

Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



journal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/IMMBIO/>



REVUE GÉNÉRALE ET ANALYSE PROSPECTIVE

## Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007

### Généralités - Partie 1

## Molecular biology in clinical microbiology in 2007 - Part 1

J. Lamoril<sup>a,\*</sup>, M. Bogard<sup>c</sup>, N. Ameziane<sup>b</sup>, J.-C. Deybach<sup>a</sup>, P. Bouizegarène<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, hôpital Louis-Mourier, 178, rue des Renouillers, 92700 Colombes, France*

<sup>b</sup> *Laboratoire de biologie polyvalente, centre hospitalier de Sens, 89100 Sens, France*

<sup>c</sup> *Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, centre hospitalier de Meaux, 77100 Meaux, France*

Reçu le 29 juin 2006 ; accepté le 23 novembre 2006

Disponible sur internet le 15 février 2007

#### MOTS CLÉS

Biologie moléculaire ;  
Microbiologie ;  
Amplification génique

**Résumé** La biologie moléculaire est omniprésente en biologie médicale et plus particulièrement en microbiologie. De nombreux articles démontrent son importance tant dans le domaine du diagnostic que du pronostic, de l'évaluation thérapeutique, de l'épidémiologie ou des risques biologiques naturels ou non. La quantité considérable d'articles sur ce sujet, n'apporte pas toujours une réponse évidente sur le rôle de la biologie moléculaire dans un laboratoire de microbiologie qu'il soit hospitalier ou non. Cette revue constitue une synthèse des apports de cette discipline en microbiologie. À partir de cet état des lieux, certaines questions se posent, par exemple : la biologie moléculaire constitue-t-elle un réel apport en microbiologie ? Dans quelles indications prescrire un examen de biologie moléculaire ? Les réponses ne sont pas toujours simples. Dans cet article composé de deux parties, la première partie aborde les généralités de biologie moléculaire et plus particulièrement les principales techniques utilisées dans le domaine de la microbiologie et la seconde partie à venir traitera des applications.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### KEYWORDS

Molecular biology;  
Microbiology;  
Genomic;

**Abstract** Molecular biology is omnipresent in medical biology especially in microbiology. Many papers report studies on its importance in diagnosis, prognosis, therapeutic field, epidemiology, natural (or not) biological risks alike. The important sum of reports on this subject does not always bring an obvious answer to the part that molecular biology could play in a microbiology laboratory either public or private. This article summarizes the contributions of this

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [jerome.lamoril@lmr.ap-hop-paris.fr](mailto:jerome.lamoril@lmr.ap-hop-paris.fr) (J. Lamoril).

## Amplification

specialized field in microbiology and brings some questions on its contribution. Is molecular biology a real progress in microbiology? What are the main indications of molecular biology today in this field? According to the infectious particle, the answers are not always simple. They can be obvious in some cases (for instance, hepatitis C) or less obvious in other cases (tuberculosis for instance). In this article divided in two parts, the first one report an introduction to molecular biology in microbiology and the following second part will deal with the main applications in microbiology.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## Introduction

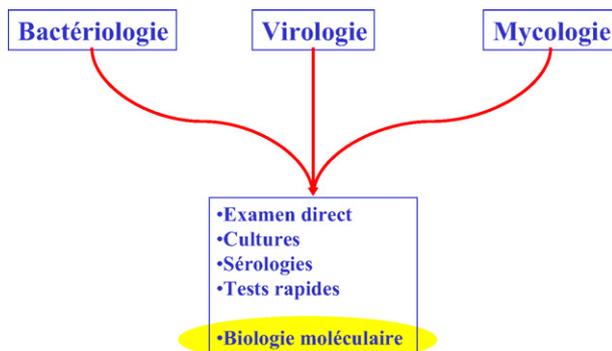
Depuis l'invention de la technique d'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) en 1983, la biologie moléculaire s'est implantée rapidement dans les laboratoires de microbiologie clinique. En effet, bien que de nombreuses techniques de microbiologie demeurent traditionnelles (examen direct, culture bactérienne, sérologie, tests biochimiques), la biologie moléculaire a pu trouver sa place en routine dans un grand nombre de laboratoires d'analyses médicales (Fig. 1). L'étude des agents infectieux à l'aide des outils de biologie moléculaire est ainsi devenue indispensable dans certaines indications. Après avoir rappelé les principales méthodes d'étude des agents infectieux, nous évoquerons leurs places dans un laboratoire de microbiologie. Nous aborderons ensuite des exemples d'usage courant de la biologie moléculaire et nous envisagerons son proche avenir.

## Généralités

Les techniques de biologie moléculaire évoluent rapidement (Fig. 2). Leurs principes et indications varient selon les applications. Bien que ces nombreuses techniques soient différentes, elles présentent toutes des avantages et des inconvénients communs.

## Avantages de la biologie moléculaire

La biologie moléculaire représente un ensemble d'outils dont le but est la mise en évidence des acides nucléiques (ADN ou ARN). L'étude de la littérature internationale sur ce sujet montre sa puissance d'analyse. Tous les agents infectieux connus (bactéries, virus, champignons, parasites)



**Figure 1** La biologie moléculaire dans un laboratoire de microbiologie.

sont détectables par cette méthode. La biologie moléculaire est aussi parfois le seul outil capable de détecter un nouvel agent pathogène. Comparée aux techniques de microbiologie classique, la biologie moléculaire présente de nombreux avantages. Le résultat est rapide, sensible et spécifique, permet la confirmation du diagnostic, un traitement adapté et une hospitalisation plus courte. Les infections nosocomiales peuvent être dépistées plus tôt, la source d'infection identifiée, le traitement et la prophylaxie ajustés. Enfin, l'automatisation se développe progressivement, facilitant ainsi la mise en place de ces techniques et améliorant ses performances (notamment sa rapidité d'analyse) tout en diminuant ses inconvénients.

## Inconvénients de la biologie moléculaire

Le risque principal est constitué par la contamination aboutissant à de faux positifs, les techniques de biologie moléculaire faisant le plus souvent appel aux méthodes d'amplification génique. À l'opposé, dans certains cas, des inhibiteurs d'amplification peuvent être présents aboutissant alors à de faux négatifs. Les contrôles sont donc importants. Par ailleurs, dans certains cas, la mise en évidence d'un acide nucléique ne permet pas d'affirmer la viabilité de l'agent infectieux. Enfin, la biologie moléculaire nécessite un ensemble d'appareils et de kits coûteux, un personnel spécialisé et entraîné, et des locaux spécifiques.

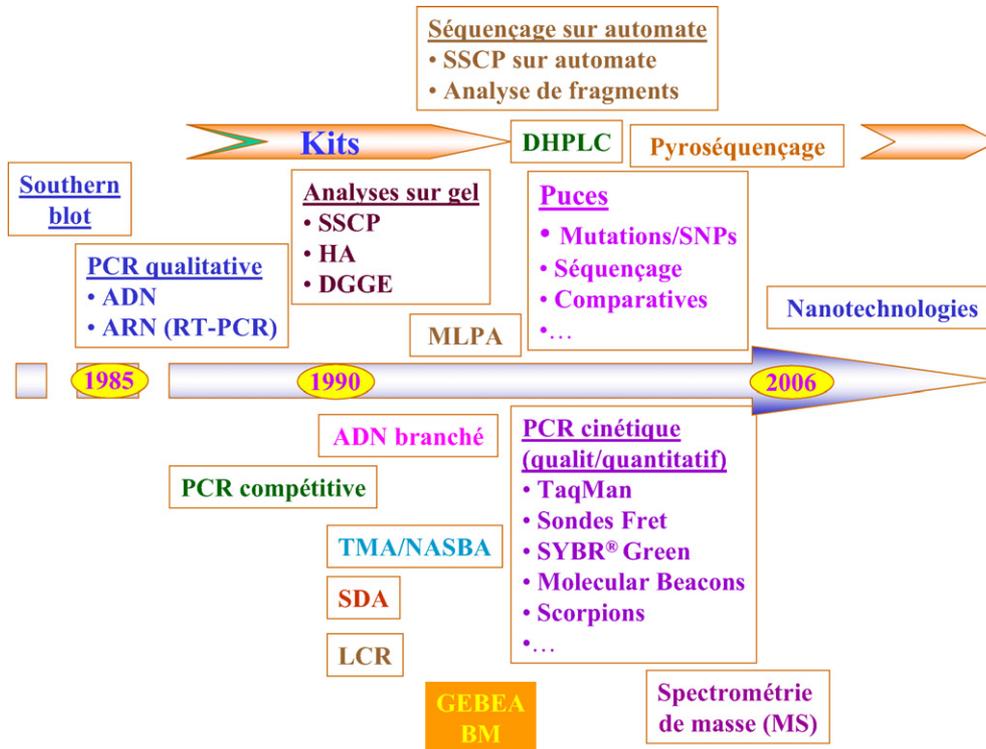
## Techniques d'amplification

De manière générale, après l'extraction des acides nucléiques, ces derniers doivent être amplifiés avant d'être analysés (Fig. 3) [1]. Nous allons donc brièvement rappeler les techniques d'amplification. Celles-ci sont classiquement séparées en techniques d'amplification par répétition de cycles thermiques, par amplification isotherme ou par amplification de signal [6,9,10].

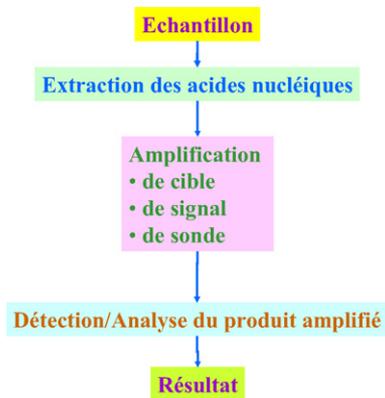
## Amplifications par cycles thermiques

### PCR (*polymerase chain reaction*)

La PCR déjà bien connue a été largement décrite dans de nombreux articles. Cette technique est basée sur l'utilisation d'une enzyme thermorésistante, l'ADN polymérase (la plus connue étant la *Taq* ADN polymérase) qui recopie en de nombreux exemplaires l'ADN cible à l'aide de deux amorces complémentaires respectivement des brins sens et antisens. Le processus d'amplification est exponentiel. Chaque cycle aboutit à la formation de deux copies par brin. La PCR a été



**Figure 2** Évolution des techniques de biologie moléculaire depuis la PCR à nos jours. SSCP, *single strand conformation polymorphism* ; DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis* ; HA, *heteroduplex analysis* ; DHPLC, *denaturing high performance liquid chromatography*. Pour les autres abréviations, voir le texte.



**Figure 3** Principales étapes d’analyse d’un échantillon en biologie moléculaire.

déclinée de différentes manières. Nous donnerons quelques exemples sans être exhaustifs :

- la PCR classique : il s’agit de la PCR telle qu’elle a été initialement décrite. Après amplification, la cible est détectée sur un gel d’agarose après addition d’un agent intercalant (cf. BET, bromure d’éthidium) et exposition aux UV ;
- la RT-PCR (*reverse-transcription PCR*) : après extraction d’un ARN, celui-ci est transformé en ADN complémentaire (ADNc) par transcription inverse. Dans un second temps, l’ADNc est amplifié par PCR ;

- la *nested-PCR* : il s’agit d’une PCR avec deux couples d’amorces, un couple d’amorces (couple externe) effectuant une première PCR suivie d’une seconde PCR à l’aide d’un second couple d’amorces (couple interne) s’hybridant à l’intérieur du premier couple. Deux PCR successives sont donc réalisées. Cette PCR « nichée » (*nested*) permet d’augmenter la sensibilité du système mais augmente également considérablement le risque de contamination ;
- la PCR multiplex : plusieurs couples d’amorces sont ajoutés dans un même tube et la PCR s’effectue en même temps pour chaque couple d’amorces. La PCR multiplex permet donc la mise en évidence de plusieurs cibles dans un seul tube. Elle peut être réalisée de manière conventionnelle (PCR classique), par PCR-Elisa ou par PCR en temps réel (voir infra) ;
- la PCR-Elisa : le produit amplifié est marqué au cours de la PCR grâce à une des deux amorces marquées (par exemple, par un résidu de digoxigénine). Après fixation en microplaque à l’aide d’une sonde capture, la révélation est effectuée à l’aide d’un anticorps spécifique (par exemple, antidigoxigénine). La société BAG (Biologische Analysensystem GmbH) commercialise en Allemagne une PCR-Elisa multiplex ;
- la PCR compétitive : il s’agit d’une technique de quantification des acides nucléiques par PCR développée avant la description de la PCR en temps réel. Dans cette technique, la cible est coamplifiée en présence d’un acide nucléique titré de même nature et de séquence proche qui fait office de standard interne. Cette technique est encore utilisée dans certains kits de biologie moléculaire

(par exemple, les kits de la gamme Amplicor™, société Roche) ;

- la PCR en temps réel [7] : En sus des amorces utilisées pour la PCR proprement dite, une ou deux sondes (selon la technique utilisée) sont ajoutée(s) au milieu réactionnel. La/les sonde(s) est/sont marquée(s) par un fluorophore permettant la détection directe du produit amplifié. Plusieurs systèmes ont été décrits. Nous en citerons quelques-uns : les sondes FRET (*fluorescence resonance energy transfert*, sondes d'hybridation), le SYBR® Green (agent intercalant fluorescent), les sondes TaqMan® ou équivalent (appelées aussi sondes double marquage), les balises moléculaires (*molecular beacons*), les sondes Scorpion™, les sondes LightUp™. La PCR en temps réel présente également l'intérêt de pouvoir être effectuée en PCR multiplex. Par ailleurs, la PCR en temps réel utilise un système fermé. Après addition du mélange réactionnel et de l'acide nucléique recherché, le tube reste fermé jusqu'à la détection. Le risque de contamination est donc diminué, avantage important par rapport aux autres techniques de PCR. Enfin, dans la majorité des cas, une enzyme l'uracile N ADN glycosylase est ajoutée dans le tube ce qui diminue encore le risque de contamination [1]. Cette technique a pris un essor considérable dans les laboratoires de biologie moléculaire depuis quelques années.

#### LCR (*ligase chain reaction*)

Il s'agit d'une technique d'amplification de sondes. Après hybridation de quatre sondes adjacentes (deux sondes spécifiques du brin sens et deux spécifiques du brin antisens), les sondes sont collées à l'aide d'une ligase à condition que la complémentarité soit absolue (absence de misappariement). Plusieurs cycles permettent ainsi l'amplification des sondes « collées ». Ses performances sont similaires à celles de la PCR. Cette technique n'existe plus en France (sa commercialisation par la société Abott a été arrêtée en 2003). Elle est cependant encore décrite et utilisée dans d'autres pays.

### Techniques isothermes

#### NASBA (*nucleic acid sequence-based amplification*)

Cette technique permet l'amplification à partir d'ADN ou d'ARN. Son principe est basé sur la transcription d'ARN produit en de nombreux exemplaires au cours de la réaction. Trois enzymes sont utilisées à cet effet, une transcriptase inverse, une RNase H et une T7 ARN polymérase. Cent à 1000 copies d'ARN sont obtenues à chaque cycle (la PCR ou la LCR en produisent deux à chaque cycle). La sensibilité de la NASBA est similaire à celle de la PCR. Cette technique a été couplée à la détection par des balises moléculaires (*molecular beacons*) et commercialisée par la société Bio-Mérieux sous le nom EasyQ™.

#### TMA (*transcription-mediated amplification*)

Cette technique est proche de la NASBA et donne des performances similaires. Elle utilise le même principe, la différence résidant dans l'utilisation de deux enzymes au lieu de trois, la reverse transcriptase possédant aussi une activité

RNase H. Cette technique est commercialisée en France par Bayer sous la dénomination Gen-Probe®.

#### SDA (*strand displacement amplification*)

Cette technique est réalisée à l'aide de deux enzymes thermostables, une enzyme de restriction et une ADN polymérase dépourvue d'activité exonucléasique [1]. Le principe est complexe. Il est basé sur la coupure partielle de l'ADN par l'enzyme de restriction (après incorporation d'un phosphorothiate nucléotide qui n'existe pas à l'état naturel) puis le déplacement du brin ainsi formé par l'ADN polymérase. De nombreux brins sont ainsi néoformés de manière cyclique [1]. À la fin de la réaction, environ 10<sup>9</sup> copies sont obtenues après amplification de l'ADN cible. Les résultats sont équivalents à ceux obtenus avec la PCR. La société Becton Dickinson a développé un automate et des tests basés sur cette technique sous le nom BD ProbeTec™.

#### RCA (*rolling circle amplification*)

Brièvement, la technique d'amplification par RCA est basée sur l'extension d'une amorce spécifique d'une cible en cercle « *rolling circle* » à l'aide d'une ADN polymérase. Cette extension est associée à un déplacement du fragment recopié produisant alors une longue séquence constituée de nombreuses unités répétées et aboutit à la constitution de millions de copies de la séquence en cercle (RCA linéaire). Dans la RCA à caractère exponentiel, une paire d'amorces est utilisée. La seconde amorce s'hybride à l'ADN cible, produit amplifié à partir de la première amorce et initie la formation d'ADN « en branches » au cours de la réplication de l'ADN cible. Jusqu'à 10<sup>12</sup> copies peuvent être obtenues en une heure [1]. De nombreuses variantes de ce principe d'amplification ont été décrites [12,15]. Bien que le principe soit complexe, cette technique est beaucoup plus simple à réaliser que la PCR. Elle ne nécessite pratiquement pas d'optimisation, n'utilise pas d'instrumentation spécifique et présente peu de risques de contamination.

#### CPT (*cycling probe technology*)

Il s'agit d'une technique d'amplification de signal [1]. Dans son principe, elle amplifie l'ADN cible à partir d'une sonde chimérique ARN-ADN (une séquence ARN limitée de chaque côté par une séquence ADN). Sur chaque brin d'ADN adjacent à l'ARN se trouvent respectivement un fluorophore (appelé rapporteur) et un *quencher* (fluorophore répresseur). Ce dernier empêche l'émission d'un signal lumineux par le rapporteur. Cette sonde s'hybride à l'ADN cible et l'ARN hybridé à l'ADN est lysé par une RNase H (qui lyse l'ARN des duplex ARN/ADN). Après clivage de la sonde, le rapporteur émet un signal lumineux, le rapporteur étant séparé du quencher. Plus le nombre de sondes lysées est important, plus le signal fluorescent émis sera fort. Ce système initialement commercialisé par la société ID Biomedical aux États-Unis n'est plus commercialisé pour le moment.

#### ADN branché

Autre technique d'amplification de signal, cette technique est basée sur l'hybridation spécifique à partir de l'ADN ou de l'ARN cible d'un certain nombre de sondes dont certai-

**Tableau 1** Principales techniques d'amplification et gammes de kits utilisées en microbiologie clinique

Techniques	Gamme de kits	Sociétés
<i>Polymerase chain reaction (PCR)</i>		
PCR	Cobas Amplicor	Roche
RT-PCR	AmpliScreen	Roche
PCR compétitive		Roche
PCR en temps réel		
TaqMan	Cobas TaqMan	Roche
Sondes FRET	RealArt Artus	Qiagen/RealArt Artus
Sondes LightUP	LightCycler	Roche
NASBA	LightUp	LightUp Technologies
TMA	NucliSens	BioMérieux
ADN branché	APTIMA	Gen-Probe
Hybrid Capture	VERSANT	Bayer
SDA	Hybrid Capture	Digene
	BDProbeTec ET	Becton Dickinson

nes sont chimiquement branchées (elles n'existent pas à l'état naturel). Le signal est révélé à l'aide de sondes marquées à la phosphatase alcaline [1]. Ce système est commercialisé par la société Bayer sous la marque Versant®.

#### Système de capture d'hybrides (*Hybrid Capture*)

Dans cette technique d'amplification de signal, l'ADN cible est hybridé à une sonde ARN spécifique. L'hybride ADN-ARN ainsi constitué est capturé par des anticorps spécifiques sur un support solide. L'hybride est détecté par un deuxième anticorps marqué à la phosphatase alcaline. Cette technique est commercialisée par la société Digene.

Le **Tableau 1** rappelle les principales techniques d'amplification et les sociétés commercialisant celles-ci.

#### Autres techniques d'amplification

D'autres techniques d'amplification ont été décrites pour la recherche d'agents infectieux, nous les citerons simplement :

- amplification isotherme à l'aide d'une hélicase, la HDA (*helicase-dependent amplification*) [14] ;
- la MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) [13].

### Techniques de détection

Hormis les traditionnels gels d'agarose ou d'acrylamide servant à révéler un produit amplifié par PCR, de nombreuses autres méthodes de détection sont disponibles. Nous en évoquerons quelques-unes (les automates dédiés à certains kits seront abordés dans un autre paragraphe).

#### Billes magnétiques

La société Luminex commercialise une méthode de détection de séquences amplifiées par PCR multiplex sur billes magnétiques (système xMAP™). Ce système semble actuellement peu développé dans le domaine de la biologie moléculaire appliquée aux agents infectieux. Elle a été décrite pour le moment dans les applications de génétique humaine.

### Puces d'ADN

Parmi les variétés de puces d'ADN se trouvent les microarrays, matrice (en verre ou en silice) en deux dimensions sur laquelle sont fixées selon différents protocoles des sondes d'ADN de plus ou moins grande taille dans un ordre spécifique. Schématiquement, ces sondes peuvent être synthétisées et de petite taille environ 25 nucléotides (par exemple, celles commercialisées par la société Affymétrie) ou de grande taille, environ 60-80 nucléotides (commercialisées par exemple par la société Nanogen). Certaines puces peuvent aussi être dessinées à façon et commandées. Les ADN cibles marqués sont hybridés à la puce puis révélés par un automate dédié et analysés par un logiciel adapté. Les microarrays ne sont pas encore passés dans le domaine de la routine de biologie moléculaire. Le coût élevé de fabrication des puces, des appareils et logiciels, l'interprétation délicate, l'absence de contrôle de qualité rendent le passage à la routine encore difficile. Cette instrumentation est cependant promise à un bel avenir dans les laboratoires de microbiologie spécialisée.

### Techniques de séquençage

Le séquençage est utilisé pour caractériser un agent infectieux notamment lorsque la culture est difficile, l'identification problématique ou dans certaines études épidémiologiques. Dans le cas des bactéries, la cible est souvent constituée par un (ou plusieurs) gène(s) codant pour l'ARN 16S ou la région séparant les gènes codant pour les ARN 16S-23S « *interspacer* ». D'autres régions ont parfois été utilisées par exemple, le gène codant pour une protéine de choc thermique, *hsp65*. Pour les champignons, la cible est souvent la région D2 de la grande sous-unité de l'ARNr. La société Applied Biosystem commercialise le kit MicroSeq™ permettant l'identification bactérienne. Le séquençage dans cette indication est très efficace. Cette technique présente cependant deux inconvénients. Les banques de données à partir desquelles sont effectuées les identifications par comparaison contiennent parfois des erreurs. Par ailleurs, le gène *ARN 16S* étant ubiquitaire dans le monde bactérien, une contamination par une autre bactérie peut amener à une erreur de diagnostic. Le

séquençage précédemment évoqué utilise la plus courante des techniques de séquençage, la méthode de Sanger. Une autre technique plus récente est aussi utilisée dans ces indications, le pyroséquençage, commercialisée par la société Pyrosequencing [1].

Le séquençage présente aussi d'autres indications telles que le génotypage des virus ou la recherche de résistances aux antiviraux. À titre d'exemple, la société Applied Biosystem commercialise des kits de génotypage par séquençage (gamme ViroSeq™).

## Techniques d'hybridation directe

### Hybridation in situ (FISH, *fluorescence in situ hybridization*)

Des sondes ARN 16S ou ARN 23S marquées sont utilisées pour détecter des bactéries directement à partir des échantillons biologiques. Plusieurs espèces peuvent ainsi être directement détectées en même temps à l'aide de fluorophores différents. Une technique dérivée de celle-ci a été développée, la PNA-FISH (*peptide nucleic acid FISH*). Les acides nucléiques peptides (PNA) sont des analogues d'acides nucléiques. À la différence des acides nucléiques, les PNA sont plus stables (hybrides ADN-PNA ou ARN-PNA), pénètrent la paroi bactérienne plus facilement et présentent une meilleure spécificité, leur Tm étant supérieur à l'ADN équivalent [5]. La société AdvanDx commercialise des kits de PNA-FISH.

### Reverse dot-blot : système LiPA (*line probe assay*)

Des sondes spécifiques sont fixées sur une membrane de nitrocellulose. Les produits amplifiés cibles sont hybridés sur la membrane. La détection est effectuée par colorimétrie. La société InnoGenetics commercialise des kits de détection. Cette technique permet d'effectuer le génotypage d'agents pathogènes ou d'étudier des résistances aux antibiotiques (kits Inno-LiPA™).

### Technique HPA (*hybridization protection assay*)

Cette technique utilise une sonde ADN sur laquelle est fixée une molécule d'ester d'acridinium. La sonde marquée est complémentaire de l'ARN ribosomal (ARNr) d'un agent pathogène. Lorsque la sonde s'hybride à l'ARN, un signal luminescent est émis. En milieu alcalin, s'il n'y a pas hybridation, la sonde est détruite et donc, aucun signal n'est observé. Cette technique est utilisée par exemple dans les kits d'identification bactérienne AccuProbe™ (société Gen-Probe).

## Spectrométrie de masse (MS)

La MS est basée sur l'ionisation puis la fragmentation d'une cible en la bombardant d'électrons. Le ratio masse/charge des fragments moléculaires obtenus par désintégration de la cible est analysé dans un second temps, ce qui permet d'établir une signature moléculaire. L'identification bactérienne a souvent été réalisée par la signature protéique des bactéries. Depuis une quinzaine d'années, l'analyse des acides nucléiques par MS notamment grâce à la technique MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization*

*time of flight*) permet l'analyse des acides nucléiques en quelques secondes. Cette technique permet d'analyser des milliers d'échantillons chaque jour [8]. Elle est réservée à l'heure actuelle aux laboratoires de recherche.

## Techniques conventionnelles

Nous en citerons simplement deux [1] :

- la digestion enzymatique (PCR-RFLP) ;
- la PCR aléatoire (RAPD, *random amplified polymorphism DNA*).

## Contrôles de qualité

### Prévention des erreurs

Il est indispensable d'éviter les résultats faussement positifs ou faussement négatifs inhérents notamment aux techniques d'amplification génique. L'organisation d'un laboratoire de biologie moléculaire obéit donc à certains impératifs. Ces derniers ont fait l'objet d'une loi créant le GEBCA (Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale - *Journal Officiel* du 11 décembre 1999). Bien que celui-ci ne soit plus complètement adapté devant l'évolution des techniques en 2006, il reste encore valable dans son concept.

### Faux positifs

Les techniques d'amplification exposent au risque de contamination et donc de rendus de faux positifs. Pour limiter ce risque, outre l'organisation spécifique du laboratoire de biologie moléculaire déjà évoquée, nous évoquerons certaines mesures indispensables ou souhaitables [3,4] :

- l'utilisation d'uracile N glycosylase (UNG). Cette enzyme est incluse dans certains kits mais aussi dans les mélanges réactionnels de PCR en temps réel. Elle devrait être systématiquement utilisée même si elle n'élimine pas complètement le risque de contamination. Son principe est basé sur l'incorporation de dUTP (qui n'existe pas à l'état naturel) à la place de dTTP au cours de la PCR (l'UNG peut aussi être utilisée dans d'autres réactions d'amplification comme la SDA, par exemple). L'UNG clive l'ADN ayant incorporé le dUTP. Ainsi, l'activation de l'UNG avant le démarrage d'une PCR éliminera les éventuels contaminants présents dans le tube. Cette enzyme est ensuite inactivée lors du démarrage de la PCR par dénaturation thermique ;
- l'utilisation de contrôles externes positifs et négatifs ;
- l'utilisation d'automates : certains kits permettent l'utilisation d'automate, diminuant ainsi les risques notamment ceux liés à l'opérateur. Des robots sont aussi parfois employés.

### Faux négatifs

Dans certains types de prélèvements (par exemple, les urines, le sang), il peut exister des inhibiteurs d'amplification (notamment pour la PCR) à l'origine d'un résultat faussement négatif. Pour remédier à ce problème, il est nécessaire d'obtenir une extraction d'acides nucléiques de qualité. De nombreux kits disponibles répondent à cette exigence. Des automates sont également commercialisés dans ce but. Par ailleurs, l'addition d'un contrôle interne d'amplification (inclus dans certains kits) permet de s'assurer de l'absence d'inhibiteur.

### Contrôles de qualité

Des contrôles de qualité nationaux ont été mis en place (par exemple, recherche de l'ARN du virus de l'hépatite C, la charge virale du VIH) permettant ainsi d'assurer la fiabilité et les performances des laboratoires participants. Des contrôles de qualité à l'échelle internationale également sont disponibles.

### Quelle technique utiliser ?

Le choix des techniques en biologie moléculaire est vaste et ne cesse d'évoluer. En microbiologie néanmoins, de nombreux kits et automates sont disponibles facilitant ainsi la mise en place de ces techniques (Tableaux 2,3). Certains critères peuvent aider au choix technique (Tableau 4). Le plus souvent, l'utilisation d'un kit commercial validé facilite la mise en place d'une technique. Le choix du kit dépend de l'habitude de l'utilisateur, de son expérience, des possibilités financières. Au niveau national ou international, aucun consensus n'existe. Beaucoup de kits sont par ailleurs équivalents, même si les techniques utilisées diffèrent. Il n'existe pas de règle spécifique. Le choix d'une technique est donc affaire d'expérience personnelle ou d'équipe.

### Quel résultat attendre ?

En microbiologie, deux types de résultats sont attendus.

#### Résultat qualitatif : présence ou absence d'un agent infectieux

En pratique, il s'agit de la détection de l'acide nucléique issu de l'agent infectieux recherché. Le résultat positif signifie-t-il que l'agent infectieux est vraiment présent, viable et responsable de l'infection ? Si l'étude concerne par exemple, la recherche d'un virus tel que le VHC, l'ARN mis en évidence affirme la présence du virus dans l'échantillon. En revanche, si l'étude concerne une bactérie, par exemple *Mycobacterium tuberculosis*, la bactérie peut être morte (et donc non infectieuse) et l'ADN toujours présent. Dans ce cas, seule la recherche de l'ARN bactérien pourrait affirmer que la bactérie est vivante et donc infectieuse. Dans d'autres cas, l'interprétation peut aussi être délicate. Par exemple, la mise en évidence de *Bartonella* sp dans une endocardite avec culture négative peut être un

vrai positif et la bactérie en est responsable. Mais, comment interpréter un tel résultat si la bactérie mise en évidence est par exemple *Burkholderi picketti* ? En effet, les bactéries sont retrouvées sur tout type de matériel de laboratoire (tubes, réactifs pour la PCR, eau...) y compris dans le sang total de sujets sains [4,11]. L'interprétation nécessite donc de connaître le contexte clinique ainsi que les autres résultats biologiques, informations devant toujours accompagner la recherche d'un agent infectieux.

#### Résultat quantitatif : la charge infectieuse

En pratique hospitalière habituelle, il s'agit essentiellement de la charge virale (le plus souvent hépatite C, B ou VIH). La présence d'un étalon international permet dans certains cas de rendre le résultat en UI/ml (c'est le cas par exemple pour le VHC et le VIH).

### Bases de l'installation d'un laboratoire de biologie moléculaire en microbiologie

Comme tout laboratoire en biologie médicale, le laboratoire de microbiologie doit respecter les règles du GEBEA appliquées à la biologie moléculaire (Arrêté du 26 novembre 1999 relatif à la Bonne exécution des analyses de biologie médicale - *Journal Officiel* du 11 décembre 1999, [www.legifrance.gouv.fr](http://www.legifrance.gouv.fr)). Nous discuterons quelques points importants non précisés dans ce texte (les agents infectieux utilisés pour le bioterrorisme ou les agents infectieux très dangereux étant par ailleurs exclus de cette discussion) et reportons le lecteur à la référence [1] pour plus de précisions.

#### Sécurité contre les agents infectieux

Les échantillons (sang, selles, urines, écouvillons, crachats...) contiennent de nombreux agents potentiellement infectieux (VIH, virus des hépatites...). Les kits d'extraction des acides nucléiques contiennent souvent du thiocyanate de guanidine (TG), agent détruisant les parois cellulaires. Cependant, aucune étude n'a démontré que le traitement par ce produit rendait un échantillon non infectieux. Les solutions de lyse cassant les parois bactériennes (et contenant du TG) rendent non viables un grand nombre d'agents infectieux. Certaines études ont montré que l'autoclavage pouvait être un moyen de désinfecter un échantillon sans détruire les acides nucléiques et permettait l'amplification génique. Certains tampons de transport (par exemple, le tampon STAR de la société Roche Diagnostics) stabilisent les acides nucléiques mais aussi inactivent un grand nombre d'agents pathogènes.

#### Contrôles de qualité

En France, peu de contrôles de qualité à l'échelle nationale ont été mis en place pour la détection d'agents infectieux par technique de biologie moléculaire (par exemple, VHC, VIH - voir le site de l'Afssaps, [www.agmed.sante.gouv.fr/htm/10/cnq/sommaire.htm](http://www.agmed.sante.gouv.fr/htm/10/cnq/sommaire.htm)). Certains organismes interna-

**Tableau 2** Principales gammes de kits commercialisées pour la microbiologie clinique (certains kits ne sont pas disponibles en France et/ou n'ont pas l'agrément de l'Afssaps)

Agents pathogènes	Kits	Sociétés
Les virus		
Virus de l'hépatite C (HCV)	<i>Recherche de l'ARN viral (amplification)</i>	
	(Cobas) AmpliCor HCV (PCR)	Roche
	Cobas AmpliScreen HCV (PCR -- pour les banques du sang)	
	Versant® ARN qualitative assay (TMA)	Chiron
	<i>Quantification de l'ARN viral</i>	
	(Cobas) AmpliCor HCV Monitor (PCR compétitive)	Roche
	Cobas TaqMan (PCR TaqMan en temps réel)	
	Versant® HCV RNA 3.0 (ADN branché)	Bayer
	LCx HCV RNA assay (PCR compétitive)	
	Abbott RealTime HCV (PCR TaqMan en temps réel)	Abott
	<i>Génotypage</i>	
	Versant® HCV genotype assay (LiPA)	Innogenetics/Bayer
	Trugene 5'NC HCV Genotyping (séquençage)	Bayer
Virus de l'hépatite B (HBV)	<i>Quantification de l'ADN viral</i>	
	(Cobas) AmpliCor HBV Monitor	Roche
	(Cobas) AmpliScreen HBV (PCR -- pour les banques du sang)	
	Cobas TaqMan (PCR TaqMan en temps réel)	
	Versant® HBV RNA 3.0 (ADN branché)	Bayer
	LCx HIV-1 RNA (PCR compétitive)	Abott
	Abott real-time HIV-1 (PCR en temps réel)	
	HBV Trender (PCR en temps réel)	Affigene
	<i>Génotypage</i>	
	Trugene HBV Genotyping (séquençage)	Bayer
	Inno-LiPA HBV Genotyping (Reverse dot-blot)	Innogenetics
	Gamme Affigene HBV	
	Mutant VL (extension d'amorce)	Affigene
	DE/3TC (extension d'amorce)	
	<i>Étude de résistance aux traitements</i>	
	Inno-LiPA HBV DR (résistance Lamivudine et famciclovir)	Innogenetics
Inno-LiPA HBV PreCore (étude de la région <i>precore</i> et promoteur <i>basal core</i> )		
HBV Precore ELMA (extension d'amorce/Elisa)	CliniSciences	
Détection de la mutation pré-C G1896A		
VIH	<i>Recherche de l'ARN viral (amplification)</i>	
	(Cobas) AmpliCor VIH (PCR)	Roche
	Cobas AmpliScreen VIH (PCR -- pour les banques de sang)	
	Versant® VIH ARN qualitative assay (TMA)	Bayer
	Versant® VIH RNA 3.0 (ADN branché)	
	RealArt Artus VIH-1 (PCR en temps réel)	Qiagen
	<i>Quantification de l'ARN viral</i>	
	(Cobas) AmpliCor VIH Monitor (PCR compétitive)	Roche
	Cobas TaqMan (PCR TaqMan en temps réel)	
	NucliSens EasyQ VIH-1 (NASBA + Molecular Beacon)	BioMérieux
	RealArt™ VIH-1 (PCR TaqMan en temps réel)	Qiagen
	<i>Recherche de résistance aux antirétroviraux</i>	
	Trugene VIH Genotyping (séquençage)	Bayer
ViroSeq VIH-1 (séquençage)	Celera	
VIH + VHC	<i>Recherche de l'ARN viral (amplification)</i>	
	Procleix VIH/VHC (2 virus) (TMA)	Chiron
VIH + VHC + VHB	<i>Recherche des acides nucléiques viraux (pour les banques du sang)</i>	
	AmpliNAT system (PCR en temps réel-TaqMan)	Roche
	Procleix Ultrio (TMA)	Chiron

(suite)

Tableau 2 (suite)

Agents pathogènes	Kits	Sociétés
CMV	<i>Recherche de l'ADN viral (amplification)</i>	
	NucliSens CMV pp67 (NASBA + Molecular Beacon)	BioMérieux
	Amplicor CMV (PCR)	Roche
	CMV Hybrid capture	Digène
	<i>Quantification de l'ADN viral</i>	
	(Cobas) Amplicor CMV monitor (PCR compétitive)	Roche
	ReSSQ CMV Assay (PCR en temps réel - LightUp)	LightUp Technologies
	RealArt Artus (PCR en temps réel)	Qiagen
CMV Trender (PCR en temps réel)	Affigène	
Papillomavirus (VPH)	<i>Détection de l'ADN viral et génotypage</i>	
	HPV Hybrid Capture 2	Digène
Autres virus	<i>Détection de l'ARN viral du virus respiratoire syncytial (RSV)</i>	
	NucliSens EasyQ RVS A + B (NASBA + Molecular Beacon)	BioMérieux
	<i>Détection du virus West Nile</i>	
	Procleix West Nile virus (TMA)	Chiron
	RealArt Artus WNV (RT-PCR)	InVitrogen
	Certified Lux primer VWN (amorces pour PCR en temps réel)	Qiagen
	<i>Détection des ARN des Entérovirus</i>	
	NucliSens EasyQ Enterovirus (NASBA + Molecular Beacon)	BioMérieux
	RealArt Artus Enterovirus (RT-PCR en temps réel)	Qiagen
	<i>Détection des virus Influenza A/H5</i>	
	TaqMan A/H5 Influenza (PCR en temps réel-TaqMan)	Applied Biosystems
	RealArt Artus Influenza/H5 (PCR en temps réel)	Qiagen
	<i>Quantification des virus-Gamme LightCycler (PCR en temps réel)</i>	
	Liste de virus (non exhaustif)	
	Parvovirus B19	Roche
	Virus de l'hépatite A	
	Virus Epstein-Barr (VEB)	
	Herpès simplex 1 et 2	
	<i>Quantification du virus EBV (PCR en temps réel-LightUp)</i>	
	ReSSQ EBV Assay	LightUp Technologies
	RealArt Artus EBV	Qiagen
	EBV Trender	Affigène
	<i>Quantification du virus SARS Coronavirus (PCR en temps réel-LightUp)</i>	
	ReSSQ SARS Assay	LightUp Technologies
	RealArt Artus SARS	Qiagen
	Certified Lux primer SARS (amorces pour PCR en temps réel)	InVitrogen
	<i>Gamme Realart Artus (PCR TaqMan en temps réel)</i>	
	HHV-6	Qiagen
	Virus de l'hépatite A	
	Virus de l'hépatite B	
Herpès simplex 1 et 2 (HSV1/2)		
Influenza virus		
Parvovirus 19		
Varicelle-zona (VZV)		
<i>Détection du virus de la grippe aviaire</i>		
Certified Lux primer Avian influenza A (amorces pour PCR en temps réel)	InVitrogen	
<i>Gamme Affigène (PCR en temps réel)</i>		
BKV Trender (sang total ou urines)	Affigène	
HSV 1 et 2 Tracer (LCR, vésicules)		
VZV (varicelle zona) [LCR, vésicules]		
Les bactéries		
<i>Chlamydia trachomatis</i> (CT)	<i>Détection après amplification</i>	
	(Cobas) Amplicor CT/NG (PCR)	Roche
<i>Neisseria gonorrhoea</i> (NG)	(Cobas) TaqMan CT (PCR en temps réel)	Roche

(suite)

Tableau 2 (suite)		
Agents pathogènes	Kits	Sociétés
Mycobacterium tuberculosis (MT) Mycobacterium sp	Amplified (uniquement CT) (NASBA)	BioMérieux
	Aptima COMbo 2 (TMA et HPA)	Gen-Probe
	Peut aussi être isolée (CT ou NG)	
	BD ProbeTec CT/NG (SDA)	Becton-Dickinson
	Hybrid Capture CT/GC	Digene
	RealArt artus (PCR en temps réel)	Qiagen
	Détection directe sur échantillon	
	Pace 2 (existe aussi uniquement pour CT ou NG)	BioMérieux
	Détection sur culture (HPA)	
	Accuprobe NG (HPA)	Gen-Probe
	Détection combinée ou isolée de CT et NG	
	CT ID, GC ID, CT/GC Hybrid Capture 2	Digene
	Détection après amplification	
Cobas Amplicor Mycobacterium Avium (PCR)	Roche	
Cobas Amplicor Mycobacterium intracellulare (PCR)		
Amplified (complexe MT) [TMA et HPA]	BioMérieux	
Détection après amplification		
Genotype Mycobacteria Direct (NASBA et reverse dot-blot) ( <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>Mycobacterium kansasii</i> , <i>Mycobacterium mageritense</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex)	Hain Lifescience	
RealArt artus ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex)	Qiagen	
Détection directe sur prélèvement		
Genotype® MTB Direct v3.0 (reverse dot-blot) [ <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>M. tuberculosis</i> complex]	Biocentric	
Détection sur culture		
AccuProbe (HPA)	Gen-Probe	
Nombreuses mycobactéries ( <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. kansasii</i> )		
AccuProbe (complexe MT) (HPA)		
Inno-LiPA Mycobacteria (Reverse dot-blot) [ <i>M. tuberculosis</i> complex, <i>M. kansasii</i> , <i>Mycobacterium xenopi</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>Mycobacterium genavense</i> , <i>Mycobacterium simiae</i> , <i>Mycobacterium marinum</i> et <i>Mycobacterium ulcerans</i> , <i>Mycobacterium celatum</i> , mais, <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>Mycobacterium haemophilum</i> , <i>Mycobacterium chelonae</i> complex, <i>Mycobacterium fortuitum</i> complex, et <i>Mycobacterium smegmatis</i> ]	Innogenetics	
Genotype® Mycobacterium MTBC (Reverse dot-blot) Complex		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
Genotype® Mycobacterium CM/AS (Reverse dot-blot) Identification de 26 mycobactéries ( <i>M. avium</i> ssp., <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. gordonae</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. scrofulaceum</i> , <i>M. interjectum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. mageritense</i> , <i>Mycobacterium peregrinum</i> , <i>M. marinum</i> / <i>M. ulcerans</i> , Complexe <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. simiae</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>Mycobacterium goodii</i> , <i>M. celatum</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. genavense</i> , <i>Mycobacterium lentiflavum</i> , <i>Mycobacterium heckeshornense</i> , <i>Mycobacterium szulgai</i> / <i>Mycobacterium intermedium</i> , <i>Mycobacterium phlei</i> , <i>M. haemophilum</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. ulcerans</i> , <i>Mycobacterium gastri</i> , <i>Mycobacterium asiaticum</i> , <i>Mycobacterium shimoidei</i> )	Biocentric	
Genotype® MTBDR (Reverse dot-blot)		
Détection des résistances de <i>M. tuberculosis</i> à l'isoniazide et à la rifampicine		
Autres bactéries	Identification générale de bactéries	
	Séquençage de régions bactériennes (cf. ARN 16S)	Celera
	Microseq	Biotage
	PyroMark	
	Détection sur culture	

(suite)





**Tableau 4** Exemples de critères de décision pour choisir une technique

Critères	Techniques considérées
Nombre d'échantillons	Automate et kit(s) adapté(s) PCR en temps réel PCR multiplex
Seuil de sensibilité bas	Kits
Détection de plusieurs cibles	PCR multiplex PCR en temps réel multiplex
Détection bactérienne « large »	Séquençage ARN 16S ou ARNr
Résistante bactérienne	PCR en temps réel Kit
Simplicité d'utilisation	Kit

**Tableau 5** Cotation des actes de biologie moléculaire appliquée à l'infectiologie (au 30 juin 2006)

Pathologies	Cotation (B)
<i>Embryopathies infectieuses (Diagnostic prénatal)</i>	
ADN <i>Toxoplasma gondii</i>	600
ADN CMV (cytomégalovirus)	600
ADN VZV (varicelle-zona) [hybridation ± amplification]	600
ARN virus de la rubéole par RT-PCR	450
ADN Parvovirus (hybridation ± amplification)	600
<i>Recherche de génome bactérien</i>	
Mycobactéries	
En cas de culture positive (hybridation moléculaire suivie de l'identification)	150
Diagnostic direct (tissus et LCR) [hybridation ± amplification]	250
Chlamydia	
ADN ou ARN (hybridation sans amplification) [endocol, urètre, conjonctive]	60
ADN ou ARN (amplification) [urines, sperme, ponction, biopsie, sécrétions bronchopharyngées, péritoine, conjonctive]	100
<i>Recherche de génome viral</i>	
Recherche qualitative d'ARN viral	200
HBV (virus de l'hépatite B) recherche qualitative de l'ADN (hybridation ± amplification)	150
HCV (virus de l'hépatite C)	
Recherche qualitative de l'ARN	250
Charge virale	300
Génotypage du VHC	400
VIH (virus de l'immunodéficience humaine)	
Charge virale : B 300	300
Papillomavirus humains oncogènes (VPH) par hybridation moléculaire avec/sans amplification	
En cas de frottis équivoque de signification indéterminée sur cellules de frottis cervico-utérin (possible aussi sur frottis vulvaire, anal, urétral et biopsies)	180

tionaux (par exemple, l'ESCV, European Society for Clinical Virology et l'ESCMD, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) proposent aussi des contrôles de qualité de biologie moléculaire à l'échelle internationale (voir le site [www.qcmd.org](http://www.qcmd.org)). Par conséquent, dans la majorité des cas, chaque laboratoire doit assurer ses propres contrôles afin de valider les résultats [2]. Les contrôles de qualité « maison » doivent assurer la précision, la sensibilité et la spécificité des résultats, et en cas de quantification les seuils de mesure (minimum et maximum). Le protocole détaillé doit être rédigé en conformité avec le GEBEA.

### Contrôles positifs et négatifs

Pour garantir un résultat en microbiologie, des contrôles positifs et négatifs doivent être ajoutés à la série réalisée. Le contrôle positif peut être obtenu à partir d'un échantil-

lon positif (donc infectieux) ou à partir d'un échantillon (ou d'un pool) négatif dans lequel a été ajouté volontairement l'agent infectieux.

Le contrôle négatif est souvent constitué par le mélange réactionnel sans ADN (remplacé par de l'eau). Il s'agit plutôt dans ce cas d'un « blanc », un vrai contrôle négatif étant un échantillon sans agent infectieux. En cas de quantification, la présence de deux contrôles à deux valeurs différentes est recommandée.

### Contrôles internes et d'inhibition

Un inhibiteur d'amplification peut donner un résultat faussement négatif. La présence d'un contrôle interne permet de s'assurer qu'il n'existe pas d'inhibiteur d'amplification dans l'échantillon étudié. Ce contrôle interne est inclus dans de nombreux kits. En cas de technique « maison », le contrôle interne peut être présent dans le spécimen

d'origine (contrôle homologue, par exemple, un gène de  $\beta$ -globine, GAPDH...) ou être un acide nucléique différent de la cible étudié et ajouté dans l'échantillon (contrôle exogène, par exemple, acide nucléique amplifié avec les mêmes amorces que la cible mais de séquence nucléique interne différente).

### Risque de contamination

La contamination est la hantise permanente du biologiste en biologie moléculaire. Outre les mesures d'organisation d'un laboratoire décrites dans le GEBEA, des mesures déjà décrites telles que l'utilisation de contrôles positifs et négatifs, et l'addition d'uracile-N-glycosylase doivent être prises. Il est important de souligner que l'addition (systématique dans certains kits) d'uracile-N-glycosylase accroît la sécurité du système, mais ne rend jamais nul pour autant le risque de contamination. Les automates constituent aussi une solution intéressante pour limiter le risque de contamination. Le personnel doit être sensibilisé à ce risque et être formé. Les procédures doivent être clairement écrites et strictement respectées par les opérateurs. Il est d'ailleurs intéressant de noter que l'une des raisons du succès de la PCR en temps réel est la diminution importante du risque de contamination. En effet, il s'agit d'un système fermé où le tube n'est plus ouvert après addition de l'échantillon et du milieu réactionnel.

### Logistique

Sans rentrer dans les détails, selon la nature des échantillons analysés et la pathologie en cause, il est indispensable de mettre en place des conditions de prélèvements, de transport, de délivrance et de conservation strictes [2]. Bien évidemment, les renseignements cliniques et biologiques du patient sont aussi fondamentaux.

### Cotation des actes de biologie moléculaire

Elle est disponible en ligne sur le site de l'assurance maladie, Ameli (<http://www.ameli.fr/76/nabm.html>). Le Tableau 5 résume cette cotation. Certaines obligations doivent être respectées :

- pour l'amplification génique et l'hybridation :
  - obligation de dépistage des inhibiteurs ;
  - contrôle de la sensibilité du test ;
  - dépistage de contamination ;
  - analyse individuelle ;
- pour la conservation des échantillons :

- un an à  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  minimum (mycobactéries et VHB) ;
  - un an à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (*Chlamydiae* et virus).
- À suivre.

### Références

- [1] Ameziane N, Bogard M, Lamoril J. Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Campus Référence : Elsevier; 2005.
- [2] Apfalter P, Reischl U, Hammerschlag MR. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? *J Clin Microbiol* 2005;43:5835-41.
- [3] Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Ann Clin Lab Sci* 2004;34:389-96.
- [4] Borst A, Box AT, Fluit AC. False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: suggestions for a prevent and destroy strategy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:289-99.
- [5] Buchardt O, Egholm M, Berg RH, Nielsen PE. Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology. *Trends Biotechnol* 1993;11:384-6.
- [6] Domiati-Saad R, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta* 2006;363:197-205.
- [7] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.
- [8] Lowe CA, Diggle MA, Clarke SC. A single nucleotide polymorphism identification assay for the genotypic characterisation of *Neisseria meningitidis* using MALDI-TOF mass spectrometry. *Br J Biomed Sci* 2004;61:8-10.
- [9] Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol* 2006;6:2-12.
- [10] Mothershed EA, Whitney AM. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: present and future considerations for the clinical laboratory. *Clin Chim Acta* 2006;363:206-20.
- [11] Nikkari S, McLaughlin IJ, Bi W, Dodge DE, Relman DA. Does blood of healthy subjects contain bacterial ribosomal DNA? *J Clin Microbiol* 2001;39:1956-9.
- [12] Nilsson M, Dahl F, Larsson C, Gullberg M, Stenberg J. Analyzing genes using closing and replicating circles. *Trends Biotechnol* 2006;24:83-8.
- [13] Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijjer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e57.
- [14] Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep* 2004;5:795-800.
- [15] Zhang D, Wu J, Ye F, Feng T, Lee I, Yin B. Amplification of circularizable probes for the detection of target nucleic acids and proteins. *Clin Chim Acta* 2006;363:61-70.