




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.



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



MICROBIOLOGIE

Diagnostic microbiologique : du diagnostic par étiologie au diagnostic par syndrome

Microbiological diagnosis: Etiologic driven and syndrome driven

F. Gouriet, D. Raoult*

Unité des rickettsies CNRS-IRD UMR 6236, faculté de médecine, université de la Méditerranée, 27, boulevard Jean-Moulin, 13385 Marseille cedex 5, France

MOTS CLÉS

Multiplexage ;
PCR ;
Sérologie ;
Diagnostic ;
Microbiologie ;
Syndrome

KEYWORDS

Multiplexed ;
PCR ;
Serology ;
Diagnosis ;
Microbiology ;
Syndrome

Résumé

Objectifs. – Depuis les dix dernières années, l'introduction de la biologie moléculaire et l'automatisation ont radicalement changé les pratiques dans les laboratoires de microbiologie clinique. L'amélioration de la communication entre les microbiologistes et les cliniciens ainsi que les évolutions technologiques telles que la standardisation et le développement de tests diagnostics plus rapides ont conduit à une réorganisation des laboratoires de microbiologie.

Méthodes. – Jusqu'à présent la prescription des examens ciblait un diagnostic étiologique précis, actuellement l'évolution se fait vers le diagnostic par syndrome incluant un panel de tests regroupant les étiologies responsables d'un syndrome donné y compris les pathogènes émergents.

Résultats et conclusions. – Dans cette revue, nous avons résumé les développements technologiques les plus récents en matière de diagnostic microbiologique adapté au diagnostic par syndrome incluant les stratégies de diagnostic exhaustif, les *DNA microarray* et les *microarray* antigéniques.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary

Objectives. – Over the past decade, the introduction of techniques of molecular biology and the automation have undergone important changes in the practice of clinical microbiological laboratories.

Methods. – Commonly, physician prescriptions are etiology driven for emerging infectious agent. The improving in test standardization and rapidity and the best communication between physician and clinical microbiologist lead to profound changes in microbiology laboratories.

* Auteur correspondant.

Adresses e-mail: frederique.gouriet@univmed.fr, frederique.gouriet@mail.ap-hm.fr (F. Gouriet), didier.raoult@gmail.com (D. Raoult).

Results and conclusion. — The present review summarizes the recent development in multiplexed microbiological technology adapted to syndrome driven diagnosis, including sampling strategy, DNA microarray and antigenic microarray.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Depuis ces dix dernières années, les avancées technologiques telles que l'apport de la biologie moléculaire, l'automatisation de la bactériologie (incubation et détection de la croissance bactérienne dans les flacons d'hémoculture, identification bactérienne et réalisation d'antibiogrammes), ont contribué au changement des pratiques dans les laboratoires de microbiologie [1]. En effet, aujourd'hui le diagnostic en microbiologie est guidé par la recherche d'une étiologie précise. Il est prescrit pour identifier la présence d'un microorganisme particulier dans un échantillon donné. Par exemple, le liquide céphalorachidien peut être adressé au laboratoire de microbiologie pour la recherche isolée de l'herpès simplex virus de type 1 dans le cadre d'une méningoencéphalite, ou encore un frottis sanguin peut être adressé uniquement pour la recherche de *Plasmodium* sp. dans le cadre d'une fièvre au retour des tropiques. Cependant, le besoin émerge de prescrire un panel de tests qui corresponde à un syndrome donné. Par exemple, lorsqu'une culture de prélèvement biopsique ou encore de sang, est adressée au laboratoire, la recherche de bactérie et de

champignon est systématique. La tâche du microbiologiste est difficile et représente un véritable défi, puisqu'il doit anticiper les techniques à mettre en œuvre pour rechercher les différents microorganismes potentiellement présents dans les échantillons biologiques qui lui sont soumis. L'optimisation du diagnostic microbiologique repose sur des méthodes de diagnostic direct des pathogènes telles que la culture axénique ou cellulaire, la microscopie électronique, la cytométrie en flux, l'immunofluorescence directe [2], la *polymerase chain reaction* (PCR), ou les méthodes de diagnostic indirect par sérologie. Le nombre d'agents infectieux détectés pouvant être testés simultanément est illimité, une stratégie de diagnostic par syndrome peut être développée au sein du laboratoire de microbiologie. Au sein de notre laboratoire de microbiologie, nous avons développé une stratégie de diagnostic exhaustive par syndrome. Elle est mise en place depuis plus de dix ans sous forme de « kits » regroupant la recherche d'agents étiologiques dans des thématiques diverses (Tableau 1) telles que les pneumopathies nosocomiales [3], les fièvres au retour d'un pays tropical [4], les arthrites et les ostéites [5], les endocardites [6], les péricardites [7,8] les uvéites [9], les méningoencéphali-

Tableau 1 Liste des « kits » utilisés au laboratoire.

List of kits used in our laboratory.

Nom du kit	Tests réalisés	Date	Nombre de prélèvements	Publication
Liquide péricardique	Sur les biopsies ou les ponctions péricardites Culture cellulaire virale, culture bactérienne standard, culture cellulaire bactérienne, culture mycobactérie Biologie moléculaire PCR : CMV, EBV, HSV1, HSV2, EBV, HHV6 Amplification universelle : ADN r 16S et champignon	Mai 1998–juin 2005	106	[7,73]
Péricardites	Autres tests Anticorps antinucléaires Ac anti-TSH 2 hémocultures (aérobie et anaérobie) Examen anatomopathologique Sérologies <i>Bartonella henselae</i> Houston, <i>Bartonella henselae</i> Marseille, <i>Bartonella quintana</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Brucella melitenis</i> , <i>Legionella pneumophila</i> <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> , Cytomégalovirus, Epstein-Barr virus, herpès virus 1 et 2, hépatite C, virus de l'immunodéficience humaine, virus influenza et adénovirus Écouvillonnage pharyngé Cultures cellulaires virales	Mai 1986–décembre 2002	204	

Tableau 1 (Suite)

Nom du kit	Tests réalisés	Date	Nombre de prélèvements	Publication
Infections osseuses	Biologie moléculaire Amplification universelle : ADN r 16S Culture bactérienne standard	Novembre 2003– septembre 2004	525	[5]
Endocardites infectieuses	Sérologies <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Bartonella henselae</i> Houston, <i>Bartonella henselae</i> Marseille <i>Bartonella quintana</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Aspergillus</i> Autres tests Facteurs rhumatoïdes Hémocultures Valve cardiaque Amplification universelle : ADN r 16S et champignon Culture bactérienne standard, culture cellulaire bactérienne	Avril 1994– décembre 2004	1998	[6,74]
Uvéites	Sérologie <i>Bartonella henselae</i> Houston, <i>Bartonella henselae</i> Marseille, <i>Bartonella quintana</i> , <i>Bartonella grahamii</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Leptospira</i> sp., <i>Rickettsia</i> sp., <i>Chlamydia trachomatis</i> , syphilis : TPPA VDRL Biologie moléculaire <i>Bartonella</i> spp. <i>Tropheryma whipplei</i> Spirochètes Amplification de l'ADNr 16S Champignon universel	Janvier 2001–septembre 2007	1321	[9]
Pneumonies nosocomiales	Lavage broncho-alvéolaire Cultures virales Culture bactérienne standard Milieu <i>Legionella</i> Culture de mycobactéries, culture cellulaire, coculture amibes Biologie moléculaire <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Legionella anisa</i> , <i>Parachlamydia</i> sp., <i>Bosea</i> spp., <i>A. polyphaga</i> , mimivirus Sérologies <i>L. pneumophila</i> , <i>L. anisa</i> , <i>L. bozemani</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>Parachlamydiae acanthamoeba</i> , <i>Afipia birgae</i> , <i>A. broomeae</i> , <i>A. cleavlandensis</i> , <i>A. felis</i> genospecies A, <i>Afipia</i> genospecies 1-3, <i>Azorhizobium caulinodans</i> , <i>Bosea eneeae</i> , <i>B. massiliensis</i> , <i>B. thiooxydans</i> , <i>B. vestrii</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , <i>B. lianinense</i> , <i>L. quinlivani</i> , <i>L. rubrilucens</i> , <i>L. worsleiensis</i> , <i>Mesorhizobium amorphae</i> , <i>Rasbo bacterium</i> , <i>Acanthamoeba polyphaga</i> mimivirus Antigénurie <i>L. pneumophila</i> serogroup 1 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydiae psittaci</i> , <i>Coxiella burnetii</i>	Décembre 2001– juin 2003	210	[3]

tes, les infections chez les patients sans domicile fixe [10]. Le balayage systématique et exhaustif des différents agents pathogènes au travers des ces différents « kits » optimise et standardise le diagnostic microbiologique. Par exemple, dans le cadre des infections acquises au cours de la grossesse, les étiologies des agents infectieux responsables d'anomalie congénitale sont regroupés sous le terme de TorCH syndrome (acronyme pour *Toxoplasma gondii*, autre microorganisme tel que syphilis, rubéole, cytomégalovirus, *herpes simplex virus* [HSV]). Le dépistage simultané [11] et précoce de ces infections est primordial pour la prise en charge de la grossesse. Un autre exemple est celui du bioterrorisme, les agents infectieux sont classés par leur facilité de dissémination dans l'environnement, leur taux de morbidité et de mortalité. La détection d'une intoxication ou d'une infection par l'un de ces agents peut également faire partie d'un panel de tests réalisés conjointement [12] dans les plus brefs délais autorisant une prise en charge rapide et optimale de la population cible. De plus, le pronostic des infections graves telles que les endocardites infectieuses ou les pneumopathies nosocomiales [3] repose sur un diagnostic microbiologique rapide [6]. Une approche systématique testant l'ensemble des pathogènes responsables de telles affections permet de gagner un temps considérable pour le patient. Aujourd'hui, le diagnostic microbiologique traditionnel a laissé place, en partie, aux méthodes moléculaires appliquées au diagnostic des maladies infectieuses. Les techniques de première génération permettaient de détecter un seul pathogène à la fois ; actuellement, elles sont standardisées et automatisées. Largement employées, la PCR et la RT-PCR présentent non seulement une sensibilité de détection élevée, mais permettent également d'identifier rapidement les agents pathogènes incriminés ainsi que les microorganismes échappant aux méthodes conventionnelles. L'apport de la PCR quantitative en temps réel ou *real-time* PCR a été considérable. Elle est rapide (30–40 minutes) et offre la possibilité de quantifier et d'identifier les produits de PCR dans un système fermé limitant les risques de contamination. Actuellement, le développement récent des tests moléculaires multiplexés ou PCR *multiplex* autorise la détection simultanée de divers agents infectieux responsables d'infections virales [13], bactériennes [14], parasitaires [15], fongiques ou mixtes. En microbiologie, l'identification de tous les microorganismes, par analyse des séquences de l'ADN 16S ribosomal, présents dans les échantillons biologiques, constitue une étape préliminaire à la métagénomique. En effet, l'identification de nouveaux pathogènes a été possible grâce à l'étude des séquences de l'ADN 16S ribosomal, par exemple, dans le cadre des vaginoses bactériennes [16], des prélèvements respiratoires chez les mucoviscidosiques [17], des ostéites [5]. Les tests moléculaires sont plus sensibles que les techniques traditionnelles, notamment pour le diagnostic des infections virales ou bactériennes, ou lors de la prise d'antibiotiques. Cependant, les méthodes conventionnelles restent les outils les plus utilisés en routine et demeurent très importantes en matière de diagnostic des pathologies infectieuses. L'évolution technologique des *microarray* protéiques offrent actuellement la perspective d'effectuer le sérodiagnostic des maladies infectieuses en déterminant de façon simultanée et multiparamétrique la détection de pathogènes et ou de différentes classes spécifiques d'anti-

corps dirigés (IgG, M, A) contre plusieurs antigènes bactériens et viraux [18].

Le diagnostic sérologique multiplexé

La recherche d'anticorps spécifiques dirigés contre les agents infectieux, présents dans le sérum du patient, reste un outil utile pour le diagnostic microbiologique indirect en maladies infectieuses [19]. En effet, le sérum est facile à obtenir, il peut être conservé sur du papier buvard [20]. Les anticorps sont des protéines relativement stables qui montrent une excellente spécificité et une forte affinité vis-à-vis de leur antigène. La réaction d'immunofluorescence indirecte est l'une des techniques sérologiques la plus couramment utilisée en routine, elle est sensible, spécifique et adaptable [21].

Dans notre laboratoire, Centre national de référence des rickettsioses, nous effectuons quotidiennement le sérodiagnostic des infections à bactéries intracellulaires de culture difficile causées par les différentes espèces de rickettsies, *Coxiella burnetii*, *Bartonella* sp., *F. tularensis* et *Ehrlichia*. Nous utilisons l'immunofluorescence indirecte, qui est actuellement la technique de référence pour le sérodiagnostic des rickettsioses. Nous avons adapté cette technique sous forme de microméthode permettant la détection simultanée des agents infectieux cités ci-dessus. Tous les antigènes utilisés sont produits au laboratoire selon des procédures déjà décrites [22–25]. Les antigènes sont déposés au moyen d'une plume sur une lame de verre six puits (Thermo Scientific, Portsmouth, États-Unis). Chaque puits peut contenir jusqu'à cinq antigènes. Ainsi tous les sérums envoyés au Centre national de référence dans le cadre d'une fièvre éruptive avec ou sans notion de piqûre d'arthropode font l'objet d'un dépistage systématique qui comprend un panel de dix à 15 antigènes spécifiques en fonction de l'origine géographique du prélèvement (Europe, Asie, Amérique ou Afrique) (Tableau 2). Ces sérums sont quantifiés en IgG, en IgM et en IgA pour *C. burnetii*. Tous les sérums adressés pour le diagnostic des endocardites infectieuses à hémocultures négatives, de péricardites ou d'adénopathies font également l'objet d'un dépistage systématique d'un panel d'antigènes (Tableau 2). Cette attitude systématique nous a permis d'effectuer le diagnostic de co-infection à *C. burnetii* et maladies transmises par les arthropodes [26], de péricardite à *C. burnetii* non évoqué au moment du diagnostic de la péricardite [27]. Dans le cadre des adénopathies adressées au laboratoire pour le diagnostic de la maladie des griffes du chat, nous effectuons un dépistage sérologique systématique de *B. henselae*, *B. quintana*, *C. burnetii* et *F. tularensis*. Cela nous a permis d'effectuer le diagnostic de cas de fièvre Q [28] et de cas de tularémie, non suspectés au départ par le clinicien. De plus, cette attitude sérologique systématique est complétée par une analyse en culture standard et cellulaire, par une analyse en biologie moléculaire et en anatomopathologie. Nous avons effectué le diagnostic de maladie de griffes du chat, mais aussi de tuberculose ganglionnaire et de néoplasies [29]. Des lames d'immunofluorescence indirecte multiplexée Biochip Mosaics™, commercialisées par Euroimmun® (Luebeck, Allemagne) destinées au sérodiagnostic des maladies infectieuses sont également actuellement disponibles.

Tableau 2 Liste des tests réalisés à l'unité des Rickettsies dans la cadre de diagnostic sérologiques par syndrome.
List of tests achieved in the Rickettsies unit in the context of serologic diagnostic per syndrome.

Standard	<i>Coxiella burnetii</i> phase II, <i>R. conorii</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. typhi</i> , <i>F. tularensis</i> , <i>B. henselae</i> Marseille, <i>B. henselae</i> Houston, <i>B. quintana</i> , Mimivirus, HGE
Adénopathie	<i>Coxiella burnetii</i> phase II, <i>F. tularensis</i> , <i>B. henselae</i> Marseille, <i>B. henselae</i> Houston
Endocardites	<i>Coxiella burnetii</i> phase II, <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>arupensis</i> , <i>B. alsatica</i> , <i>B. elizabethae</i> , <i>B. vinsonii</i> subsp. <i>berkhoffii</i> , <i>B. henselae</i> Houston, <i>B. henselae</i> Marseille, <i>B. quintana</i> , <i>Bartonella washoensis</i> , <i>Bartonella koehlerae</i>
Pneumopathies	<i>Coxiella burnetii</i> phase II, hall coccus, Mimivirus, BN9
Uvéites	<i>B. henselae</i> Houston, <i>B. henselae</i> Marseille, <i>B. quintana</i> , <i>B. grahamii</i> , <i>Coxiella burnetii</i> phase II
Piqûre de tique européenne	<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i> , <i>R. sibirica mongolotimonae</i> , <i>R. slovaca</i> , <i>R. aeschlimanii</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. typhi</i> , <i>R. massiliae</i> , <i>R. akari</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>Wolbakia pipientis</i> , <i>Ehrlichia chaffeensis</i>
Piqûre de tique africaine	<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i> , <i>R. sibirica mongolotimonae</i> , <i>R. aeschlimannii</i> <i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. typhi</i> , <i>R. massiliae</i> , <i>R. africae</i> , <i>R. akari</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>Wolbakia pipientis</i> , <i>Ehrlichia chaffeensis</i>
Piqûre de tique asiatique	<i>R. honei</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>indica</i> , <i>R. japonica</i> , <i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>R. felis</i> , <i>R. typhi</i> , <i>R. slovaca</i> , <i>R. heilongjiangensis</i> , <i>Orientia tsutsugamushi</i>
Piqûre de tique américaine	<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i> , <i>R. rickettsii</i> , <i>R. parkeri</i> , <i>R. africae</i> , <i>R. belli</i> <i>B. bacilliformis</i>
Patient sans domicile fixe	<i>R. felis</i> , <i>R. typhi</i> , <i>R. prowazekii</i> , <i>B. quintana</i> , <i>Borrelia recurrentis</i>

La technologie des puces à biomolécules a pris naissance à la suite des travaux de Roger Ekins, décrivant les avantages potentiels d'un système miniaturisé, les *microspots*, par rapport à d'autres systèmes d'étude des interactions moléculaires ont de nombreuses applications en maladie infectieuse [30–32]. Actuellement, le développement de la technologie à haut débit des puces à protéines a permis la miniaturisation des tests conventionnels. Au cours de ces dix dernières années, le séquençage des génomes microbiens associé au développement des outils informatiques, ont permis d'identifier des biomarqueurs antigéniques spécifiques et immunoprotéomiques. Ces récentes avancées en matière de bioinformatique et de spectroscopie de masse ont un rôle important en matière d'identification des protéines. L'application de l'étude du protéome au sérodiagnostic des microorganismes pathogènes tels que immunoblot, l'électrophorèse bidimensionnelle constitue le point de départ de l'identification à haut débit de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques et de nouvelles cibles antimicrobiennes. Cette approche a été utilisée pour le diagnostic des infections à *Tropheryma whipplei* [33]. Ces antigènes ou biomarqueurs identifiés peuvent être produits en utilisant des protéines recombinantes et être utilisés pour des puces antigéniques à visée diagnostique. Les tests antigéniques multiplexés offrent la possibilité de pouvoir déterminer de façon simultanée et multiparamétrique les sous-classes d'immunoglobulines (G, M, A) spécifiques dirigés contre plusieurs pathogènes viraux, bactériens ou parasitaires. Une des premières micropuces « anti-infectieuses » développée concernait les antigènes responsables du TorCH syndrome [18]. De plus, le développement des tests multiplexés protéiques utilisant l'immunofluorescence indirecte a été favorisée par la nouvelle génération de fluorophores [34]. La plupart des puces protéiques antigéniques sont construites sur des surfaces planes (lame de verre, membrane). La détection des anticorps se fait sur le principe de la détection de la fluorescence. Celle-ci est automatisée, la lecture se faisant au moyen d'un scanner, la quantification de la fluorescence est réalisée à partir de courbe de calibration interne [18]. L'automatisation de ces techniques sérologiques

offre la possibilité de standardiser l'immunofluorescence indirecte, réduisant ainsi les variabilités inter- et intralaboratoire. La société InoDiag[®] (La Ciotat, France) a développé des puces multiplexées pour le sérodiagnostic par syndrome en maladies infectieuses, qui a l'avantage d'utiliser l'immunofluorescence indirecte et d'être totalement automatisée. Les puces antigéniques ont d'autres applications et peuvent jouer un rôle novateur dans l'identification bactérienne. Elles ont été utilisées pour le sérotypage de bactéries tel que *Salmonella* [35] ou *Bartonella* sp. [36].

L'utilisation de *suspension array* créée par l'immobilisation des antigènes ou des anticorps sur une surface représentée par des microsphères associées à une analyse par cytométrie en flux, est une solution alternative pour le diagnostic multiplexé. La cytométrie en flux est une méthode automatisée, initialement développée pour mesurer les caractéristiques optiques et fluorescentes des cellules ou des particules en solution. Les cytomètres en flux sont de plus en plus performants, ainsi des cytomètres conventionnels et hybrides ont fait leur apparition. Dans ces cytomètres, le même laser est utilisé pour générer tous les signaux. Leur utilisation offre la possibilité de standardiser les tests multiplexés dans le cadre des maladies infectieuses [37]. Plus récemment, des cytomètres en flux dédiés aux *suspension array* incluant les tests multiplexés désignés pour plus de 100 opérations, ont été développés (« Luminex 100 » Corporation (Austin TX, États-Unis). La technologie Luminex[™] est une technologie récente [38] fondée sur le principe de la cytométrie en flux et qui allie l'utilisation de microsphères fluorescentes et une double lecture après excitation par deux lasers. Actuellement, un panel de 100 billes renfermant un ratio différent de fluorescence rouge et orange est utilisable. Ces différentes billes peuvent être couplées à leur surface avec des sondes oligonucléotidiques, des peptides ou des anticorps, permettant ainsi la détection d'allèles, d'anticorps ou de peptides. La technologie Luminex[™] a été utilisée pour déterminer et quantifier de façon multiplexée des acides nucléiques des virus de l'immunodéficience humaine (VIH), du virus de l'hépatite C (HCV), et

des HSV [39]. Elle a également été utilisée pour la détection multiplexée d'anticorps spécifiques dirigés contre quatre agents responsables de bioterrorisme [12].

Les techniques de PCR

Les puces à ADN ou *DNA microarray*

Une puce à ADN ou *DNA microarray* est constituée de fragments d'ADN immobilisés sur un support solide selon une disposition ordonnée. D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon (appelées parfois *macro-arrays* par opposition aux *microarrays*), les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre. Les progrès de la robotique permettent aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de verre. Les applications des *microarrays* en microbiologie s'étendent sur plusieurs domaines : la détection et l'identification des microorganismes, l'analyse de l'expression des gènes. Plusieurs types de puces sont utilisées selon la densité des spots, leur mode de fabrication, la nature des fragments fixés à leur surface et les méthodes d'hybridation [40]. On distingue essentiellement deux types de puces : les puces dites « spottées » par un dépôt robotisé de produits de PCR ou de longs fragments oligonucléiques (*spotted microarrays*) et les puces à oligonucléotides synthétisés in situ par photolithographie (*GeneChips* de la société Affymetrix) ou par impression « jet d'encre » (Agilent Technologies/Rosetta Inpharmaceutics). Ces dernières ne peuvent être produites que par des sociétés industrielles. Les sondes peuvent être des produits de PCR ou de fragments oligonucléiques et les cibles de l'ADN complémentaire, de l'ADN génomique, des produits de PCR, ARN total, de l'ARN amplifié, de l'ADN plasmidique, ou encore une suspension bactérienne ou un échantillon clinique [41]. Lorsque la PCR est utilisée pour détecter l'ADN dans les échantillons cliniques, les *microarrays* peuvent alors être employées pour identifier les produits amplifiés en les hybridant sur une puce constituée de sondes spécifiques de pathogènes donnés. L'utilisation d'amorces universelles telles que celles amplifiant le gène, l'ADN 16 S ou 23 S ribosomal, permet la détection de nombreux pathogènes simultanément grâce au *microarrays* en utilisant une seule PCR [42]. Les *DNA microarrays* peuvent également être utilisés pour l'identification des souches ou le génotypage, lorsqu'elles incorporent des gènes cibles spécifiques d'espèces, des profils de réactivité des souches de référence et des souches à comparer. Les applications des *DNA microarrays* sont nombreuses. Elles ont été utilisées pour effectuer la détection et le génotypage des *Listeria* [43] des rotavirus [44], de virus au sein de prélèvements tissulaires et respiratoires [45]. Un oligonucléotide *microarray* permettant une détection de tous les microorganismes (parasitaires, fongiques, bactériennes, viraux) a également été développé pour le diagnostic en maladies infectieuses [46].

Le diagnostic par multiplexé PCR

La PCR multiplexée est une variante de la PCR dans laquelle une ou plusieurs séquences cibles peuvent être amplifiées en

incluant une ou plusieurs paires d'amorces dans la même réaction [47]. Les paramètres clés influençant la PCR multiplexée sont décrits ci-dessous. Pour obtenir une amplification hautement spécifique des produits de la PCR multiplexée : la concentration relative des amorces et du tampon, la balance entre le chlorure de magnésium, la concentration en désoxynucléotide, les cycles de températures, la quantité d'ADN matrice et la Taq DNA polymérase sont essentiels. Mais les paramètres les plus importants sont la température d'élongation qui doit être optimale, la concentration en tampon et la proportionnalité entre la concentration de chlorure de magnésium et la quantité de dNTP. Le problème le plus communément rencontré en multiplex PCR est l'amplification de produits non spécifiques due à la présence de plusieurs paires d'amorces, ou au manque de spécificité de ceux-ci. Le choix des amorces est également une étape importante. La PCR en temps réel est une technologie basée sur la détection d'oligonucléotides marqués avec un fluorophore. Un des aspects les plus intéressants de cette technique est la possibilité de détecter plusieurs cibles dans la même réaction de PCR [48]. Le développement de PCR multiplex en temps réel a été limité à cause du nombre de fluorophores disponibles et à cause de la superposition de leur émission spectrale. Plusieurs approches de PCR quantitative sont utilisées selon des mécanismes conduisant à l'augmentation de la fluorescence au cours de l'amplification. En effet, l'émission de fluorescence peut se faire par un agent intercalant (e.g., SybrGreen® I) inséré dans de l'ADN double brin. La libération de fluorescence peut également reposer sur l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase s'exerçant sur une sonde (e.g., TaqMan®) dont la dégradation, au cours de l'élongation d'un fragment PCR, permet de lever l'action inhibitrice d'un *quencher* sur un fluorophore ; l'hybridation d'une sonde (e.g., Molecular Beacon®, QuantiProbe™) lors de son hybridation sur sa séquence cible conduit à la levée, par éloignement, de l'action inhibitrice d'un *quencher* sur un fluorophore. Lors de l'étape d'élongation, la sonde est décrochée, mais non dégradée. La libération de la fluorescence peut se faire par transfert d'énergie de résonance (FRET) lors de l'hybridation de deux sondes (e.g., LightCycler® *hybridization probes*) sur leur séquence cible conduisant à un rapprochement des fluorophores. Lors de l'étape d'élongation, les sondes sont décrochées, mais non dégradées. La PCR multiplexée en temps réel a l'avantage d'économiser du temps ce qui offre la possibilité de réorganiser le travail dans les laboratoires. Depuis son développement, la PCR multiplexée a été utilisée dans de nombreux domaines d'analyse des acides nucléiques, incluant l'analyse des délétions de gènes, les mutations et les analyses du polymorphisme, les analyses quantitatives, la détection d'ARN. Récemment, Roche Diagnostics a développé une plateforme de PCR en temps réel qui utilise une lampe au xénon et cinq filtres de bandes passantes pour l'excitation des fluorophores à cinq longueurs d'ondes fixes combinée à six filtres de bandes passantes pour la détection de l'émission des fluorophores à six longueurs d'ondes fixes différentes. Cette nouvelle plateforme est particulièrement adaptée à la PCR multiplex en temps réel [49]. L'application de ces PCR multiplexés dans la littérature sont nombreuses en maladies infectieuses adaptées au diagnostic spécifique d'organe ou de syndrome (Tableau 3).

Tableau 3 PCR multiplexée testée dans la littérature.
Multiplex polymerase chain reaction as tested in the literature.

Agents infectieux	Pathogènes	Manifestation clinique	Références
Virus	Virus influenza A et B ; virus influenza A sous types H1, H3, et H5 (H5N1 souche asiatique) ; virus parainfluenza types 1, 2, 3, et 4 ; virus respiratoire syncytial types A et B ; adénovirus ; méta-pneumovirus ; rhinovirus ; entérovirus ; coronavirus OC43, 229E, coronavirus NL63 et HKU1	Infections respiratoires hautes et basses	[75–77,58,78,46,79,80]
	Entérovirus et herpès virus	Système nerveux central	[64] [81]
	<i>Herpes simplex virus</i> type 1 et 2, varicella-zoster virus, et entérovirus	Sang	[63] [82] [83–85]
	Cytomégalovirus, <i>herpes simplex virus</i> type 1 et 2, Epstein-Barr virus, varicella-zoster virus et HHV 6 <i>Epstein-Barr virus</i> et <i>Toxoplasma gondii</i> VIH 1 et 2, HTLV 1 et 2, virus de l'hépatite C et B		
Bactéries	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , <i>Legionella pneumophila</i> , <i>Legionella micdadei</i> , <i>Bordetella pertussis</i>	Infections respiratoires hautes et basses	[14,86,59,87]
	<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> et <i>Haemophilus influenzae</i> type b		[88]
	<i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i>		[89],
	<i>Ureaplasma urealyticum</i> <i>Ureaplasma</i> , spp. <i>Mycoplasma genitalium</i> , et <i>Mycoplasma hominis</i>		[90]
Parasites	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i> , et <i>cryptosporidium parvum</i>	Diarrhée	[15]
Détection mixte	Influenza virus A et B, parainfluenza 1-3, métapneumovirus, virus respiratoire syncytial, rhinovirus, entérovirus, adénovirus, coronavirus (229E, OC43, NL63), <i>M. pneumoniae</i> et <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	Infections respiratoires hautes et basses	[91]

Identification des produits de PCR par spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse a largement été utilisée pour la caractérisation phénotypique de bactéries entières [50], de simple lysat cellulaire ou de produit bactérien tels que le lipopolysaccharide et les protéines [51]. Elle peut être utilisée pour analyser les ADN et les ARN bactériens. Elle a été employée pour la différenciation rapide des produits de PCR pour les bactéries méthanotrophes en fonction de leur taille [52]. L'identification moléculaire des bactéries peut être basée sur le séquençage du gène de l'ADN 16S ribosomal, qui est une technique longue et qui nécessite l'obtention d'une culture pure. L'analyse par spectrométrie de masse basée sur un modèle de clivage spécifique de produit de PCR amplifié a été récemment utilisée pour l'identification rapide d'isolats bactériens dans un environnement complexe [53]. Cette technique a été appliquée pour déterminer les espèces de *Mycobacteria* [54] et de *Bordetella* [53]. La *multilocus sequence typing* (MLST) est basée sur la caractérisation des variations de séquence de plusieurs loci qui s'accumulent lentement dans la population bactérienne. La MLST requiert la différenciation entre les séquences de référence et celle du microorganisme étudié. La spectrométrie de masse a également été employée pour effectuer une analyse comparative des séquences pour identifier 100

souches de *Neisseria meningitidis* [55]. La spectrométrie de masse a été utilisée pour le génotypage de virus, par exemple le virus de l'hépatite B [56] à partir d'échantillons sanguins de patients infectés.

Sélection d'exemples de diagnostic par syndrome

Les infections respiratoires

Les virus sont les causes les plus fréquentes d'infections respiratoires, les tests de PCR multiplexée en temps réel utilisés dans le cadre du diagnostic étiologique de telles infections offrent la perspective d'augmenter le rendement diagnostic et la possibilité de diminuer le coût des utilisations non adaptées d'antibiotiques [57]. Un test multiplexé : *MultiCode-PLx respiratory virus panel* (PLx-RVP) a été développé pour tester simultanément 17 virus communément responsables d'infections respiratoires. Un total de 687 échantillons respiratoires ont été testés conjointement avec cette PCR multiplexée et avec les méthodes standard de diagnostic (*reverse transcription* PCR en temps réel pour influenza virus A et B et culture virale). Le PLx-RVP a montré une sensibilité et une spécificité respectivement de l'ordre de 99 et de 87 %. Cette technique a permis d'identifier 40 infections virales non diagnostiquées au départ dont

11 étaient des infections mixtes [58]. La PCR en temps réel a également été développée pour détecter les agents tels que *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* [59], responsables de pneumopathies atypiques. Soixante-sept prélèvements respiratoires ont été testés en parallèle avec la PCR multiplexée en temps réel et les PCR conventionnelles. Le taux d'agrément global était de 98,3 %, correspondant à 95,8 % pour *C. pneumoniae*, 100 % pour *L. pneumophila* et 100 % pour *M. pneumoniae*. L'application en pathologie clinique de cette PCR multiplexée en temps réel a montré des résultats comparables aux techniques conventionnelles [59]. Un test commercial, Chlamylege (Argene Inc.) détectant simultanément dans des échantillons respiratoires *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, et de nombreuses *Legionella* sp. a été mis au point [14]. Ce kit a permis de tester 158 prélèvements cliniques provenant de patients ayant une infection respiratoire documentée. Tous les échantillons positifs ont été correctement détectés et identifiés par le kit Chlamylege, aucun faux positif n'a été détecté parmi les échantillons négatifs. Le kit a été évalué prospectivement dans des échantillons pédiatriques. L'étude incluait 220 aspirations endotrachéales et les résultats ont été comparés à ceux obtenus avec les trois PCR maisons utilisées en routine. Le kit a détecté deux nouveaux échantillons positifs, l'un à *M. pneumoniae* et l'autre à *Legionella* sp. autre que *L. pneumophila*. Dans le cadre des pathologies respiratoires infectieuses, un test commercial combinant la PCR en temps réel et les tests multiplexés pourrait permettre leur implantation dans des *point of care*

[60]. De par leur sensibilité, leur rapidité et leur spécificité, les tests de PCR multiplexée sont complémentaires des techniques sérologiques. InoDiag[®] (Signes, France) a développé une nouvelle technique multiplexée d'immunofluorescence indirecte, automatisée pour la détection simultanée de *M. pneumoniae*, *Chlamydia* sp., *Legionella* sp., *Francisella tularensis*, et *Coxiella burnetii* [61] dans le cadre du diagnostic des pneumopathies atypiques.

Endocardites

Une stratégie de diagnostic exhaustive et systématique par syndrome, dans le cadre des endocardites infectieuses a été effectuée prospectivement sur une période de neuf ans sur un échantillon de 1998 patients avec une suspicion d'endocardites infectieuses [6]. Une endocardite certaine a été diagnostiquée chez 427 (21,4 %) patients et 261 (13 %) patients présentaient une endocardite possible (Fig. 1). Le diagnostic étiologique a été établi chez 397 (93 %) patients grâce aux hémocultures (81,5 %), aux tests sérologiques (8 %) et l'analyse des valves cardiaques (3,5 %). Deux patients présentaient une infection mixte à streptocoque et *C. burnetii*. InoDiag[®] (Signes, France) a développé une nouvelle technique multiplexée d'immunofluorescence indirecte, automatisée pour la détection simultanée d'agent responsable d'endocardites à hémocultures négatives due aux bactéries suivantes : *C. burnetii* phase I et II et *Bartonella* spp (Fig. 2). Le diagnostic de telles infections repose

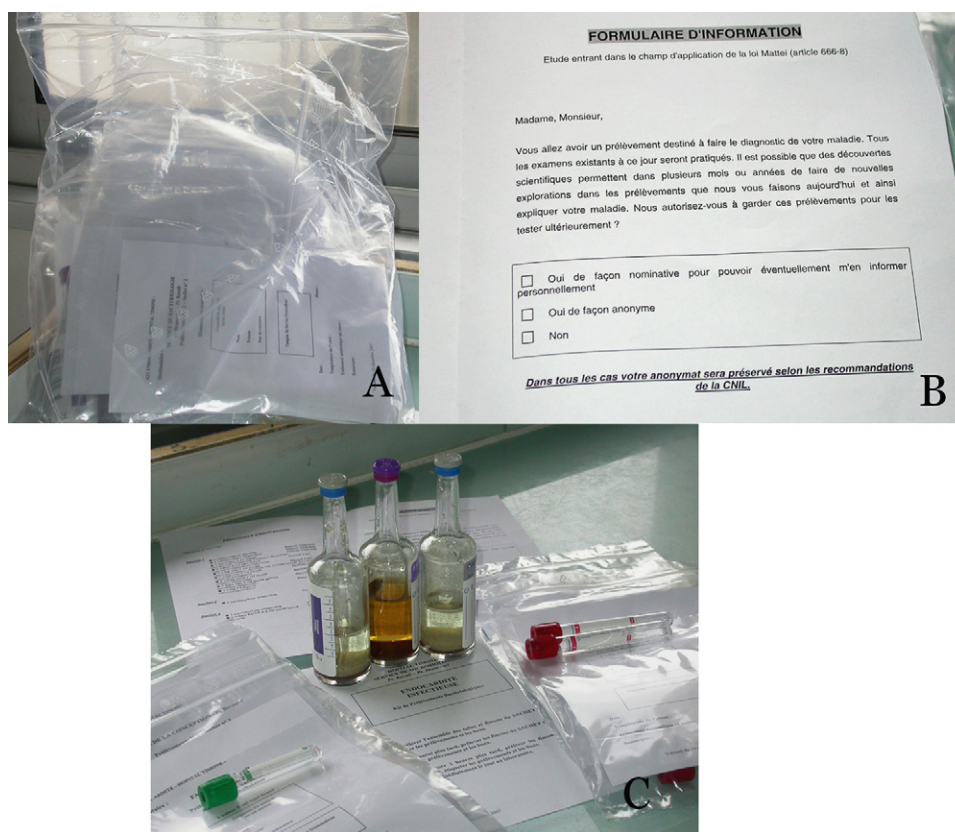


Figure 1 Kit endocardite. A. : kit endocardite ; B. : consentement éclairé remis au patient ; C. : examens réalisés.
Endocarditis kit. A.: endocarditis kit; B.: informed consent of patient; C.: realized examinations.

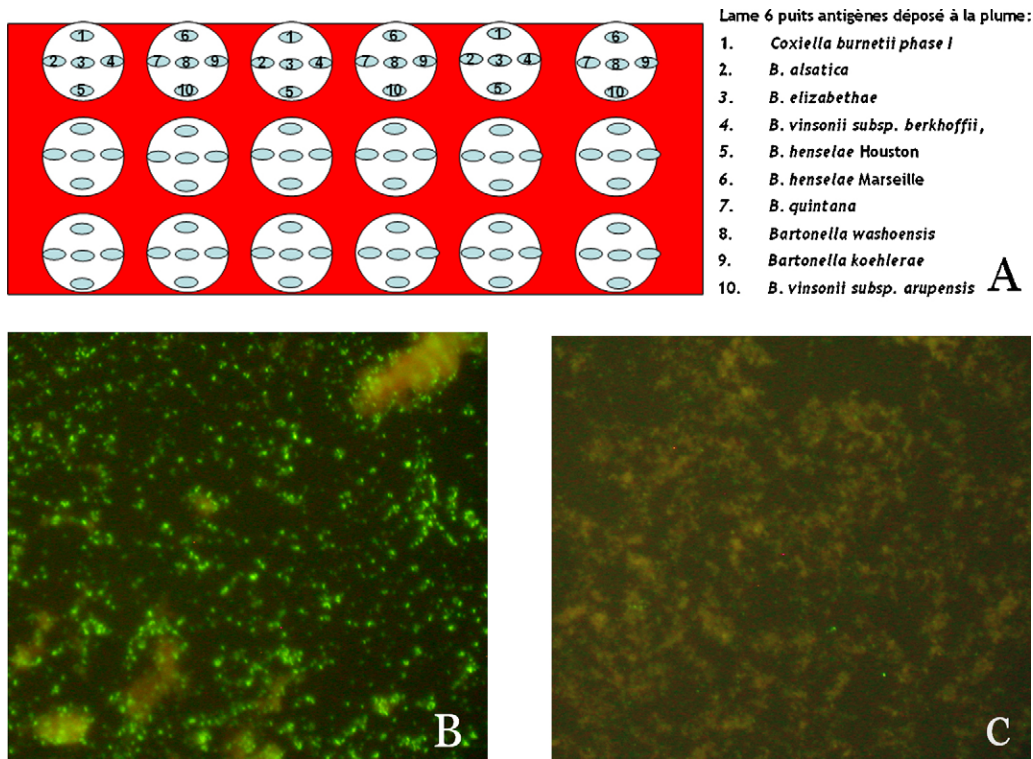


Figure 2 Lame utilisée pour le protocole endocardite. A. : Lamella ; B. : *Coxiella burnetii phase I*. Patient ayant une endocardite. Dilution 1/1600 (1.) ; C. : *B. henselae* Houston. Sérologie négative (5.).

Lamella used for the protocol endocarditis. A.: Lamella; B.: *Coxiella burnetii phase I*. Patient having an endocarditis Dilution 1/1600 (1.); C.: *B. henselae* Houston. Negative serology (5.).

sur la sérologie. L'immunofluorescence indirecte est la méthode de référence [62].

Méningites et méningoencéphalites

L'utilisation de la PCR pour le diagnostic des méningites et des méningoencéphalites est l'outil diagnostique le plus rapide et le plus performant. Les pathogènes les fréquemment rencontrés sont : *herpes simplex virus type 1* (HSV-1) et type 2 (HSV-2), *varicella-zoster virus* (VZV), cytomégalovirus (CMV), *Epstein-Barr virus* (EBV) entérovirus. Le volume du liquide céphalorachidien (LCR) étant souvent limité, de nombreuses PCR multiplexées ont été développées. Par exemple, une PCR multiplexée testant : HSV-1, HSV-2, VZV, et les entérovirus a été mise au point et utilisée pour analyser une série de 1683 échantillons de LCR sur une période de neuf mois. De l'ARN viral a été détecté dans 138 (8,2 %) LCR dont 51 échantillons avec de l'entérovirus, 33 échantillons avec de l'HSV-2, 28 échantillons avec du VZV et 25 échantillons avec de l'HSV-1 [63]. Une RT-PCR multiplexée a été mise au point pour identifier les agents étiologiques viraux dans des LCR de 200 patients hospitalisés avec une suspicion d'infections neurologiques virales [64]. La PCR a permis de détecter de l'ARN viral dans 55 (35 %) des 156 LCR prélevés chez des patients immunocompétents qui présentaient une méningite aseptique ou une encéphalite et dans 44 LCR de patients immunodéprimés 18 (41 %). Des infections mixtes à CMV, HSV, CMV et EBV ont été diagnostiquées chez

deux patients au stade sida avec une encéphalite et polyradiculonévrite. De nombreuses PCR multiplexées ont été développées permettant la détection simultanée rapide des agents viraux dans les LCR [13,64,65]. De plus, l'utilisation d'une antibiothérapie précoce dans le cadre des méningites a réduit le nombre de cas de méningite bactérienne confirmé par la coloration de Gram et la culture. Une PCR multiplexée a été développée pour détecter et identifier *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae* dans les échantillons sanguins et de LCR obtenu chez des patients atteints de syndromes méningés avec purpura [66]. Soixante-dix LCR et trois échantillons sanguins (96 %) étaient positifs pour *N. meningitidis*. D'autres tests multiplexés ont été développés pour le diagnostic bactérien des méningites avec des résultats prometteurs [67].

Ganglions

Nous avons évalué notre stratégie de diagnostic exhaustive concernant les adénopathies. Un total de 786 ganglions provenant de patients suspects de maladie des griffes du chat ont été analysés en culture cellulaire, en biologie moléculaire (ADN 16S ribosomal, mycobactéries et *Bartonella*) et en anatomopathologie. Des agents infectieux ont été détectés dans 391 (49,7 %) échantillons. *Bartonella henselae*, l'agent de la maladie des griffes du chat a été identifié chez 245 patients (31,2 %). Une myco-

bactériose a été diagnostiquée chez 54 patients (6,9 %) en culture, ce résultat a été confirmé rétrospectivement par PCR. Un cancer a été détecté chez 47 patients. De plus, 13 patients avec une maladie des griffes du chat présentaient une co-infection à mycobactérie (dix cas) ou une néoplasie (trois cas) [29]. De plus, dans 50 % des cas des sérums adressés au laboratoire pour suspicion de maladies des griffes du chat ou bilan d'adénopathie, notre stratégie de diagnostic exhaustive nous a permis d'identifier des cas de tularémie (données non publiées). Au cours de l'année 2007, nous avons déclaré 13 cas de tularémie sur les 20 déclarés en France.

Les pathogènes émergents

Au cours du bioterrorisme, le développement de *microarrays* a été adapté à la détection des agents infectieux impliqués dans ces pathologies [68,69]. Biagini et al. ont développé un test multiplexé permettant la détection simultanée de *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, toxine de ricin, et l'entérotoxine B du staphylococcique. En situation de crise, ces tests faciliteront la mise en place de mesures préventives au cours de la phase d'incubation de la maladie. Le diagnostic des infections respiratoires virales à SARS est non spécifique, le développement de tests diagnostique multiplexé [70] a montré d'excellentes performances pour la détection d'un panel de virus responsables d'infections respiratoires sévères dans les échantillons biologiques.

Conclusion

Le développement du diagnostic différentiel en maladies infectieuses augmente du fait de l'émergence des pathogènes viraux et bactériens. Les syndromes cliniques sont rarement spécifiques d'un agent pathogène d'où la difficulté d'effectuer le diagnostic étiologique d'un syndrome donné. La stratégie de diagnostic par syndrome bénéficie actuellement de l'apport des technologies des tests multiplexés. Une puce oligonucléotique panmicrobienne a été développée [46] pour la détection de virus, bactéries, parasites et champignons. Cette stratégie permet d'obtenir un diagnostic étiologique plus rapide améliorant ainsi la prise en charge du patient. Ces tests sont versatiles offrant la possibilité de détection de nouveaux pathogènes émergents dans différentes situations épidémiques telles que les infections dues au virus Chikungunya et SARS. L'introduction des techniques multiplexées dans les laboratoires de microbiologie offre ainsi la possibilité de réorganisation du travail. La plupart de ces tests sont automatisés et ouvrent la voie d'une standardisation, améliorant la reproductibilité intralaboratoire et interlaboratoire. Le nombre d'applications en matière de recherche augmente, notamment en ce qui concerne le développement de vaccins [71,72]. La technologie multiplexée de même que la stratégie de diagnostic exhaustif offrent des avantages considérables, améliorant les pratiques dans les laboratoires. Le diagnostic étiologique en fonction du syndrome devient moins coûteux et plus rapide. Dans le futur, la technologie de *microarray* pourrait être utilisée en routine pour le diagnostic des maladies infectieuses, par exemple dans les *point of care* [60] ou dans le cadre d'une stratégie de diagnostic exhaustif étiologique.

Conflit d'intérêt

Monsieur Raoult est un co-fondateur de la société InoDiag.

Références

- [1] Procop GW. Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl. 2):S99–111.
- [2] Rolain JM, Gouriet F, Enea M, Aboud M, Raoult D. Detection by immunofluorescence assay of *Bartonella henselae* in lymph nodes from patients with cat scratch disease. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:686–91.
- [3] Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola SB, Auffray JP, Raoult D. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerg Infect Dis* 2006;12:248–55.
- [4] Brouqui P, Rolain JM, Foucault C, Raoult D. Q fever and *Plasmodium falciparum* malaria co-infection in patient returning from a patient returning from the Comores archipelago. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:1028–30.
- [5] Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol* 2006;44:1018–28.
- [6] Raoult D, Casalta JP, Richet H, Khan M, Bernit E, Rovey C, et al. Contribution of systematic serological testing in diagnosis of infective endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005;43:5238–42.
- [7] Levy PY, Corey R, Berger P, Habib G, Bonnet JL, Levy S, et al. Etiologic diagnosis of 204 pericardial effusions. *Medicine (Baltimore)* 2003;82:385–91.
- [8] Levy PY, Khan M, Raoult D. Acute pericarditis. *N Engl J Med* 2005;352:1154–5.
- [9] Drancourt M, Berger P, Terrada C, Bodaghi B, Conrath J, Raoult D. High prevalence of fastidious bacteria in 1,520 cases of uveitis of unknown etiologies. *Medicine (Baltimore)* 2008; 87(3):167–76.
- [10] Raoult D, Foucault C, Brouqui P. Infections in the homeless. *Lancet Infect Dis* 2001;1:77–84.
- [11] Owen WE, Martins TB, Litwin CM, Roberts WL. Performance characteristics of six IMMULITE 2000 TORCH assays. *Am J Clin Pathol* 2006;126:900–5.
- [12] Biagini RE, Sammons DL, Smith JP, MacKenzie BA, Striley CA, Robertson SA, et al. Simultaneous measurement of specific serum IgG responses to five select agents. *Anal Bioanal Chem* 2005;382:1027–34.
- [13] Elnifro EM, Ashshi AM, Cooper RJ, Klapper PE. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559–70.
- [14] Ginevra C, Barranger C, Ros A, Mory O, Stephan JL, Freymuth F, et al. Development and evaluation of Chlamydiae, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:3247–54.
- [15] Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brien EA, van Rooyen MA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:1220–3.
- [16] Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2007;45:3270–6.
- [17] Harris JK, De Groote MA, Sagel SD, Zemanick ET, Kapsner R, Penvari C, et al. Molecular identification of bacteria in bronchoalveolar lavage fluid from children with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:20529–33.

- [18] Mezzasoma L, Bacarese-Hamilton T, Di CM, Rossi R, Bistoni F, Crisanti A. Antigen *microarrays* for serodiagnosis of infectious diseases. *Clin Chem* 2002;48:121–30.
- [19] Raoult D, Fournier PE, Drancourt M. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat Rev Microbiol* 2004;2:151–9.
- [20] Fenollar F, Raoult D. Diagnosis of rickettsial diseases using samples dried on blotting paper. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:483–8.
- [21] Haab BB. Advances in protein microarray technology for protein expression and interaction profiling. *Curr Opin Drug Discov Dev* 2001;4:116–23.
- [22] Dupont HT, Thirion X, Raoult D. Q fever serology: cutoff determination for microimmunofluorescence. *Clin Diagn Lab Immunol* 1994;1:189–96.
- [23] Fournier PE, Bernabeu L, Schubert B, Mutillod M, Roux V, Raoult D. Isolation of *Francisella tularensis* by centrifugation of shell vial cell culture from an inoculation eschar. *J Clin Microbiol* 1998;36:2782–3.
- [24] La SB, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715–27.
- [25] La SB, Raoult D. Culture of *Bartonella quintana* and *Bartonella henselae* from human samples: a 5-year experience (1993 to 1998). *J Clin Microbiol* 1999;37:1899–905.
- [26] Rolain JM, Gouriet F, Brouqui P, Larrey D, Janbon F, Vene S, et al. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. *Clin Infect Dis* 2005;40:82–8.
- [27] Levy PY, Carrieri P, Raoult D. *Coxiella burnetii* pericarditis: report of 15 cases and review. *Clin Infect Dis* 1999;29:393–7.
- [28] Foucault C, Lepidi H, Poujet-Abadie JF, Granel B, Roblot F, Ariga T, et al. Q fever and lymphadenopathy: report of four new cases and review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:759–64.
- [29] Rolain JM, Lepidi H, Zanaret M, Triglia JM, Michel G, Thomas PA, et al. Lymph node biopsy specimens and diagnosis of cat-scratch disease. *Emerg Infect Dis* 2006;12:1338–44.
- [30] Ekins R, Chu F, Biggart E. Multispot, multianalyte, immunoassay. *Ann Biol Clin (Paris)* 1990;48:655–66.
- [31] MacBeath G, Schreiber SL. Printing proteins as *microarrays* for high-throughput function determination. *Science* 2000;289:1760–3.
- [32] Zhu H, Snyder M. Protein arrays and *microarrays*. *Curr Opin Chem Biol* 2001;5:40–5.
- [33] Kowalczywska M, Raoult D. Advances in *Tropheryma whipplei* research: the rush to find biomarkers for Whipple's disease. *Future Microbiol* 2007;2:631–42.
- [34] Cretich M, Damin F, Pirri G, Chiari M. Protein and peptide arrays: recent trends and new directions. *Biomol Eng* 2006;23:77–88.
- [35] Cai HY, Lu L, Muckle CA, Prescott JF, Chen S. Development of a novel protein microarray method for serotyping *Salmonella enterica* strains. *J Clin Microbiol* 2005;43:3427–30.
- [36] Bonhomme CJ, Nappez C, Raoult D. Microarray for serotyping of *Bartonella* species. *BMC Microbiol* 2007;7:59.
- [37] Jani IV, Janossy G, Brown DW, et al. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *Lancet Infect Dis* 2002;2:243–50.
- [38] Fulton RJ, McDade RL, Smith PL, Mandy F. Advanced multiplexed analysis with the FlowMetrix system. *Clin Chem* 1997;43:1749–56.
- [39] Smith PL, WalkerPeach CR, Fulton RJ, DuBois DB. A rapid, sensitive, multiplexed assay for detection of viral nucleic acids using the FlowMetrix system. *Clin Chem* 1998;44:2054–6.
- [40] Bodrossy L, Sessitsch A. Oligonucleotide *microarrays* in microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:245–54.
- [41] Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK, Park TS. Detection and typing of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol* 2003;90:51–6.
- [42] Mitterer G, Huber M, Leidinger E, Kirisits C, Lubitz W, Mueller MW, et al. Microarray-based identification of bacteria in clinical samples by solid-phase PCR amplification of 23S ribosomal DNA sequences. *J Clin Microbiol* 2004;42:1048–57.
- [43] Volokhov D, Rasooly A, Chumakov K, Chizhikov V. Identification of *Listeria* species by microarray-based assay. *J Clin Microbiol* 2002;40:4720–8.
- [44] Chizhikov V, Wagner M, Ivshina A, Hoshino Y, Kapikian AZ, Chumakov K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40:2398–407.
- [45] Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, Avila PC, Boushey HA, Ganem D, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15687–92.
- [46] Palacios G, Quan PL, Jabado OJ, Conlan S, Hirschberg DL, Liu YZhai J, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* 2007;13:73–81.
- [47] Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002;16:47–51.
- [48] Mackay IM. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190–212.
- [49] Molenkamp R, Van der Ham A, Schinkel J, Beld M. Simultaneously detection of five different DNA targets by real-time Taqman PCR using the Roche Light Cycler480. Application in viral molecular diagnosis. *J Virol Methods* 2007;141:205–11.
- [50] Keys CJ, Dare DJ, Sutton H, Wells G, Lunt M, McKenna T, et al. Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect Genet Evol* 2004;4:221–42.
- [51] Gershon D. Mass spectrometry goes mainstream. *Nature* 2003;424:581.
- [52] Hurst GB, Weaver K, Doktycz MJ, Buchanan MV, Costello AM, Lidstrom ME. MALDI-TOF analysis of polymerase chain reaction products from methanotrophic bacteria. *Anal Chem* 1998;70:2693–8.
- [53] Von WF, Bocker S, Schlotelburg C, Chiu NH, Storm N, Jurinke C, et al. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:7039–44.
- [54] Lefmann M, Honisch C, Bocker S, Storm N, von WF, Schlotelburg C, et al. Novel mass spectrometry-based tool for genotypic identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2004;42:339–46.
- [55] Honisch C, Chen Y, Mortimer C, Arnold C, Schmidt O, van Den BD, et al. Automated comparative sequence analysis by base-specific cleavage and mass spectrometry for nucleic acid-based microbial typing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:10649–54.
- [56] Lau CC, Yue PY, Chui SH, Chui AK, Yam WC, Wong RN. Detection of single nucleotide polymorphisms in hepatitis B virus precore/basal core promoter region by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Biochem* 2007;366:93–5.
- [57] Oosterheert JJ, van Loon AM, Schuurman R, Hoepelman AI, Hak E, Thijsen S, et al. Impact of rapid detection of viral and atypical bacterial pathogens by real-time polymerase chain reaction for patients with lower respiratory tract infection. *Clin Infect Dis* 2005;41:1438–44.
- [58] Marshall DJ, Reisdorf E, Harms G, Beaty E, Moser MJ, Lee WM, et al. Evaluation of a multiplexed PCR assay for detection of respiratory viral pathogens in a public health laboratory setting. *J Clin Microbiol* 2007;45:3875–82.
- [59] Welti M, Jatou K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J, et al. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:85–95.

- [60] Letant SE, Ortiz JI, Bentley Tammero LF, Birch JM, Derlet RW, Cohen S, et al. Multiplexed reverse transcriptase PCR assay for identification of viral respiratory pathogens at the point of care. *J Clin Microbiol* 2007;45:3498–505.
- [61] Gouriet F, Drancourt M, Raoult D. Multiplexed serology in atypical bacterial pneumonia. *Ann NY Acad Sci* 2006;1078:530–40.
- [62] Samson L, Drancourt M, Casalta JP, Raoult D. Corpuscular antigenic microarray for the serodiagnosis of blood culture-negative endocarditis. *Ann NY Acad Sci* 2006;1078:595–6.
- [63] Bergallo M, Costa C, Margio S, Sidoti F, Terlizzi ME, Cavallo R. Development of a multiplex polymerase chain reaction for detection and typing of major human herpesviruses in cerebrospinal fluid. *Can J Microbiol* 2007;53:1117–22.
- [64] Casas I, Pozo F, Trallero G, Echevarria JM, Tenorio A. Viral diagnosis of neurological infection by RT multiplex PCR: a search for entero- and herpes viruses in a prospective study. *J Med Virol* 1999;57:145–51.
- [65] Tafreshi NK, Sadeghizadeh M, mini-Bavil-Olyae S, Ahadi AM, Jahanzad I, Roostaee MH. Development of a multiplex nested consensus PCR for detection and identification of major human herpes viruses in CNS infections. *J Clin Virol* 2005;32:318–24.
- [66] Pedro LG, Boente RF, Madureira DJ, Matos JA, Rebelo CM, Igreja RP, et al. Diagnosis of meningococcal meningitis in Brazil by use of PCR. *Scand J Infect Dis* 2007;39:28–32.
- [67] Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001;39:1553–8.
- [68] Tomioka K, Peredelchuk M, Zhu X, Arena R, Volokhov D, Selva-pandyan A, et al. A multiplex polymerase chain reaction microarray assay to detect bioterror pathogens in blood. *J Mol Diagn* 2005;7:486–94.
- [69] Skottman T, Piiparinen H, Hyytiainen H, Mylly V, Skurnik M, Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007;26:207–11.
- [70] Li H, McCormac MA, Estes RW, Sefers SE, Dare RK, Chappell JD, et al. Simultaneous detection and high-throughput identification of a panel of RNA viruses causing respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2007;45:2105–9.
- [71] Serruto D, du-Bobie J, Capecchi B, Rappuoli R, Pizza M, Masi-gnani V. Biotechnology and vaccines: application of functional genomics to *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. *J Biotechnol* 2004;113:15–32.
- [72] Li B, Jiang L, Song Q, Yang J, Chen Z, Guo Z. Protein microarray for profiling antibody responses to *Yersinia pestis* live vaccine. *Infect Immun* 2005;73:3734–9.
- [73] Levy PY, Fournier PE, Charrel R, Metras D, Habib G, Raoult D. Molecular analysis of pericardial fluid: a 7-year experience. *Eur Heart J* 2006;27:1942–6.
- [74] Rovey C, Greub G, Lepidi H, Casalta JP, Habib G, Collart F, et al. PCR detection of bacteria on cardiac valves of patients with treated bacterial endocarditis. *J Clin Microbiol* 2005;43:163–7.
- [75] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petit-jean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005;126:53–63.
- [76] Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Sinha T, Lisle. et al. Development of a respiratory virus panel test for detection of twenty human respiratory viruses by use of multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol* 2007;45:2965–70.
- [77] Nolte FS, Marshall DJ, Rasberry C, Schievelbein S, Banks GG, Storch GA, et al. MultiCode-PLx system for multiplexed detection of seventeen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:2779–86.
- [78] Lee WM, Grindle K, Pappas T, Marshall DJ, Moser MJ, Beaty EL, et al. High-throughput, sensitive, and accurate multiplex PCR-microsphere flow cytometry system for large-scale comprehensive detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:2626–34.
- [79] Lam WY, Yeung AC, Tang JW, Ip M, Chan EW, Hui M, et al. Rapid multiplex nested PCR for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2007;45:3631–40.
- [80] Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006;78:1498–504.
- [81] Read SJ, Kurtz JB. Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay. *J Clin Microbiol* 1999;37:1352–5.
- [82] Roberts TC, Storch GA. Multiplex PCR for diagnosis of AIDS-related central nervous system lymphoma and toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 1997;35:268–9.
- [83] Heredia A, Soriano V, Weiss SH, Bravo R, Vallejo A, Denny TN, et al. Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of HIV-1, HIV-2, HTLV-I and HTLV-II. *Clin Diagn Virol* 1996;7:85–92.
- [84] Cleland A, Davis C, Adams N, Lycett C, Jarvis LM, Holmes H, et al. Development of multiplexed nucleic acid testing for human immunodeficiency virus type 1 and hepatitis C virus. *Vox Sang* 2001;81:93–101.
- [85] Caudai C, Padula MG, Bettini V, Valensin PE. Detection of HCV and GBV-C/HGV infection by multiplex PCR in plasma samples of transfused subjects. *J Virol Methods* 1998;70:79–83.
- [86] Khanna M, Fan J, Pehler-Harrington K, Waters C, Douglass P, Stallock J, et al. The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Legionella micdadei*, and *Bordetella pertussis*, and its real-time counterpart. *J Clin Microbiol* 2005;43:565–71.
- [87] Loens K, Beck T, Ursi D, Overdijk M, Sillekens P, Goossens H, et al. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2008;46:185–91.
- [88] Tzanakaki G, Tsopanomichalou M, Kesanopoulos K, Matzourani R, Sioumala M, Tabaki. et al. Simultaneous single-tube PCR assay for the detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:386–90.
- [89] Shi G, Wen SY, Chen SH, Matzourani R, Sioumala M. Tabaki. Fabrication and optimization of the multiplex PCR-based oligonucleotide microarray for detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. *J Microbiol Methods* 2005;62:245–56.
- [90] Stellrecht KA, Woron AM, Mishrik NG, Venezia RA. Comparison of multiplex PCR assay with culture for detection of genital mycoplasmas. *J Clin Microbiol* 2004;42:1528–33.
- [91] Brittain-Long R, Nord S, Olofsson S, Westin J, Anderson LM, Lindh M. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2008;41:53–6.