



Nathalie Wilhelm*, Alain Le Coustumier*, Frédéric Fevrier*, Anne Le Flèche**
Claude Grasmick*, Patrick Grimont**

Bactéries d'identification difficile ou non cultivables en routine : Quelles solutions ? Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine

RÉSUMÉ

Certaines bactéries en microbiologie clinique sont difficiles à identifier en routine, d'autres ne sont pas, ou difficilement, cultivables. La biologie moléculaire et plus particulièrement l'amplification puis le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16 S s'est imposée comme une alternative aux tests d'identification phénotypique et à l'échec des cultures classiques. L'identification est alors fondée sur la comparaison de la séquence caractéristique obtenue avec le contenu d'une base de données. Nous rapportons ici 9 cas d'infections dans lesquelles le recours à ces techniques de biologie moléculaire, réalisées par des laboratoires spécialisés, a permis, seul ou en complément d'une identification phénotypique, de poser un diagnostic, d'optimiser un traitement antibiotique et ultérieurement d'apprendre à mieux reconnaître les bactéries impliquées.

MOTS CLÉS

Gène *rrs*, ARN ribosomal 16 S, biologie moléculaire, identification bactérienne, *Abiotrophia*, *Haemophilus segnis*, *Faecalibacterium*, *Sneathia*, *Corynebacterium xerosis*, *Helcococcus kunzii*, *Aerococcus urinae*, *Bartonella vinsonii*, *Tropheryma whipplei*

Difficult to identify or non cultivable bacteria : which solutions ? 16S ribosomal RNA gene sequencing contribution to routine microbiological diagnosis

SUMMARY :

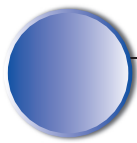
In clinical microbiology some bacteria are difficult to identify in a routine setting, others are impossible (or difficult) to cultivate. Molecular biology provides an alternative to phenotypic identification and failure of classical culture, the technique most frequently used is the amplification and partial sequencing of the gene *rrs* coding for 16 S ribosomal RNA ; the sequence obtained being compared to a database. Here we describe 9 cases of infection where the application of molecular biology techniques, performed by specialist laboratories, has allowed either alone or, in combination with phenotypic identification, to establish a diagnosis, select optimal antibiotic treatment and ultimately to understand how to better recognize these bacteria

KEYWORDS

rrs gene, 16 S ribosomal RNA, molecular biology, bacteria identification, *Abiotrophia*, *Haemophilus segnis*, *Faecalibacterium*, *Sneathia*, *Corynebacterium xerosis*, *Helcococcus kunzii*, *Aerococcus urinae*, *Bartonella vinsonii*, *Tropheryma whipplei*

*Laboratoire - Centre Hospitalier - BP269 - 46000 Cahors - Tél. : 05 65 20 50 75 - Fax : 05 65 20 51 10 - E-Mail : wilhelm@ch-cahors.fr

**Centre d'Identification Moléculaire des Bactéries - Institut Pasteur - 25-28, rue du Docteur Roux - 75724 Paris Cedex 15 - Tél. : 01 45 68 83 36 - Fax : 01 45 68 88 37



I - Introduction

Le microbiologiste peut se tourner vers l'identification par biologie moléculaire pour deux applications principales. La première correspond à l'identification de bactéries isolées en culture mais dont l'identification par les méthodes conventionnelles est difficile. La seconde correspond à l'utilisation de la technique directement sur des prélèvements cliniques.

Certaines souches bactériennes isolées en microbiologie clinique sont, en effet, difficiles à identifier par les tests phénotypiques habituellement réalisables au laboratoire et regroupant les caractères cultureux (atmosphère, température, milieux et durée), les caractères morphologiques (aspect après coloration de Gram et coloration de Ziehl) et les caractères biochimiques (activités enzymatiques simples : catalase et oxydase, activités enzymatiques métaboliques, métabolisme des sucres). Il s'agit d'espèces mal identifiées par les galeries d'identification manuelles ou automatiques parce que fastidieuses (bactéries à croissance lente comme les Mycobactéries), inertes (exprimant peu de caractères phénotypiquement discriminants, *Francisella* par exemple), rares, nouvellement décrites ou récemment individualisées et absentes des thésaurus des galeries.

D'autre part, un certain nombre de prélèvements reste stérile en culture conventionnelle, notamment dans le cas de bactéries non ou difficilement cultivables. L'identification par biologie moléculaire peut alors permettre de poser le diagnostic, par exemple dans les endocardites à hémocultures négatives. Il peut s'agir de sang, sérum, liquides (articulaire, céphalo-rachidien...) ou de biopsies diverses (valves, ganglions, tissus...). Le diagnostic par biologie moléculaire peut être non orienté (utilisation d'amorces « universelles ») mais la demande peut aussi être ciblée sur une espèce ou un genre avec, par exemples, les recherches de *Bruceella*, *Coxiella burnetti*, *Bartonella*, *Tropheryma whippelii*...

L'objectif de cet article est de discuter l'apport de ces techniques de diagnostic moléculaire au diagnostic microbiologique de routine, y compris dans les laboratoires ne disposant pas d'un équipement nécessaire à l'exploitation des techniques de biologie moléculaire.

II - L'approche pratique

1. Techniques et mise en œuvre

La technique la plus couramment utilisée repose sur l'amplification puis le séquençage partiel du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16 S, gène chromosomique d'une taille d'environ 1500 paires de bases, présent chez toutes les espèces bactériennes (gène universel), dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15

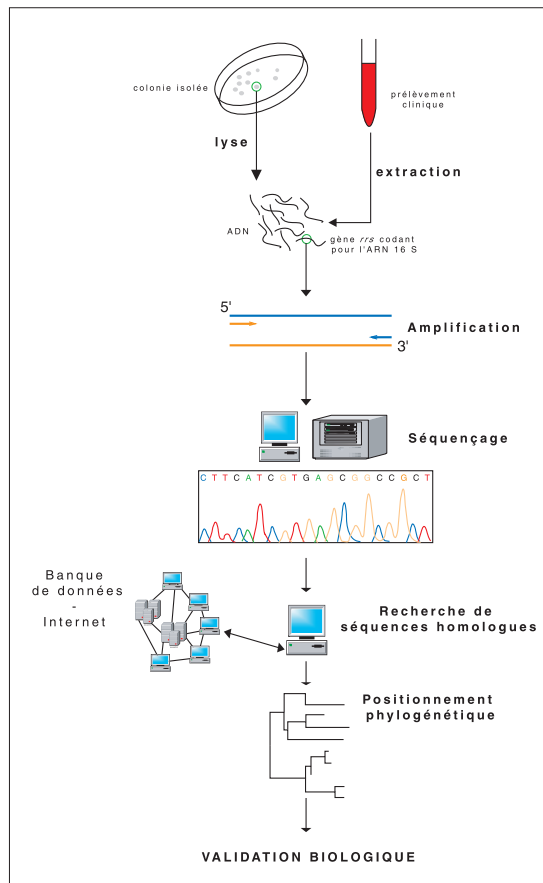


Figure 1

Les étapes de l'identification bactérienne par séquençage du gène *rrs* codant l'ARN ribosomal 16 S.

premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes. La séquence obtenue est ensuite comparée à une base de données (voir figure 1).

Les colonies bactériennes à identifier sont simplement lysées mais les prélèvements cliniques (sang, liquides articulaires, pus « aseptiques », biopsies diverses) doivent subir une étape d'extraction, sur colonne de silice par exemple, pour obtenir un ADN purifié.

Le gène *rrs* codant pour l'ARNr 16 S est amplifié par Polymerase Chain Reaction (PCR) en utilisant deux amorces universelles complémentaires des extrémités 5' et 3' conservées. Un fragment dont la longueur varie en fonction des protocoles employés est ainsi obtenu (1). Ce produit d'amplification est ensuite séquençé. Il existe actuellement des séquenceurs semi-automatiques qui ont banalisé cette étape dans les laboratoires de biologie moléculaire. Pour chaque séquence obtenue, des séquences homologues sont recherchées dans des banques de données via le réseau Internet à l'aide des programmes BLASTN du National Center for Biotechnology Information (NCBI, voir note 1) ou BIBI pour Bio Informatic Bacterial Identification de l'Université de Lyon (note 2). Le logiciel fournit un pourcentage d'homologie entre la séquence étudiée et celles contenues dans les banques de données. Pour certains auteurs (2), l'identité au genre est définie pour une homologie de séquence $\geq 97\%$ et l'identité d'espèce est définie pour une homologie $\geq 99\%$. La souche bactérienne peut en-

DÉDICACE
A Claude Bollet.

NOTE 1
Pour plus d'informations sur le NCBI et le programme BLASTN, consulter le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

NOTE 2
Pour plus d'informations sur le programme BIBI et son utilisation, consulter le site <http://pbil.univ-lyon1.fr/bibi/>

Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine

NOTE 3

Genoscreen - Bât.
Guérin - 4^{ème} étage
Campus de l'Institut
Pasteur de Lille
1, rue du Professeur
Calmette BP 245
59019 Lille Cedex
Tél. : 03 20 87 71 53
Fax. : 03 20 87 72 64
www.genoscreen.fr

fin être positionnée parmi l'ensemble des espèces connues sous forme d'un arbre phylogénétique construit par un logiciel (exemple : DNASTAR, voir cas clinique 5. Biologie moléculaire et avancée taxonomique). Au Centre d'Identification Moléculaire des Bactéries de l'Institut Pasteur, l'identification n'est terminée qu'après obtention d'un arbre phylogénétique en tenant compte de l'homologie / hétérogénéité des espèces concernées et de la netteté de la séparation des espèces proches.

2. Des limitations à considérer

Le séquençage du gène *rrs* de l'ARNr 16 S n'est pas toujours suffisamment discriminant, c'est pourquoi des gènes alternatifs plus spécifiques d'espèces sont parfois amplifiés et séquencés, comme le gène *rpoB* pour les Entérobactéries ou *sodA* pour les Streptocoques. Par ailleurs, l'ADN cible pour les champignons est l'ADN ribosomal 18 S. De plus, il faut savoir que lorsque l'on réalise cette technique sur un prélèvement clinique, il peut exister des faux négatifs (présence d'inhibiteurs d'enzyme d'amplification dans l'échantillon, bactérie difficile à lyser, choix du fragment à biopsier, seuil de détection) et des faux positifs (contaminations). Enfin, la qualité des séquences déposées dans les banques de données est inégale car non systématiquement validées par un expert.

Pour toutes ces raisons, l'expertise microbiologique reste indispensable pour valider la cohérence de l'identification par biologie moléculaire avec les caractères phénotypiques de la souche et avec le contexte clinique.

L'ensemble ou une partie des étapes de l'identification par biologie moléculaire peut être confié à un organisme comme le Centre d'Identification Moléculaire des Bactéries de l'Institut Pasteur ou à des sociétés privées comme Genoscreen (note 3).

III - Cas cliniques

Les caractéristiques cliniques et microbiologiques des cas cliniques abordés dans cette partie sont présentées dans le tableau I

1. Biologie moléculaire et confirmation du diagnostic étiologique

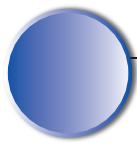
Mr A., 51 ans, est hospitalisé pour sciatgie non fébrile. Connu pour une insuffisance valvulaire mitrale, il a subi récemment 4 interventions dentaires sous antibioprophylaxie adaptée. Les cinq couples d'hémocultures prélevés montrent en moins de 48h des cocco-bacilles et des formes allongées gram positif et gram variable alpha hémolytiques, aéro-anaérobie facultatif, catalase négative, pyrrolidonylarylamidase (PYR) positif. La morphologie, les tests préliminaires et les galeries ID 32 Strep et Api 20 Strep donnent l'orientation qui est confirmée à *Abiotrophia defectiva* par séquençage du gène *rrs* de l'ARN ribosomal 16 S. Le diagnostic posé est une spondylodiscite multiple (de L2 à S1) associé à une sacroiléite droite sur une probable greffe endocarditique silencieuse. Cette observation est la première d'une infection ostéoarticulaire multiple à *A. defectiva* (3).

Tableau I

Caractéristiques cliniques et microbiologiques des cas cliniques présentés.

Cas	Clinique	Prélèvements	Culture	Biologie moléculaire
1	Spondylodiscite multiple et sacroiléite	Hémocultures	suspicion <i>Abiotrophia defectiva</i>	<i>A. defectiva</i>
2	Chorio-amniotite avec morts fœtales	Hémocultures	<i>H. influenzae</i> / <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> / <i>H. segnis</i>	<i>H. segnis</i>
3.1	Pic fébrile (dialyse)	Hémoculture	Pas de subculture	<i>Fecalibacterium prausnitzii</i> *
3.2	Adénite inguinale suppurée (HIV)	Ganglion	Subculture insuffisante	<i>Sneathia sanguinegens</i>
4.1	Syndrome infectieux sans point d'appel	Hémocultures	<i>S. acidominimus</i> / <i>Aerococcus viridans</i>	<i>Aerococcus urinae</i>
4.2	Superinfection chronique (prothèse de genou)	Pus	<i>A. viridans</i>	<i>Helcococcus kunzii</i>
5	Surinfection de liposarcome	Pus	<i>Corynebacterium</i> sp	<i>C. freneyi</i> / <i>C. xerosis</i>
6.1	Endocardite (bioprothèse)	Hémocultures	négatives	<i>Bartonella vinsonii arupensis</i> *
6.2	Suspicion de maladie de Whipple	sang, salive, biopsies duodénales	Culture spécifique de sang négative	<i>Tropheryma whipplei</i> *

*Réalisé sur le prélèvement clinique (et pas sur colonies isolées)



2. Biologie moléculaire et réévaluation du rôle de certains micro-organismes en pathologie humaine

Mme B., 31 ans, est hospitalisée pour un syndrome abdominal douloureux et hyperthermie 3 jours après avoir subi une réduction embryonnaire. Les hémocultures réalisées en ville puis à l'entrée à l'hôpital mettent en évidence à 48 heures un cocco-bacille gram négatif, aéro-anaérobie, oxydase négatif et catalase positif. Il est identifié à *Haemophilus influenzae* en ville alors que la réalisation des exigences en facteurs (facteur V), une galerie RapID NH System Remel et de nombreux tests complémentaires orientent vers *Actinobacillus actinomycetemcomitans* ou *Haemophilus segnis* dans notre laboratoire. La patiente perd ses deux fœtus restants dans un contexte de chorio-amnionite septicémique sévère. Le recours au séquençage du gène *rrs* de l'ARN ribosomal 16 S est nécessaire pour affirmer l'identification de *H. segnis*, bactérie commensale de l'oropharynx très rarement isolée en pathologie humaine (7 septicémies dont 2 sur endocardites). De plus il s'agit de la première observation d'une infection gynécologique à *H. segnis* (4). Dans un article récent, Lau et collaborateurs soulignent la probable importante sous-estimation des infections à *H. segnis* du fait de la difficulté de son identification et des faciles confusions avec des bactéries proches et insistent sur l'utilité de la biologie moléculaire pour lever cette difficulté (5).

3. Biologie moléculaire et bactéries non subcultivables, des pathogènes émergents ?

3.1 - Caractérisation de *Faecalibacterium prausnitzii*

Mr C., 82 ans, présente un pic fébrile au cours d'une séance de dialyse. Le flacon anaérobie prélevé se positive avec un diplo-bacille gram négatif qu'il nous est impossible de faire pousser sur géloses diverses (chocolat, sang, Mueller-Hinton, BCYE) dans toutes les combinaisons de température (30 & 37° C) et d'atmosphères essayées : aérobie, capnophile (9 % CO₂); micro-aérophile (CampyGen Compact®, Oxoid) et anaérobie (GenerBag® bioMérieux). Seul le bouillon de Schaedler permet une très faible subculture. Le séquençage du gène *rrs* de l'ARN ribosomal 16 S à partir du bouillon d'hémoculture permet d'identifier *Faecalibacterium prausnitzii* (figure 2). La caractérisation de cette bactérie, pourtant une des plus abondantes de la flore fécale humaine (7 à 15 %, 100 000 fois plus que *E. coli*) n'a jamais été décrite en microbiologie clinique alors que l'on peut penser qu'elle est certainement fréquente dans les péritonites perforées et les translocations digestives : ceci est probablement dû à sa très grande sensibilité à l'oxygène (*F. prausnitzii* ne survit pas à une exposition de 2 minutes à l'air). Le patient

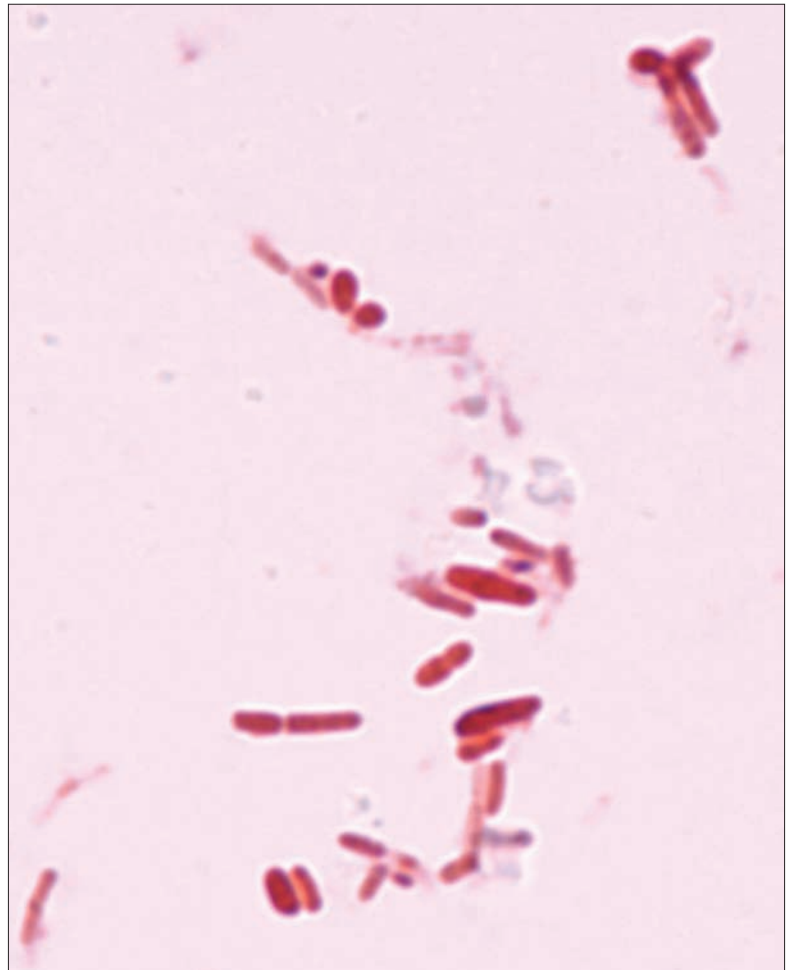


Figure 2
Coloration de Gram de *Faecalibacterium prausnitzii* sur le bouillon de Schaedler.

décède six mois après d'un probable infarctus mésentérique (6).

3.2 - Infection ganglionnaire à *Sneathia sanguinegens*

Mr D., 41 ans, SIDA depuis 1989 (500 CD4/mm³) présente une adénite inguinale supprimée résistant à un traitement par pristinamicine. Une culture pure de nombreuses colonies minuscules, hétérogènes avec ou sans hémolyse viridans apparaît en 5 jours uniquement sur milieux au sang, mais pas sur gélose chocolat, en atmosphère capnophile ou anaérobie. On observe des bacilles pléiomorphes à coloration de gram variable. La catalase est négative et tous les essais de subculture sont insuffisants pour une identification phénotypique. La guérison est difficilement obtenue avec l'association cloxacilline + ofloxacine. L'identification de *Sneathia sanguinegens* est obtenue par séquençage du gène *rrs* de l'ARN ribosomal 16 S : proche de *Leptotrichia buccalis*, cette bactérie fastidieuse nécessitant du sang ou du sérum pour pousser est décrite en 2001 à partir de seulement trois souches cliniques (7). Son pouvoir pathogène est mal défini bien qu'indiscutable ici. Il s'agit du premier cas d'infection ganglionnaire à *Sneathia sanguinegens*.

Apport du séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16 S dans le diagnostic microbiologique de routine

4. Biologie moléculaire et identifications bactériennes difficiles

4.1 – Identification de *Aerococcus urinae*

Chez Mr E., 86 ans, dans des hémocultures, des cocci en amas, catalase négative, donnant de petites colonies viridans en 24h sont identifiés par les galeries Api ID 32 Strep et 20 Strep à *Streptococcus acidominimus* ou *Aerococcus viridans* «profil douteux». Des tests complémentaires nous permettent d'identifier *Aerococcus urinae*, ce qui est confirmé par le séquençage du gène *rrs* de l'ARN ribosomal 16 S et de rattacher la septicémie à une porte d'entrée urinaire. Espèce absente des thésaurus de nos galeries, *A. urinae* est responsable de rares infections des voies urinaires et d'exceptionnelles infections systémiques chez des personnes âgées. Depuis, il nous a été donné d'identifier cette bactérie dans 5 cas d'infections urinaires. Le fabricant, prévenu, l'introduira dans la prochaine version de ses bases de données.

léculaire a permis d'identifier une bactérie décrite en 1993, rarement isolée en microbiologie clinique (et toujours au niveau des membres inférieurs) absente des thésaurus des galeries commerciales et dont la distinction avec les espèces voisines dont *A. viridans* est extrêmement délicate (8). Il s'agit du sixième isolement de *Helcococcus kunzii* en pathologie humaine.

5. Biologie moléculaire et avancée taxonomique

Mme G., 76 ans, présente une surinfection d'un liposarcome. L'examen direct du pus prélevé chirurgicalement montre la présence de leucocytes, de quelques cocci à Gram positif et de très nombreux bacilles à Gram positif. La culture retrouve de rares *Staphylococcus aureus* et quelques *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* ainsi qu'un bacille corynéforme apparaissant sous forme de très nombreuses petites colonies jaunes en 48h : il n'est pas identifié par la galerie Api Coryné. Une PCR « mycobactéries » se révèle positive cependant l'étude du gène *rrs* de l'ARNr 16 S montre une homologie de séquence supérieure à 98 % avec *C. freneyi* (quatre souches connues) et *C. xerosis* mais s'avère insuffisante pour les différencier (figure 3). De plus la souche est atypique phénotypiquement car pigmentée en jaune et α -glucosidase négative, caractères positifs importants pour l'identification de ces deux espèces. Un test génotypique complémentaire basé sur l'amplification de l'espace 16-23 S (C. Bollet, AP-HM La Timone, Marseille) permet d'identifier formellement la souche à *Corynebacterium xerosis* dont la pathogénicité est mal définie. Après le démembrement et la redéfinition de *C. xerosis*, la souche représente la troisième souche connue ; elle est déposée à la Collection de l'Institut Pasteur sous le numéro CIP 108444.

6. Identification d'un agent pathogène uniquement par biologie moléculaire

6.1 – Identification de *Bartonella vinsonii* subsp *arupensis*

Mr H., 79 ans, porteur d'une bio-prothèse depuis 4 ans, est hospitalisé pour altération de l'état général, épisodes de frissons, fébricule vespéral et perte de poids. Le diagnostic d'endocardite sur bio-prothèse est évoqué malgré des hémocultures négatives et une échographie cardiaque trans-oesophagienne non contributive. L'autre hypothèse est celle d'une vascularite (insuffisance rénale, c-ANCA de spécificité anti-PR3 à 14,5 UI/ml) mais l'examen anatomopathologique de la biopsie rénale met uniquement en évidence une glomérulonéphrite post-infectieuse à croissants et le test à la cortisone s'avère non significatif. Une sérologie *Bartonella* montre un titre d'immunoglobulines IgG à 400 pour *B. henselae* et pour *B. quintana* (immunofluorescence indirecte, titre significatif ≥ 50 ; CNR des Rickettsies).

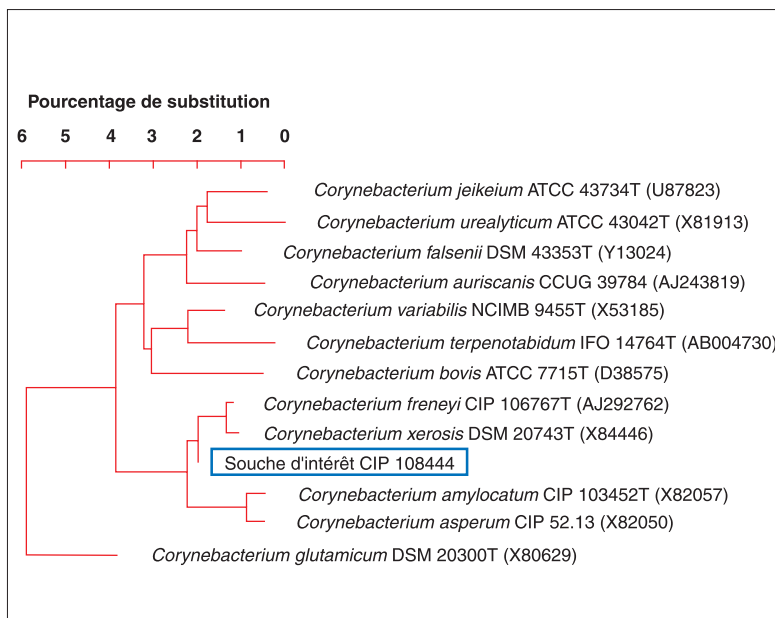
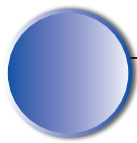


Figure 3

Arbre phylogénétique de la souche *C. xerosis* CIP 108444.

4.2 – Identification de *Helcococcus kunzii*

Mr F., 73 ans souffre d'une superinfection chronique fistulisée d'une prothèse de genou. De gros cocci difformes, gram positif facilement décolorés, aéro-anaérobie, catalase négative, observés en abondance à l'examen direct du pus, pousse en 48h avec des colonies non hémolytiques. Seule la galerie Api 20 Strep donne une identification « acceptable » : *Aerococcus viridans*. Le séquençage du gène *rrs* de l'ARN ribosomal 16 S conclut à l'identification de *Helcococcus kunzii*. La biologie mo-



L'amoxicilline initialement prescrite est alors remplacée par l'association ofloxacine+vibramycine. Une demande de diagnostic spécifique de *Bartonella* par biologie moléculaire permet d'identifier l'espèce *Bartonella vinsonii* subsp *arupensis* dans le sang du patient (F. Fenollar; D. Raoult, CNR des Rickettsies, AP-HM, Marseille). Il s'agit de la première observation d'une endocardite à *B. vinsonii* subsp *arupensis* : son réservoir serait constitué par des rongeurs et sa pathogénicité est extrêmement mal connue (9). L'évolution du patient est dans un premier temps favorable et le remplacement valvulaire n'est pas envisagé mais il décède 4 mois plus tard d'un œdème pulmonaire massif.

6.2 - Diagnostic de la maladie de Whipple

Mr I., 46 ans, est hospitalisé en rhumatologie pour prise en charge d'une polyarthrite rhumatoïde séronégative évoluant depuis 5 ans et traitée par méthotrexate depuis 2 ans. L'évolution sans déformation ni érosion articulaire conduit à une remise en question du diagnostic initial alors que le patient présente toujours des douleurs articulaires, un amaigrissement et un syndrome inflammatoire biologique (VS=80 mm, CRP=118 mg/l). L'association à des douleurs abdominales conduit à la réalisation d'une fibroscopie digestive haute. L'examen anapathologique des biopsies duodénales met en évidence de nombreux histiocytes avec des inclusions PAS positives, très évocatrices de la maladie de Whipple. Au laboratoire du Pr Raoult (Unité des Rickettsies, AP-HM, Marseille), une culture cellulaire de sang est restée stérile et une exploration immunohistochimique de la salive par un anticorps spécifique dirigé contre le bacille de la maladie de Whipple est négative. Une analyse par biologie moléculaire (amplification du gène *rrs* de l'ARNr 16 S avec amorces spécifiques de *Trophe-*

ryma whipplei) sur le sang, la salive et des biopsies duodénales est positive et permet de poser définitivement le diagnostic de maladie de Whipple (10). Un traitement antibiotique par ceftriaxone 15j puis triméthoprime+sulfaméthoxazole 1 an est institué. L'évolution clinique est spectaculaire et dès 3 mois d'évolution, le patient est totalement asymptomatique (biologiquement et cliniquement).

IV - Conclusion

La routine en microbiologie clinique ne doit pas amener à une baisse de vigilance. Un œil attentif et exercé permet de rencontrer des bactéries extraordinaires. Si les systèmes commerciaux et leurs bases de données sont performants dans l'immense majorité des cas, ils n'identifient pas toutes les espèces bactériennes rencontrées en pathologie humaine. Même si elle aussi a des failles (voir 5. Biologie moléculaire et avancée taxonomique), la technique d'identification par séquençage du gène *rrs* de l'ARNr 16 S est devenue un outil complémentaire indispensable pour un coût raisonnable. Dans les cas de l'endocardite à *Bartonella* et de la maladie de Whipple, cette technique a pallié l'insuffisance de la bactériologie classique et a permis de poser un diagnostic et de mettre en place le traitement antibiotique adéquat. La sous-traitance des opérations de biologie moléculaire, en partie ou dans leur ensemble, à des laboratoires spécialisés, rend maintenant possible une utilisation plus large de ces techniques. Pousser l'identification jusqu'à ce stade permet à la fois une meilleure prise en charge des patients et ultérieurement une meilleure reconnaissance de ces bactéries pathogènes par le microbiologiste.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) TRISTAN A., MEYRONET D., BENITO Y., CELARD M., VANDENESCH F. Apport de la PCR universelle dans les errances diagnostiques. *Antibiotiques*. 2004, **6**, 257-261.
- (2) DRANCOURT M., BOLLET C., CARLIOZ A., MARTELIN R., GAYRAL JP, RAOULT D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2000, **38**, 3623-3630.
- (3) WILHELM N., SIRE S., LE COUSTUMIER A., LOUBINOX J., BELDJERD M., BOUVET A. First case of multiple discitis and sacroiliitis due to *Abiotrophia defectiva*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, **24** (1), 76-78.
- (4) WILHELM N., LE COUSTUMIER A., INGUENEAU C., LE FLECHE A., RASKINE L., BRETAGNE X., BERREBI A., SANSON-LE-PORS M.-J. Chorio-amnionite & septicémie à *Haemophilus segnis* post réduction embryonnaire avec morts fœtales. *Med. et Mal. Infect.* 2004, **345** 136. A-25.
- (5) LAU S., WOO P., MOK M., TENG J., TAM V., CHAN K, YUEN K. Characterization of *Haemophilus segnis*, an Important Cause of Bacteremia by 16S rRNA Gene Sequencing. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 877-880.
- (6) LE COUSTUMIER A., WILHELM N., LE FLECHE A., VALERY J.-C., GRASMICK C., GRIMONT P. First clinical isolate of *Faecalibacterium prausnitzii*, the tip of the iceberg ? *Int. J. Antimicrobiol. Agents*, 2004, **24S** 171, 494 / 87 P.
- (7) DE MARTINO S. J., MAHOUEAU I., BRETTE J.P., PIEMONT Y., MONTEIL H., JAULHAC B. Peripartum Bacteremias Due to *Leptotrichia amnionii* and *Sneathia sanguinigena*, Rare Causes of Fever during and after Delivery. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 5940-5943.
- (8) RIEGEL P., LEPARGNEUR J.-P. Isolation of *Helcococcus kunzii* from a post-surgical foot abscess. *Int. J. Med. Microbiol.* 2003, **293**, 437-439.
- (9) BREITSCHWERDT E., KORDICK L. Bartonella Infection in Animals: Carriership, Reservoir Potential, Pathogenicity, and Zoonotic Potential for Human Infection. *Clin. Microbiol. Reviews*. 2000, **13**, 428-438.
- (10) FENOLLAR F., FOURNIER P.E., ROBERT C., RAOULT D. Use of genome selected repeated sequences increases the sensitivity of PCR detection of *Tropheryma whipplei*. *J. Clin. Microbiol.* 2004, **42**, 401-403.