutase A (*sodA*) and heat shock protein 65 (*hsp65*) has been increasingly used to provide higher accuracy and discriminatory power in the molecular identification of *Nocardia* spp. [9, 10]. Indeed, a recent study seeking to identify new molecular targets shows that the polymorphism observed in the *sodA* gene sequence contains variable regions that allow the discrimination of closely related *Nocardia* species [9].

The aim of the present study was to perform a genetic characterization and assess the phylogenetic relationships of *Nocardia brasiliensis* focusing on using housekeeping *rrs*, *hsp65*, and *sodA* genes, for 36 autochthonous *N. brasiliensis* strains isolated in France and analyzed by the OFN between 2002 and 2012. Phenotypic characterization was also conducted by assessing antimicrobial resistance profiles, metabolic profiles, and culture condition.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Bacterial Strains and Culture Media.** A collection of 36 human clinical strains of *N. brasiliensis* was studied (Table 1). All strains were identified as such, at species level by the French Nocardiosis Observatory (OFN) by genetic approach. Moreover, six *Nocardia* reference strains belonging to *N. brasiliensis* clade [9] were also used: *N. brasiliensis* ATCC 19296<sup>T</sup> (unknown), *N. altamirensis* DSM 44997<sup>T</sup> (karstic cave), *N. boironii* DSM 101696<sup>T</sup> (pus sample), *N. iowensis* DSM 45197<sup>T</sup> (garden soil), *N. tenerifensis* DSM 44704<sup>T</sup> (rhizosphere), and *N. vulneris* DSM 45737<sup>T</sup> (human leg wound). Prior to the assays, strains were cultured 72 hours in Bennett medium (made in the laboratory) aerobically at 37°C.

**2.2. Growth Test on Culture Media.** From 0.5 McF bacterial suspension, bacterial growth was evaluated on three culture media: (i) bromocresol purple (BCP) (Biomérieux, Marcy l'Étoile), (ii) Bennett (made in the laboratory), and (iii) Middlebrook (Biomérieux, Marcy l'Étoile). One hundred microliters from bacterial suspension standardized was inoculated on the different plate of culture media. The plates were incubated at 37°C and the observations were performed at 48, 72, and 96 hours.

**2.3. Antimicrobial Susceptibility.** The susceptibility of the isolates to different antimicrobials was determined by disk diffusion method with a panel of 31 antibiotics (Biorad, Marnes-la-Coquette France) on Muller Hinton E medium (Biomérieux, Marcy l'Étoile, France). Susceptibility testing was done with amikacin 30 µg, gentamycin 15 µg, tobramycin 10 µg, ciprofloxacin 5 µg, levofloxacin 5 µg, moxifloxacin 5 µg, minocycline 30 µg, doxycycline 30 µg, tigecycline 15 µg, cefotaxime 30 µg, ceftriaxone 30 µg, ceftazidime 30 µg, cefuroxime 30 µg, amoxicillin 25 µg, amoxicillin + clavulanic acid 20/10 µg, ampicillin 10 µg, ertapenem 10 µg, meropenem 10 µg, imipenem 10 µg, vancomycin 30 µg, pristinamycin 15 µg, erythromycin 15 µg, trimethoprim + sulfamethoxazole 1.25/23.75 µg, rifampicin 30 µg, and linezolid 30 µg.

From visible colonies, bacterial suspension was done in sterile water, using a cotton swab to obtain a concentration of 0.5 McFarland according to the Clinical and Laboratory Standards Institute standard M24-A2 [11]. Seeding was done according to the swab method. In this latter, the bacterial inoculum was spread on the agar using a sterile cotton swab in three different directions. The disks were dispensed with a dispenser and the plates were incubated at 37°C for 72 hours and read manually according to the thresholds defined in the recommendations of the SFM 2013 [12].

**2.4. Substrate Degradation.** The methods of Boiron et al. [6], Goodfellow et al. [13, 14], and Goodfellow and Lechevalier [15] were used to determine the decomposition of adenine, casein, and uric acid [9]. Clinical strains of *N. brasiliensis* and the strains of species belonging to the *N. brasiliensis* clade (*N. brasiliensis*, *N. altamirensis*, *N. iowensis*, *N. tenerifensis*, *N. boironii*, and *N. vulneris*) were tested [9]. Strains *N. boironii*

TABLE 1: Table of clinical strains including the type of tropism observed in host, their corresponding *sodA/hsp65* genotypes, and drug phenotypes.

Sample date	Nature of sampling	Patient record	Immunosuppressed	Genotype <i>sodA/hsp65</i>	Tropism	Pristinamycin	Imipenem	Amikacin	Trimethoprim + sulfamethoxazole
04/2002	Intraoperative tissue	02.56	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
12/2003	Pus from cutaneous thigh abscess	04.21	Yes	G1	Cutaneous	R	S	S	S
2004	Pus from cutaneous abscess	04.101	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
07/2005	Expectoration then LBA	05.64	Yes	G1	Lung	R	S	S	S
01/2005	Skin biopsy	05.12	No	G1	Cutaneous	R	S	S	S
07/2005	Phalanx biopsy	05.63	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2005	CSF	05.77	No	G1	Brain	R	R	S	S
11/2005	-	3247	No	G3	Unknown	R	S	S	S
2007	Cutaneous abscess	07.168	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
10/2008	Wound of forehead	08.178	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
11/2008	Subcutaneous abscess	08.188	No	G3	Subcutaneous	R	R	S	S
10/2008	Elbow abscess	2985	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
03/2008	-	9044	No	G2	Unknown	R	R	S	S
03/2009	Pus of leg abscess	09.71	No	G2	Cutaneous	R	S	S	S
04/2009	Bronchial aspiration	09.106	No	G1	Lung	R	S	S	S
10/2009	Bronchial aspiration	09.244	Yes	G1	Lung	R	S	S	S
12/2009	Finger skin	09.280	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
10/2009	Pus from the lip	10.16	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
02/2010	Finger abscess	10.35	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
05/2010	Hand abscess	10.82	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
05/2010	Toe abscess	10.93	Yes	G3	Cutaneous	R	R	S	S
09/2010	Leg wound	10.146	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
11/2010	Pus finger	10.180	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
11/2010	Leg wound	12786	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
04/2010	-	14229	No	G2	Unknown	R	S	S	S
07/2010	Sepsis hand	45762	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2011	Pus	11.44	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
05/2011	Cutaneous abscess	11.73	No	G1	Cutaneous	R	S	S	S
05/2011	Hand wound	11.80	No	G1	Cutaneous	R	S	S	S
08/2011	Cutaneous	11.116	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
2011	Thigh abscess	11.140	No	G2	Cutaneous	R	R	S	S
09/2011	Knee wound	11.151	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2011	Hand wound	11.172	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
12/2011	Cutaneous abscess	11.189	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S
2012	-	12.08	No	G1	Unknown	R	S	S	S
02/2012	Cutaneous abscess	12.28	No	G3	Cutaneous	R	R	S	S

DSM 101696<sup>T</sup>, *N. brasiliensis* ATCC 19296<sup>T</sup>, and *N. vulneris* DSM 45737<sup>T</sup> were incubated at 37°C, and *N. altamirensis* DSM 44997<sup>T</sup>, *N. tenerifensis* DSM 44704<sup>T</sup>, and *N. iowensis* DSM 45197<sup>T</sup> were incubated at 28°C [9]. The readings were performed at 3, 7, 10, 14, 17, and 21 days.

**2.5. Methods of DNA Extraction.** DNA extraction from *Nocardia* strains was performed with achromopeptidase according to the method reported by Rodríguez-Nava et al. [10]. Colonies were picked off with a loop, and one loopful was suspended in 200 µL of sterile water containing a dozen glass beads and vortexed for 5 minutes. The mixture was then incubated for 15 minutes at 70°C. The suspension supplemented with 3.4 µL of achromopeptidase (Sigma, Steinheim, Germany) at 10 U/mL was incubated at 55°C for 15 minutes. The suspensions were then centrifuged for 5 minutes at 13,000 rpm. The supernatants were stored at -20°C until use.

#### 2.6. Amplification and Sequencing

**Gene rrs.** A 606-bp fragment of the *rrs* gene was amplified with primers Noc1, 5'-GCTTAAACACATGCAAGTCG-3', and Noc2, 5'-GAATTCCAGTCTCCCTG-3', and PCR program and reaction mixture were carried out according to the recommendations of Rodríguez-Nava et al. [10].

**Gene hsp65.** A 441-bp fragment of the *hsp65* gene encoding the 65-kDa heat shock protein was amplified with primers described by Telenti et al. (TB11: 5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3' and TB12: 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT-3') [16]. PCR program and reaction mixture were carried out according to the recommendations of Sánchez-Herrera et al. [17].

**Gene sodA.** A 440-bp fragment of the *sodA* gene was amplified and sequenced with primers SodV1 (5'-CAC CAY WSC AAG CAC CA-3') and SodV2 (5'-CCT TAG CGT TCT GGT ACT G-3') where Y = C or T, W = A or T, and S = C or G. The amplification was also done according to the recommendations of Sánchez-Herrera et al. [17].

All resulting PCR products were sequenced and verified (Biofidal, Lyon, France).

The breakpoints for identification based in *sodA* and *hsp65* genes are 99% for each one [17, 18]. For the *rrs* gene, a higher breakpoint of 99.6% is used, according to CLSI [19].

**2.7. Phylogenetic Analysis.** The *rrs* gene sequences which we obtained for the 36 clinical isolates of *N. brasiliensis* and the reference strains were aligned manually for the comparative phylogenetic analysis using the Seaview program.

MLSA was performed using *hsp65* and *sodA* sequences of the strains collection. The trimmed aligned sequences were concatenated in the order *sodA-hsp65* to generate an 846 bp sequence using the Seaview program. The Seaview program was also used to infer the evolutionary trees according to the neighbour-joining method [20] and Kimura's two-parameter model [21]. The robustness of the tree was performed with a bootstrap of 1000 replicates.

Taking into account the breakpoints for identification at species level of *sodA* and *hsp65* genes individually, the breakpoint for concatenated sequence has been also fixed at 99%.

**2.8. DNA Polymorphism of rrs, hsp65, and sodA Genes.** The number of haplotypes, the haplotype diversity (Hd), the number of polymorphic sites, and other variables were obtained with DnaSP software [22].

### 3. Results

**3.1. Growth on Culture Medium.** The three culture media allowed the growth of clinical strains of *N. brasiliensis*. The Bennett medium showed abundant and rapid growth (48 hours). Middlebrook medium showed strong growth but also it was slightly slower (72 hours). The BCP medium presented interesting results with good rapid growth at 48 hours. *N. brasiliensis* clade tested type strains showed similar patterns to the clinical strains, except that *N. boironii* had a difficult growth on BCP and no growth on Middlebrook; this seems a peculiarity of this species.

**3.2. Antimicrobial Susceptibilities.** Eight out of 31 antibiotic molecules tested were active on all the strains' collection: linezolid, tigecycline, trimethoprim + sulfamethoxazole, moxifloxacin, amikacin, amoxicillin + clavulanic acid, tobramycin, and gentamycin. Regarding the imipenem and pristinamycin molecules, resistance was observed on the majority of clinical isolates of *N. brasiliensis* (Table 1).

**3.3. Degradation of Substrate.** The assimilation test of adenine and uric acid proved negative for all the strains tested of the *N. brasiliensis* clade including clinical and reference ones. The casein degradation test showed that all clinical strains are able to metabolize casein except the clinical strain 12.28. In addition our result showed that some types of strains such as *N. vulneris*, *N. tenerifensis*, *N. boironii*, and *N. iowensis* are also able to degrade casein in the same way as *N. brasiliensis* except *N. altamirensis*. Casein is ultimately a marker that can be used for the phenotypic identification of the *N. brasiliensis* clade and not the *N. brasiliensis* species as it has been believed for many years.

**3.4. Phylogeny.** Primers Noc1 and Noc2 amplified the expected 606-bp fragment of the *rrs* gene for all the collection strains. Phylogenetic trees (Figure 1) based upon *rrs* showed homogeneity within clinical strains of *N. brasiliensis*. For this, the *rrs* gene is not relevant to show intraspecies diversity.

In addition, based upon the concatenation of *sodA* and *hsp65* housekeeping genes, the phylogenetic tree generated (Figure 2) had several distinct genotypes: (i) genotype 1 containing clinical strains, (ii) genotype 2 harboring some clinical strains, and (iii) genotype 3 harboring some clinical strains and *N. brasiliensis* ATCC 19296<sup>T</sup>. For the tropical *N. brasiliensis* HUJEG01 strain, it is observed that it does not belong to any of the 3 genotypes and is positioned alone

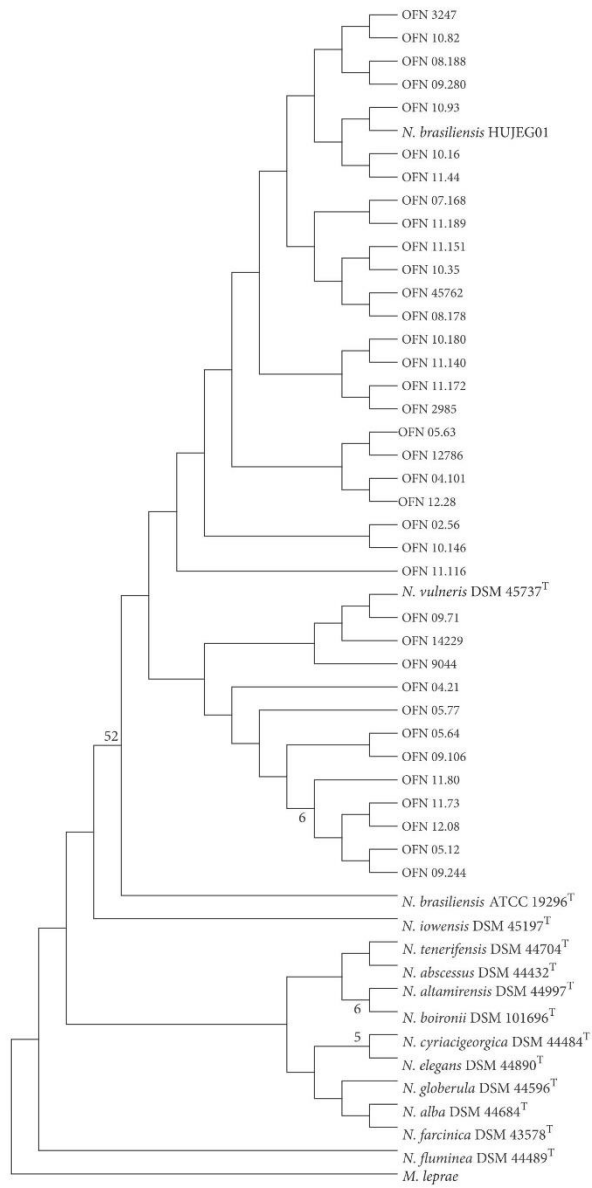


FIGURE 1: Phylogenetic distribution of *rrs* gene of 36 *N. brasiliensis* clinical strains analyzed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model, and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% (Seaview) were reported.

- [9] J. M. Gilquin, B. Riviere, V. Jurado et al., "First Case of Actinomycetoma in France Due to a Novel," *mSphere*, vol. 1, no. 6, p. e00309-16, 2016.
- [10] V. Rodríguez-Nava, A. Couble, G. Devulder, J.-P. Flandrois, P. Boiron, and F. Laurent, "Use of PCR-restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 gene-based identification of *Nocardia* species," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 536–546, 2006.
- [11] *Susceptibility testing of Mycobacteria, Nocardiae, and other aerobic actinomycetes, Approved Standard*, vol. 56, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2011, M24-A2.
- [12] "CA-SFM, "Les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie," *Paris: Société Française de Microbiologie*, 2013.
- [13] M. Goodfellow, "The genus *Nocardia* Trevisan," in *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*, A. Balows and B. I. Duerden, Eds., pp. 464–489, Edward Arnold, London, UK, 2 edition, 1998.
- [14] M. Goodfellow, *The family Nocardiaceae*, The prokaryotes, Springer, New York, NY, USA, 2 edition, 1992, 1188–1213.
- [15] M. Goodfellow and M. P. Lechevalier, "Genus *Nocardia* Trevisan," in *Bergey's manual of systematic bacteriology*, S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt, Eds., vol. 4, pp. 2350–2361, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, 1989.
- [16] A. Telenti, F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Böttger, and T. Bodmer, "Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 31, no. 2, pp. 175–178, 1993.
- [17] K. Sánchez-Herrera, H. Sandoval, D. Mouniee et al., "Molecular identification of *Nocardia* species using the *sodA* gene: Identificación molecular de especies de *Nocardia* utilizando el gen *sodA*," *New Microbes and New Infections*, vol. 19, pp. 96–116, 2017.
- [18] C. Y. Turenne, M. Semret, D. V. Cousins, D. M. Collins, and M. A. Behr, "Sequencing of *hsp65* distinguishes among subsets of the *Mycobacterium avium* complex," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 433–440, 2006.
- [19] CLSI, "Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing," in *Approved Guideline. CLSI document MM18-A*. Wayne, PA, vol. CLSI document MM18-A, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.
- [20] J. A. Soddell, F. M. Stainsby, K. L. Eales, R. M. Kroppenstedt, R. J. Seviour, and M. Goodfellow, "Millisia gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, no. 4, pp. 739–744, 2006.
- [21] V. A. Steingrube, R. W. Wilson, B. A. Brown et al., "Rapid identification of clinically significant species and taxa of aerobic actinomycetes, including *Actinomadura*, *Gordona*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and *Tsukamurella* isolates, by DNA amplification and restriction endonuclease analysis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 35, no. 4, pp. 817–822, 1997.
- [22] J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio et al., "DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 34, no. 12, pp. 3299–3302, 2017.
- [23] J. S. Cruz-Rabadán, J. Miranda-Ríos, G. Espín-Ocampo, L. J. Méndez-Tovar, H. R. Maya-Pineda, and F. Hernández-Hernández, "Non-coding RNAs are differentially expressed by *Nocardia brasiliensis* in vitro and in experimental actinomycetoma," *The Open Microbiology Journal*, vol. 11, pp. 112–125, 2017.
- [24] S. Valdezate, N. Garrido, G. Carrasco et al., "Epidemiology and susceptibility to antimicrobial agents of the main *Nocardia* species in Spain," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 72, no. 3, pp. 754–761, 2017.
- [25] C.-A. Seol, H. Sung, D.-H. Kim, M. Ji, Y.-P. Chong, and M.-N. Kim, "The first Korean case of disseminated mycetoma caused by *Nocardia pseudobrasiliensis* in a patient on long-term corticosteroid therapy for the treatment of microscopic polyangiitis," *Annals of Laboratory Medicine*, vol. 33, no. 3, pp. 203–207, 2013.
- [26] B. A. Lasker, M. Bell, H.-P. Klenk, C. Spröer, P. Schumann, and J. M. Brown, "*Nocardia vulneris* sp. nov., isolated from wounds of human patients in North America," *Antonie van Leeuwenhoek-Journal of Microbiology*, vol. 106, no. 3, pp. 543–553, 2014.
- [27] L. R. McTaggart, S. E. Richardson, M. Witkowska, and S. X. Zhang, "Phylogeny and identification of *Nocardia* species on the basis of multilocus sequence analysis," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 48, no. 12, pp. 4525–4533, 2010.
- [28] G. Carrasco, S. Valdezate, N. Garrido, P. Villalón, M. J. Medina-Pascual, and J. A. Sáez-Nieto, "Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical *Nocardia* species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 51, no. 11, pp. 3602–3608, 2013.

TABLE 3: DNA polymorphism of *rrs*, *hsp65*, and *sodA* genes from clinical *N. brasiliensis* strains isolated in France.

<i>Nocardia</i> species	Genes (bp) <sup>a</sup>	Number of haplotypes (Hd, S <sup>2</sup> , SD) <sup>b</sup>	Number of polymorphic sites
<i>N. brasiliensis</i> (N = 38: 36 clinical strains and 2 reference strains)	<i>rrs</i> (569)	16 (0.824, 0.00300, 0.055)	16
	<i>hsp65</i> (401)	22 (0.927, 0.00087, 0.029)	27
	<i>sodA</i> (406)	14 (0.885, 0.00080, 0.028)	29

<sup>a</sup>Resulting fragment size without the primers sequences; <sup>b</sup>Hd: haplotype (gene) diversity, S<sup>2</sup>: variance of haplotype diversity, and SD: standard deviation of haplotype diversity.

strains [26] with percentages of similarities on average greater than 98%.

Analysis of the phylogenetic tree (Figure 2) based on the MLSA by the concatenation of *sodA* and *hsp65* housekeeping genes showed that the isolates are surprisingly classified according to 3 genotypes. These groups were formed upon similarity percentages and existing phylogenetic distances between the sequences of the strains studied. Genotype 1 concerns a well-defined cluster containing 9 clinical strains only which is sustained by a bootstrap of 81%. This genotype hosts all the cases of pulmonary forms (3), the sole cerebral form, and almost all the cases of immunocompromised patients (3 out of 4). Moreover, eight out of twelve strains susceptible to imipenem can be found in this group. There is just one remaining strain in this group not presenting this kind of susceptibility. The reason may be an acquired resistance to this drug due to a previous treatment. This well-defined genotype evokes the possible existence of another species or a strong variability in this case. This may have been caused by environmental pressures in the ecosystem of these isolates which may have resulted in the selection of strains that may have acquired, by mutations or genetic transfer with other microorganisms, new virulence characters different from that of the strain type *N. brasiliensis*. Regarding genotypes 2 and 3, they include clinical strains and *N. brasiliensis* ATCC 19296<sup>T</sup> type strain. However, the discrimination between these 2 genotypes is less clear than that with genotype 1 because of being in weak bootstrap that is less than 50. The genetic differences do not allow distinguishing them properly and their phenotypic behavior remains similar. Then, it would be interesting to study on another gene capable of generating more divergences, for example, *gyrB* and *rpoB* genes, which have already successfully been used for studying the polymorphism of some other *Nocardia* species [27, 28].

Concerning the percentage of similarity between the type and tropical strain of *N. brasiliensis*, it is 99.82% according to the *rrs* and goes down to 98.51% with the concatenation of *sodA* and *hsp65*. The fact of highlighting a greater dissimilarity with the concatenation between the type and tropical *N. brasiliensis* strain shows the advantage of the use of 2 markers like *sodA* and *hsp65* vis-à-vis the *rrs*. The discriminatory power of these two genes may be explained by the presence of more polymorphic sites (*hsp65*: 27; *sodA*: 29) than in the case of *rrs* gene (16) and also by having Hd values higher than that of *rrs* gene (*hsp65*: 0.927; *sodA*: 0.885; *rrs*: 0.824).

It would be interesting to identify the genes involved in the virulence of different genotypes, including those of actinomycetoma. Interesting leads can be considered: (i) as

identification of virulence genes expressed using the RNAseq method or (ii) to identify noncoding RNAs [23]. In addition, to genomically distinguish *N. brasiliensis* and *N. vulneris* a specific PCR to *N. vulneris*, using a specific gene of the species, should be developed.

### Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

### Acknowledgments

The authors thank Audrey Dubost for her technical support in bioinformatics analysis.

### References

- [1] V. Kandi, "Human Nocardia Infections: A Review of Pulmonary Nocardiosis," *Human Nocardia Infections: A Review of Pulmonary Nocardiosis*, *Cureus Cureus*, vol. 7, no. 8, pp. e304–e304, 2015.
- [2] S. Maraki, S. Chochlidakis, E. Nioti, and Y. Tselentis, "Primary lymphocutaneous nocardiosis in an immunocompetent patient," *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, vol. 3, article no. 24, 2004.
- [3] M. A. Saubolle and D. Sussland, "Nocardiosis: review of clinical and laboratory experience," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, no. 10, pp. 4497–4501, 2003.
- [4] B. A. Brown-Elliott, J. M. Brown, P. S. Conville, and R. J. Wallace Jr., "Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy," *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 19, no. 2, pp. 259–282, 2006.
- [5] V. Rodriguez-Nava, D. Lebeaux, O. Lortholary, P. Boiron, and Nocardia., "Nocardia. Précis de Bactériologie Clinique," *Nocardia*, no. 2, 2007.
- [6] P. Boiron, F. Provost, and B. Dupont, "Technical protocols," In *Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose*, Institut Pasteur, Paris, France, 1993, 107-126.
- [7] A. Betrán, M. C. Villuendas, A. Rezusta, J. Pereira, M. J. Revillo, and V. Rodriguez-Nava, "Clinical significance, antimicrobial susceptibility and molecular identification of *Nocardia* species isolated from children with cystic fibrosis," *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 47, no. 3, pp. 531–535, 2016.
- [8] A. Ramirez-Radilla, V. Rodriguez-Nava, H. V. Silva-Rojas, M. Hernandez-Tellez, H. Sandoval, and N. Ramirez-Duran, "Phylogenetic identification of *Nocardia brasiliensis* strains isolated from actinomycetoma in Mexico State using species-specific primers," *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 21, no. 2, pp. 113–117, 2011.

TABLE 2: Percentage of similarity expressed in interval and mean for *sodA-hsp65* and *rrs* genes.

	<i>N. brasiliensis</i> HUJEG01		<i>N. brasiliensis</i> ATCC 19296 <sup>T</sup>		<i>N. vulneris</i> DSM 45737 <sup>T</sup>	
	<i>sodA-hsp65</i>	<i>rrs</i>	<i>sodA-hsp65</i>	<i>rrs</i>	<i>sodA-hsp65</i>	<i>rrs</i>
<i>N. brasiliensis</i> ATCC 19296 <sup>T</sup>	98.51	99.82	-	-	-	-
<i>N. vulneris</i> DSM 45737 <sup>T</sup>	98.38	98.73	98.51	98.55	-	-
<i>N. dlamirensis</i> DSM 44997 <sup>T</sup>	95.91	98.24	95.41	98.07	95.91	97.47
<i>N. boronii</i> DSM 101696 <sup>T</sup>	96.53	98.07	96.28	97.89	96.15	97.29
<i>N. iowensis</i> DSM 45197 <sup>T</sup>	94.91	97.89	95.29	97.71	94.54	97.64
<i>N. teneriffensis</i> DSM 44704 <sup>T</sup>	96.28	96.67	96.03	96.49	95.91	96.03
Genotype 1	Similarity range (%) (97.77-98.38)	-	(97.77-98.26)	-	(97.52-98.14)	-
	Similarity average (%)	98.01	97.99	-	97.67	-
Genotype 2	Similarity range (%) (98.39-98.88)	-	(98.88-99.38)	-	(98.63-98.88)	-
	Similarity average (%)	98.73	99.19	-	98.80	-
Genotype 3	Similarity range (%) (98.14-98.88)	-	(98.26-99.00)	-	(98.01-98.76)	-
	Similarity average (%)	98.63	98.76	-	98.50	-
All clinical strains	Similarity range (%) (98.57-100)	-	-	(98.38-99.82)	-	(98.01-99.09)
	Similarity average (%)	99.57	99.39	-	98.77	-

in the tree between genotypes 1 and 2. This distribution of clinical strains of *N. brasiliensis* in 3 different genotypes shows an intraspecies diversity rather important. To better understand the polymorphism showed by phylogenetic trees, we studied the percentages of the similarities between the sequences. The average percentages of similarities based on the *rrs* gene (Table 2) range from 99.39% to 99.57% between the clinical strains and the 2 reference strains of *N. brasiliensis* (type and tropical strains). According to the CLSI, the similarity percentage needed for identification at species level must be greater than or equal to a threshold of 99.6% [19]. The clinical strains that showed a similarity percentage lower than this threshold for both reference strains of *N. brasiliensis* were anyway considered as belonging to this species because no higher similarity percentage was obtained for any other species. In the same way, the *N. vulneris* type strain was also revealed to be close to clinical strains according to the average of percentage of similarity (98.77%). Between the 2 reference strains of *N. brasiliensis* the percentage of similarity is higher, up to 99.82%. The percentages of similarities based on the concatenation of the *sodA-hsp65* genes (Table 2) decrease and range now from 97.99% to 99.19% between the clinical strains and the 2 reference strains of *N. brasiliensis*. Between the type and reference strains of *N. brasiliensis* the percentage of similarity does not reach 99% this time. The comparison of the 3 genotypes between them (based on the representation of each genotype by 3 clinical strains) by using *sodA-hsp65* genes shows that genotypes 2 and 3 are closer to each other (98.97% of similarity). The average of the percentages of similarity between genotypes 1 and 2 were 97.97%, and 98.28% between genotypes 1 and 3. Finally this value goes up to 98.97% between genotypes 2 and 3. This means that the more distant genotypes between them are 1 and 2 and the closer ones are 2 and 3.

In parallel, an epidemiological study based on the clinical files was carried out, and the data were presented in Table 1. In order to know the link between the genetic diversity and the tropism of the clinical strains, a superposition of data was made between the phylogenetic tree obtained by the concatenation of *sodA* and *hsp65* and the tropism of the clinical strains (Figure 2). Thus, we can see that in genotypes 2 and 3 we have almost all the clinical strains that have a cutaneous tropism except the 08.188 strain which has a subcutaneous tropism. Regarding genotype 1 it is more heterogeneous with various tropism: (i) pulmonary, (ii) cerebral, and (iii) cutaneous. Regarding the immunocompetence of patients, we have only 4 patients who have immunodepression factors, whose strains are in genotype 1 except the 10.93 strain which is in genotype 3.

**3.5. Analysis of *rrs*, *hsp65*, and *sodA* Genes Polymorphism.** The 36 clinical strains and 2 reference strains of *N. brasiliensis* studied showed (i) for *rrs* gene 16 polymorphic sites sharing 16 haplotypes and showing a Hd of 0.824; (ii) for *hsp65* gene, 27 polymorphic sites and up to 22 different haplotypes with a Hd of 0.927; and, (iii) for *sodA* gene, up to 29 polymorphic sites sharing 14 haplotypes having a Hd of 0.885 (Table 3).

#### 4. Discussion

*Nocardia* spp. are common soil-inhabiting bacteria that frequently infect humans through traumatic injuries or inhalation routes and cause infections, such as actinomycetoma and nocardiosis, respectively. *N. brasiliensis* is the main aetiological agent of actinomycetoma in various countries [23]. The input data used in this study highlight the existence of indigenous cases of cutaneous and subcutaneous (such as actinomycetoma) nocardiosis caused by *N. brasiliensis* in France. Moreover, we can observe that *N. brasiliensis* is also responsible for severe cases of disseminated nocardiosis in immunocompromised patients (pulmonary and cerebral cases).

To determine whether there is an association between clinical tropism of strains and their genetic profile we performed genetic characterization of 36 indigenous cases of *N. brasiliensis* that happened in France.

The three culture media allow the growth of clinical strains of *N. brasiliensis*. However, on Bennett's medium more abundant and fast growth (48 hours) was observed. But the downside of this medium is its inaccessibility in the hospital because it is not marketable. Middlebrook medium shows strong growth but also it was slightly slower (72 hours). This medium is very expensive and not accessible to all budgets. However, it is an interesting alternative in isolating *Nocardia* from a complex sample. It is a selective medium of Mycobacteria, which promotes the growth of some *Nocardia* to the detriment of other external bacteria or commensal flora that may be in the biological sample analyzed. The BCP medium, used routinely in hospitals for Gram-negative bacteria, has interesting results with good fast growth (48 hours). It would therefore be advisable to use it as isolation medium for urgent cases, by the speed of growth.

Antibiograms results show resistance of most of the clinical strains to imipenem. This can pose therapeutic problems since it is part of molecules proposed during a phase of a general treatment for nocardiosis [24]. However, all clinical strains of *N. brasiliensis* were sensible to SXT and would be an effective molecule during treatments. The sensibility of *N. brasiliensis* type strain to this antibiotic has already been observed by Gilquin et al. [9].

Our study confirms that all clinical strains of *N. brasiliensis* are capable of degrading casein except 12.28 clinical strain. As shown by Seol et al. the *N. brasiliensis* type strain is able to degrade casein as well [25]. However, the test on the reference strains reveals that *N. vulneris*, *N. tenerifensis*, *N. boironii*, and *N. towensis* are also capable of degrading casein in the same way as *N. brasiliensis*, as also shown by Gilquin et al. [9]. This type of test is used in some countries without the necessary molecular biology tools to identify *N. brasiliensis*. But, now, they must be aware that with this test we target several species of clade *N. brasiliensis*. So, it is no longer a criterion of identification proper to *N. brasiliensis*.

Phylogenetic tree based on the *rrs* gene sequence of our collection showed a low genetic diversity resulting in low polymorphism sequence. In addition, we can note that *N. vulneris* DSM 45737<sup>T</sup>, identified as a new species by Lasker et al., present a genetic sequence very close to *N. brasiliensis*

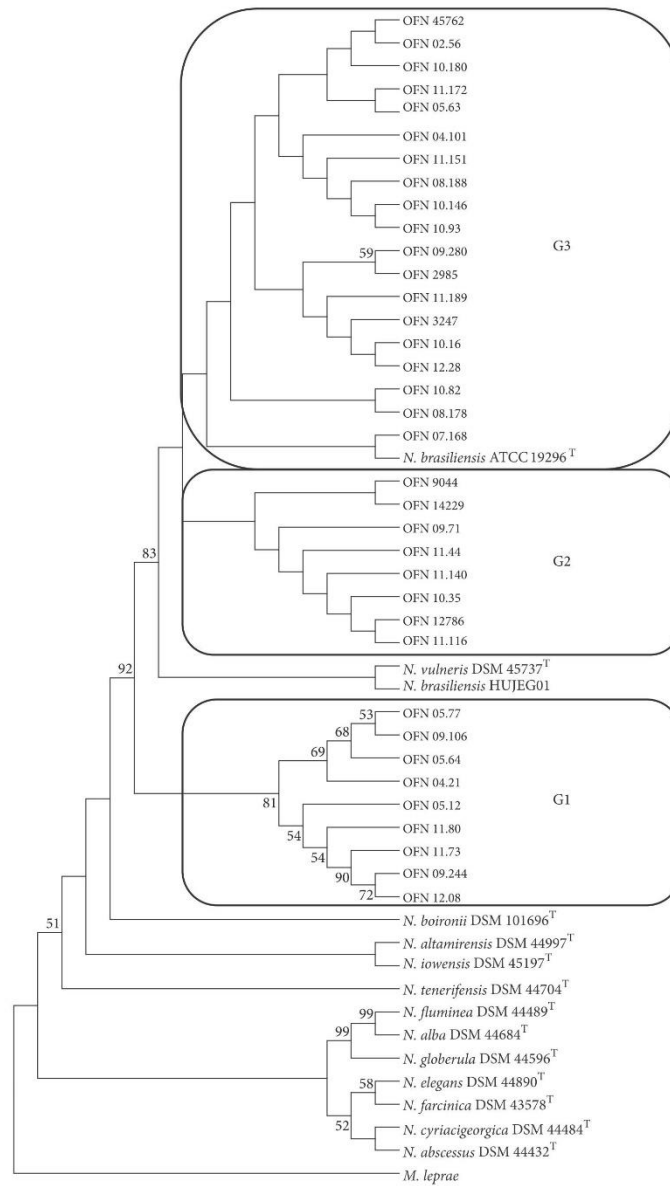


FIGURE 2: Phylogenetic distribution of concatenation *sodA-hsp65* genes of 36 *N. brasiliensis* clinical strains analyzed in this study using neighbour-joining method, Kimura's two-parameter model, and bootstrap of 1000. Only values of bootstrap significance greater than 50% were reported.

**L'ISPB – Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1  
n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans  
les thèses : ces opinions sont considérées comme propres à leurs acteurs.**



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -  
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

**DURAND Thibaut**

**Evaluation des performances de la base de données V3 du spectromètre de masse MALDI-ToF Vitek MS® pour l'identification des bactéries du genre *Nocardia***

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2018, 144p.

**RESUME**

Les bactéries du genre *Nocardia* sont des pathogènes opportunistes rarement rencontrés en pathologie humaine mais les infections qu'ils provoquent sont graves voire mortelles en l'absence de traitement. Ainsi une identification fiable et rapide de l'espèce en cause est primordiale, d'autant plus que les profils de résistance sont très variables d'une espèce à une autre. La spectrométrie de masse MALDI-ToF, technique d'identification maintenant largement répandue au sein des laboratoires de microbiologie clinique, semblerait pouvoir répondre à ces critères. Encore très peu d'études ont permis l'évaluation des performances de la nouvelle base de données V3 du spectromètre de masse MALDI-ToF Vitek MS® (bioMérieux) pour l'identification des espèces du genre *Nocardia*.

Nous avons donc voulu évaluer ces performances via l'analyse de 204 souches cliniques de *Nocardia* issues de l'Observatoire Français des Nocardioses. Deux milieux de cultures et 2 méthodes de dépôt de l'échantillon ont également été évalués. Nous avons ainsi pu montrer que la spectrométrie de masse MALDI-ToF se révélait être un outil efficace et intéressant pour l'identification des *Nocardia* puisque plus de 80 % des isolats ont été correctement identifiés en utilisant un prétraitement des colonies. Le dépôt direct des colonies s'est en revanche révélé peu efficace avec moins de 15 % d'identification correcte. En cas d'échec d'identification lors du premier dépôt de l'extrait, un second dépôt du même extrait puis une seconde extraction si nécessaire doivent être réalisés afin d'augmenter les chances d'identification. L'emploi d'un milieu de culture riche tel que la gélose au sang permet d'augmenter les chances d'identification dès le premier dépôt par rapport à un milieu pauvre tel que la gélose au bromocrésol pourpre (BCP).

La spectrométrie de masse MALDI-ToF semble être un outil efficace et intéressant pour l'identification des espèces de *Nocardia* les plus fréquemment impliquées en pathologie humaine. Cependant, seules 15 espèces sont actuellement incluses dans la base de données, ne permettant pas son utilisation pour des laboratoires de routine mais l'inclusion de nouvelles espèces dans la base permettra certainement de résoudre ces problèmes.

**MOTS CLES** *Nocardia*, Identification, Spectrométrie de masse, MALDI-ToF

**JURY** M. Frédéric LAURENT – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Mme Verónica RODRIGUEZ-NAVA – Professeur des Universités  
Mme Florence ADER – Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
M. Olivier DAUWALDER – Praticien Hospitalier

**DATE DE SOUTENANCE** Jeudi 20 décembre 2018

**ADRESSE DE L'AUTEUR** 11 rue professeur Paul Sisley, 69003 Lyon