



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



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



REVUE GÉNÉRALE ET ANALYSE PROSPECTIVE

Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007 Les applications et leur avenir - Partie 2

Molecular biology in clinical microbiology in 2007 - Part 2

J. Lamoril^{c,*}, M. Bogard^b, N. Ameziane^a, J.-C. Deybach^c, P. Bouizegarène^c

^a Laboratoire de biologie polyvalente, centre hospitalier de Sens, 89100 Sens, France

^b Laboratoire de biochimie et biologie moléculaire, centre hospitalier de Meaux, 77100 Meaux, France

^c Laboratoire de biochimie et génétique moléculaire, hôpital Louis-Mourier, 178, rue des renouillers, 92700 Colombes, France

Reçu le 29 juin 2006 ; accepté le 24 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. Elles sont évidentes dans certains cas (l'hépatite C par exemple) et le sont moins dans d'autres, la tuberculose par exemple. Dans la première partie de l'article, nous avons parlé des généralités appliquées à la microbiologie. Dans cette deuxième partie, nous abordons certaines applications, reflets de l'importance prise par la biologie moléculaire en microbiologie.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Molecular biology;
Microbiology;
Genomic;
Amplification

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 specialized field in microbiology and brings some questions on its contribution. Is molecular

* Auteur correspondant.

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

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 the first part of this article, we reported general remarks in molecular biology related to microbiology. The second part report some important applications underlining the important extent of molecular biology in this field.

© 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. L'étude des agents infectieux à l'aide des outils de biologie moléculaire est ainsi devenue indispensable dans certaines indications. Les applications sont nombreuses et impossibles à toutes décrire. Nous allons donc aborder quelques exemples d'applications et nous envisagerons ce que pourrait être la place prochaine de la biologie moléculaire dans l'avenir.

Les indications

Tout agent infectieux peut être détecté en biologie moléculaire. La littérature abonde sur ce sujet démontrant ainsi ses énormes capacités. Néanmoins, en pratique courante que ce soit en milieu hospitalier (en dehors de la recherche) ou en pratique médicale de ville, les indications sont plus restreintes. Sans rentrer dans les détails de chacun des agents pathogènes les plus fréquemment recherchés par les outils de biologie moléculaire, nous aborderons les points se rapportant à la place de la biologie moléculaire pour certains d'entre eux.

Les infections virales

Généralités

Les virus sont le plus souvent détectés par des techniques développées au sein des laboratoires spécialisés en virologie. De ce fait, peu de virus ont fait l'objet de commercialisation de kits de détection [71]. Des kits ont cependant été développés dans des indications particulières (Tableau 1). Étant donné qu'il est impossible de détailler chacune d'entre elles, nous illustrerons notre propos de manière succincte par quelques exemples.

L'hépatite C (VHC)

Le virus de l'hépatite C est un virus à ARN appartenant à la famille des Flaviviridae. L'infection par le VHC est un problème majeur de santé publique (au moins 400 000 porteurs chroniques du virus en France) (Fig. 1). L'infection a donc essentiellement pour origine l'usage de substances (voie i.v. essentiellement), les expositions nosocomiales (endoscopie, sclérose de varice, hémodialyse, intervention chirurgicale),

la transmission foetomaternelle, piqûre accidentelle (professions de santé), exceptionnellement sexuelle. Les expositions post-transfusionnelles sont devenues rares en France depuis 1992. Dans 15 % des cas, aucune cause n'est retrouvée.

Détection et quantification du virus VHC. Les moyens diagnostiques classiques de virologie sont limités dans cette pathologie (sérologie, antigénémie). La sérologie (techniques Elisa et Riba) détecte les anticorps mais ne permet pas d'affirmer l'infection. Par ailleurs, ce groupe de technique peut donner des faux négatifs chez des individus immunodéprimés (par exemple, co-infection par le VIH, transplantés, hépatite C avec cryoglobulinémie). La recherche d'une antigénémie de capsid peut également être réalisée. La biologie moléculaire permet donc d'affirmer l'infection par le virus à la phase aiguë, l'infection chez les sujets immunodéprimés, de confirmer le passage à la chronicité et aide à évaluer la réponse thérapeutique (Tableau 1). Les tests qualitatifs disponibles dans le commerce sont très sensibles. De manière générale, ils présentent un seuil de détection de 5-10 UI/ml. La PCR qualitative (mise en évidence de l'ARN viral) établit le diagnostic, atteste le passage à la chronicité, évalue la réponse thérapeutique et permet d'affirmer la guérison. Une recherche qualitative par PCR peut cependant être faussement négative dans certains cas tels que dans le cas d'une sérologie faussement positive ou une virémie intermittente. Néanmoins, en cas de sérologie positive, dans la majorité des cas, une recherche qualitative d'ARN négative permet de s'assurer de la guérison. Quant à la virémie (évaluée par la charge virale, quantification de l'ARN du virus), elle constitue un examen prédictif de la réponse thérapeutique et permet aussi d'évaluer le risque d'évolution vers une fibrose hépatique [62]. Dans le suivi thérapeutique, il est recommandé d'effectuer une recherche qualitative à la fin du traitement antiviral et six mois après la fin du traitement pour vérifier la réponse antivirale prolongée, voire la guérison. La charge virale est effectuée après 12 semaines de traitement. En absence d'une diminution de $2\log_{10}$, on considère qu'il y a échec du traitement, ce dernier est arrêté. La virémie évaluée à 24 semaines, si elle est positive, induit l'arrêt du traitement (échec thérapeutique). De manière générale, sous traitement, la disparition de l'ARN viral affirme la réponse virale prolongée au traitement et le plus souvent la guérison.

De nombreux kits sont commercialisés. Selon les sociétés, différents systèmes de quantification sont utilisés (Tableau 1). La gamme de dosage varie selon les kits (Tableau 2). Progressivement, les techniques de PCR en temps réel remplacent les techniques de PCR « classiques » (RT-PCR et PCR compétitives) que ce soit pour un résultat qualitatif ou quantitatif [23].

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

(suite)

Tableau 1 (suite)

Agents pathogènes	Kit	Société
CMV	Recherche de l'ADN viral (amplification)	
	<ul style="list-style-type: none"> • NucliSens CMV pp67 (NASBA + Molecular Beacon) • Amplicor CMV (PCR) • CMV Hybrid capture 	BioMérieux Roche Digène
Papillomavirus (HPV)	Quantification de l'ADN viral	
	<ul style="list-style-type: none"> • (Cobas) Amplicor CMV monitor (PCR compétitive) • ReSSQ CMV Assay (PCR en temps réel - LightUp) • RealArt Artus (PCR en temps réel) • CMV Trender (PCR en temps réel) 	Roche LightUp Technologies Qiagen Affigene
Autres virus	Détection de l'ADN viral et génotypage	
	<ul style="list-style-type: none"> • HPV Hybrid Capture 2 	Digène
Autres virus	Détection de l'ARN viral du virus respiratoire syncytial (RSV)	
	<ul style="list-style-type: none"> • NucliSens EasyQ RVS A+B (NASBA + Molecular Beacon) 	BioMérieux
	Détection du virus West Nile	
	<ul style="list-style-type: none"> • Procleix West Nile virus (TMA) • RealArt Artus WNV (RT-PCR) • Certified Lux primer VWN (amorces pour PCR en temps réel) 	Chiron InVitrogen Qiagen
	Détection des ARN des Entérovirus	
	<ul style="list-style-type: none"> • NucliSens EasyQ Enterovirus (NASBA + Molecular Beacon) • RealArt Artus Enterovirus (RT-PCR en temps réel) 	BioMérieux Qiagen
	Détection des virus Influenza A/H5	
	<ul style="list-style-type: none"> • TaqMan A/H5 Influenza (PCR en temps réel - TaqMan) • RealArt Artus Influenza/H5 (PCR en temps réel) 	Applied Biosystems Qiagen
	Quantification des virus - Gamme LightCycler (PCR en temps reel)	
	Liste de virus (non exhaustif)	
	<ul style="list-style-type: none"> • Parvovirus B19 • Virus de l'hépatite A • Virus Epstein-Barr (EBV) • Herpès simplex 1 et 2 	Roche
	Quantification du virus EBV (PCR en temps reel - LightUp)	
<ul style="list-style-type: none"> • ReSSQ EBV Assay • RealArt Artus EBV • EBV Trender 	LightUp Technologies Qiagen Affigene	
Quantification du virus SARS Coronavirus (PCR en temps reel - LightUp)		
<ul style="list-style-type: none"> • ReSSQ SARS Assay • RealArt Artus SARS • Certified Lux primer SARS (amorces pour PCR en temps réel) 	LightUp Technologies Qiagen InVitrogen	
Gamme Realart Artus (PCR TaqMan en temps réel)		
<ul style="list-style-type: none"> • HHV-6 • Virus de l'hépatite A • Virus de l'hépatite B • Herpès simplex 1 et 2 (HSV1/2) • Influenza virus • Parvovirus 19 • Varicelle-zona (VZV) 	Qiagen	
Détection du virus de la grippe aviaire		
<ul style="list-style-type: none"> • Certified Lux primer Avian influenza A (amorces pour PCR en temps réel) 	InVitrogen	
Gamme Affigène (PCR en temps réel)		
<ul style="list-style-type: none"> • BKV Trender (sang total ou urines) • HSV 1 et 2 Tracer (LCR, vésicules) • VZV (varicelle zona) (LCR, vésicules) 	Affigene	

(suite)

Tableau 1 (suite)

Agents pathogènes	Kit	Société
Les Bactéries		
<i>Chlamydia Trachomatis</i> (CT)	Détection après amplification • (Cobas) AmpliCor CT/NG (PCR)	Roche
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (NG)	• (Cobas) TaqMan CT (PCR en temps réel)	Roche
	• AMPLIFIED (uniquement CT) (NASBA)	BioMérieux
	• APTIMA COMBO 2 (TMA et HPA) Peut aussi être isolée (CT ou NG)	Gen-Probe
	• BD ProbeTec CT/NG (SDA)	Becton-Dickinson
	• Hybrid Capture CT/GC	Digene
	• RealArt artus (PCR en temps réel)	Qiagen
	Détection directe sur échantillon	BioMérieux
	• PACE 2 (existe aussi uniquement pour CT ou NG) (HPA)	
	Détection sur culture	Gen-Probe
	• Accuprobe NG (HPA)	
Détection combinée ou isolée de CT et NG	Digene	
	• CT ID, GC ID, CT/GC Hybrid Capture 2	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MT)	Détection après amplification • Cobas AmpliCor M. Avium (PCR)	Roche
<i>Mycobacterium</i> sp	• Cobas AmpliCor M. intracellulare (PCR)	
	• AMPLIFIED (complexe MT) (TMA et HPA)	BioMérieux
	Détection après amplification	
	• Genotype Mycobacteria Direct (NASBA et reverse dot-blot) (M.avium, M.intracellulare, M.kansaii, M. malloense, M. tuberculosis complex)	Hain Lifescience
	• RealArt artus (M. tuberculosis complex)	Qiagen
	Détection directe sur prélèvement	
	• Genotype [®] MTB Direct v3.0 (reverse dot-blot) (M.avium, M.intracellulare, M.kansaii, M. malloense, M. tuberculosis complex)	Biocentric
	Détection sur culture	
	• AccuProbe (HPA) Nombreuses mycobactéries (M.avium, M.intracellulare, M.gordonae, M.Kansaii)	Gen-Probe
	• AccuProbe (complexe MT) (HPA)	
	• Inno-LiPA Mycobacteria (Reverse dot-blot) (M. tuberculosis complex, M. kansaii, M. xenopi, M. gordonae, M. genavense, M. simiae, M. marinum and M. ulcerans, M. celatum, MAIS, M. avium, M. intracellulare, M. scrofulaceum, M. malmoense, M. haemophilum, M. chelonae complex, M. fortuitum complex, and M. smegmatis)	Innogenetics
	• Genotype [®] Mycobacterium MTBC (Reverse dot-blot) Complex Mycobacterium tuberculosis	Biocentric
	• Genotype [®] Mycobacterium CM/AS (Reverse dot-blot) Identification de 26 mycobactéries (M. . avium ssp., M. chelonae, M. abscessus, M. fortuitum, M. gordonae, M. intracellulare, M. scrofulaceum, M. interjectum, M. kansaii, M. malmoense, M. peregrinum, M. marinum/M. ulcerans, Complexe M. tuberculosis, M. xenopi, M. simiae, M. mucogenicum, M. goodii, M. celatum, M. smegmatis, M. genavense, M. lentiflavum, M. heckeshornense, M.szulgai/M. intermedium, M. phlei, M. haemophilum, M. kansaii, M. ulcerans, M. gastri, M. asiaticum, M. shimoidei)	
	• Genotype [®] MTBDR (Reverse dot-blot) Détection des résistances de Mycobacterium tuberculosis à l'isonazide et à la rifampicine	

(suite)

Tableau 1 (suite)		
Agents pathogènes	Kit	Société
Autres bactéries	Identification générale de bactéries	
	Séquençage de régions bactériennes (cf. ARN 16S)	
	• Microseq	Celera
	• PyroMark	Biotage
	Détection sur culture	
	• AccuProbe (HPA) (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus</i> groupe A et B, <i>Enterococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>)	Gen-Probe
	• PNA FISH <i>Staphylococcus aureus</i> (FISH)	AdvanDx
	• PNA FISH <i>Enterococcus faecalis</i> (FISH)	
	• Gamme Genotype® EHEC : Détection et identification des <i>Escherichia coli</i> entérohémorragiques (EHEC)	Biocentric
	<i>Enterococcus</i> : Identification génétique des entérocoques et des résistances à la vancomycine	
	Blood Culture : Identification des bactéries Gram + et Gram - à partir d'hémocultures	
	<i>Staphylococci</i> : Identification des staphylocoques, du gène <i>mecA</i> , et du gène PVL	
	MicrolDent : détection et identification génétique des bactéries anaérobies parodontopathogènes	
	Détection sur échantillon clinique	
	• GASDirect (HPA) : <i>Streptococcus</i> groupe A	Gen-Probe
	• BD Affirm VPIII Microbial Identification Test : identification directe des germes impliqués dans les vaginites (<i>Candida</i> sp., <i>Gardnerella vaginalis</i> et <i>Trichomonas vaginalis</i>) (hybridation par sonde ADN)	Becton-Dickinson
	• Test IDI-Strep B (<i>Streptococcus B</i> - Hybridation directe)	GeneOhm Science
	• Test IDI-MRSA (Détection de la résistance à la méthicilline du <i>Staphylococcus aureus</i> - Hybridation directe)	
	• SepCheck (FISH sur sang total) (<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus Coagulase Negative</i> , <i>Streptococcus spp.</i> , <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Enterobacterium spp</i>)	RiboTechnologies/ Microscreen
	• TOCSan (Quantification de bactéries - PCR en temps réel SYBR-Green)	
• Genotype® MRSA Direct (reverse dot-blot) : Détection direct des staphylocoques dorées résistants à la méthicilline	Biocentric	
Gamme LightCycler (PCR en temps reel)		
Liste de bactéries (non exhaustif)	Roche	
• Détection de bactéries		
◦ <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
◦ <i>Enterococcus faecalis</i>		
◦ <i>Staphylococcus aureus</i> et staphylocoques coagulase négatifs		
• Recherche de résistance aux traitements :		
◦ Recherche de résistance à la méthicilline (<i>MecA</i>) des <i>Streptococcus sp</i>		
◦ Recherche de résistance à la vancomycine (<i>vanA/vanB</i>) des <i>Enterococcus sp.</i>		
Gamme RealArt artus (PCR en temps reel)		
• <i>Borrelia</i> sp	Qiagen	
• <i>Campylobacter</i> sp		
• <i>Listeria monocytogenes</i> sp		
Les champignons	Gamme LightCycler (PCR en temps reel)	
	• Détection de <i>Candida albicans</i>	Roche
	Détection sur sang total (PCR en temps reel)	
• <i>Aspergillus</i> Tracer : Détection d' <i>Aspergillus</i> sp.	Affigene	

(suite)

Tableau 1 (suite)

Agents pathogènes	Kit	Société
	Détection sur milieu de culture	
	• AccuProbe (HPA)	AdvanDx
	o <i>Blastomyces dermatidis</i>	
	o <i>Coccidioides immitis</i>	
	o <i>Histoplasma capsulatum</i>	
	o PNA FISH <i>Candida albicans</i> (FISH)	
	Identification générale de Champignon	
	Séquençage de régions bactériennes (cf. Gène ITS2, région D2 de l'ARNr...)	
	• Microseq	Celera
	• PyroMark	Biotage
Les parasites	Realart Artus (PCR TaqMan en temps réel)	
	• Paludisme	Qiagen
Bioterrorisme	Gamme PathAlert (PCR en temps réel)	InVitrogen
	• <i>Bacillus Anthracis</i>	
	• <i>Yersinia pestis</i>	
	• <i>Francisella tularensis</i>	
	• Smallpox	
	Gamme Certified Lux primer set (amorces pour PCR en temps réel)	InVitrogen
	• <i>Bacillus Anthracis</i>	
	• <i>Yersinia pestis</i>	
	• <i>Francisella tularensis</i>	
	• <i>Clostridium botulinum</i>	
	• Smallpox	
	• Virus de Lassa	
	GeneXpert (PCR en temps réel)	Cyphaid
	• <i>Bacillus anthracis</i>	
	Gamme RAPID (PCR en temps réel)	Idaho Technologies
	• <i>Bacillus Anthracis</i>	
	• <i>Yersinia pestis</i>	
	• <i>Francisella tularensis</i>	
	• <i>Clostridium botulinum</i>	
	• <i>Escherichia coli O157:H7</i>	
	• <i>Salmonella sp</i>	
	• <i>Brucella sp</i>	
	• <i>Listeria sp</i>	
	Gamme ABI 7000 (PCR en temps réel)	Celera
	• <i>Escherichia coli O157:H7</i>	
	Gamme RealArt Artus (PCR en temps réel)	Qiagen
	• <i>Bacillus Anthracis</i>	
	• <i>Salmonella sp</i>	
	• <i>Dengue virus</i>	
	• <i>OrthopoxVirus</i>	
	LightCycler (PCR en temps réel)	Roche
	• <i>Bacillus anthracis</i>	

Le génotypage du VHC. La réponse thérapeutique et le pronostic de la maladie varient selon le génotype du VHC en cause. Les génotypes 2 et 3 obtiennent une meilleure réponse thérapeutique (il existe six génotypes majeurs du VHC). Pour ces deux génotypes, 24 semaines de traitement sont habituellement suffisantes pour obtenir une réponse thérapeutique alors que dans les autres cas, 48 semaines sont nécessaires. Par ailleurs, il a été démontré que le génotype 1b est aussi un facteur de risque d'évolution vers une fibrose hépatique. Le génotypage du VHC est donc important pour déterminer la durée du traitement et

le pronostic de la maladie [1]. Des kits sont disponibles (Tableau 1).

Le virus de l'hépatite B (VHB)

Le VHB est un virus à ADN de la famille des Hepadnaviridae, constitué de huit génotypes majeurs (A à H), responsables d'hépatite aiguë évoluant vers l'hépatite chronique chez 3 % des sujets immunocompétents (mais jusqu'à 90 % des nouveau-nés et de 30 à 100 % des immunodéprimés infectés). Les modes de transmission sont multiples (par exemple, infections nosocomiales, transmission mère-enfant,

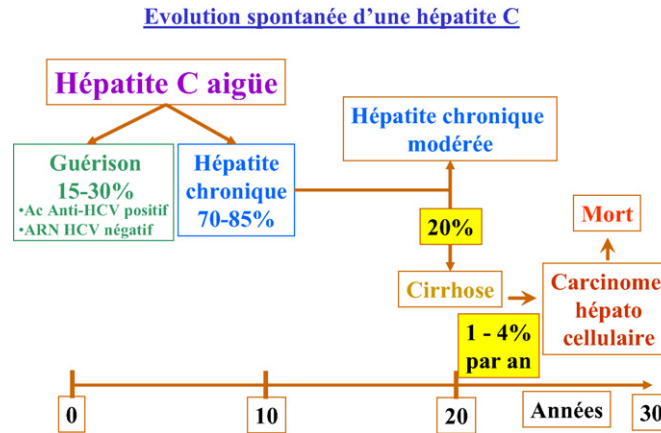


Figure 1 Évolution naturelle de l'hépatite C en absence de tout traitement.

Tableau 2 Charge virale du VHC - Limites de dosage [28]

Kit	Gamme de dosage
Versant HCV 3.0	615-7 700 000
Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0	600-500 000
HCV Cobas TaqMan 48 ASR	25-10 000 000
LCx HCV ARN	25-2. 630 000
RealTime HCV	25-5 000 000

toxicomanie intraveineuse, transfusion sanguine exceptionnellement en France depuis 1992 mais encore fréquente dans d'autres pays). La chronicité caractérisée par la persistance de l'antigène HbS depuis plus de six mois, favorise dans 20 % des cas, l'évolution vers la cirrhose au bout de 20-30 ans d'évolution après le contage puis vers l'hépatocarcinome. Réel problème de santé publique, 400 millions de personnes en sont atteintes dans le monde. En France, la prévalence des porteurs de l'AgHbS est estimée à 0,68 % soit environ 300 000 porteurs chroniques du virus HBV [64, 76]. Environ un tiers des porteurs chroniques sont des porteurs sains ou asymptomatiques (on parle maintenant de porteurs inactifs). Dans certains cas, une co-infection par le virus de l'hépatite delta (VHD) est possible. Lors de la prise en charge clinique des patients atteints d'hépatite chronique B, de nombreux tests biologiques et histologiques sont indispensables pour le suivi de la maladie hépatique. L'analyse de la réplication et du génotype viraux fait partie des examens à réaliser dans un but à la fois pronostique et thérapeutique [77]. Par ailleurs, la charge virale est corrélée au degré des lésions hépatiques. La quantification du VHB (charge virale) est réalisée à l'aide de kits (Tableau 1). Comme d'autres tests de quantification en biologie moléculaire, ils sont rendus en copies/ml ou, de plus en plus en UI/ml. Par ailleurs, et cela est vrai pour tous les kits de biologie moléculaire de quantification, la variabilité inter-test nécessite que, pour un même patient, le même test de quantification (précisé dans le résultat) soit le même pour le suivi. En effet, chaque kit présente un résultat différent (mais étroitement corrélé) aux autres, les standards internes utilisés étant différents. Une charge virale inférieure à 10^4 copies/ml est le plus souvent associée à des lésions hépatiques minimales. Entre 10^4 et 10^8 copies/ml, on observe souvent une phase immunoactive de l'hépatite B chronique et au-delà de 10^8 copies/ml, un état d'immunotolérance et

de faibles lésions hépatiques [77]. Au cours des traitements par analogues nucléosidiques, l'objectif est d'obtenir une charge virale inférieure à 10^3 .

Le génotypage du virus effectué par séquençage le plus souvent (méthode de référence) est parfois réalisé (Une charge virale minimum de 10^3 copies/ml est alors nécessaire). D'autres techniques sont aussi utilisables (Tableau 1).

Place de la biologie moléculaire dans l'hépatite chronique B en pratique. Avant tout traitement, le patient atteint d'hépatite chronique B doit avoir un génotypage viral et une charge virale, une bonne réponse à l'interféron pégylé étant associée à une charge virale inférieure à 10^7 copies/ml et un génotype A ou B (et des transaminases à trois fois la normale). En cas de traitement par les analogues nucléosidiques, la réponse thérapeutique est identique quel que soit le génotype viral. Dans le cas de l'entécavir récemment ajouté dans l'arsenal thérapeutique contre ce virus, les informations sont encore insuffisantes pour déterminer l'existence ou non d'une relation traitement-génotype.

Au cours du traitement, on considère qu'une baisse de la charge virale d'au moins un \log_{10} est significative. Celle-ci est évaluée trois mois après le début du traitement puis régulièrement tous les trois-six mois en fonction de l'état clinique du patient. En général, au cours des traitements par lamivudine ou par adéfovir dipivoxil, l'objectif est de maintenir la charge virale en dessous de 10^3 copies/ml. En effet, au-delà de ce chiffre, le risque d'acquisition d'une résistance au médicament est très important. Une remontée d'un \log_{10} de la charge virale confirmée par un deuxième prélèvement, évoque une résistance au traitement (les problèmes d'observance ayant été éliminés) [77]. Le typage des mutations à l'origine de cette résistance (actuellement réservé à certains laboratoires) peut alors être envisagé. Ce génotypage est d'autant plus important que pour certaines mutations du virus VHB, il n'existe pas de résistance croisée entre ces deux molécules.

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

Le VIH est un virus à ARN de la famille des rétrovirus. Il possède une transcriptase inverse (ou reverse transcriptase) qui permet la transcription de l'ARN viral en ADN proviral. Ce dernier peut s'intégrer dans le génome cellulaire. En fonction de l'hôte et des interactions cellulaires multiples,

l'ADN proviral peut alors rester latent (silencieux) ou devenir actif et permettre la production de virus. Environ 6000 nouveaux cas d'infections au VIH sont diagnostiqués chaque année (dont un tiers de primo-infection). Environ 30 000 personnes sont atteintes de sida en France et environ 6000 nouvelles séropositivités par le VIH sont découvertes (chiffres 2004). Le VIH-1 représente la majorité des cas (le VIH-2 ne représente que 2,3 % des infections par le VIH, une co-infection VIH-1/VIH-2 étant présente dans 0,3 % des cas). Le VIH-1 groupe M sous-type B représente environ 50 % des infections à VIH-1 (50 % sont des sous-types VIH-1 non-B). Le groupe O représente 0,3 % des infections à VIH-1 [36].

La primo-infection par le virus VIH-1. La biologie moléculaire n'a aucune place dans le dépistage de l'infection sauf en cas de suspicion de transmission mère-enfant (les anticorps maternels sont transmis au nouveau-né). La recherche d'ADN proviral VIH est alors effectuée. La recherche qualitative par biologie moléculaire peut aussi se discuter dans les rares cas où existe un doute sur une infection virale au VIH.

La quantification du VIH (charge virale). La quantification de l'ARN viral (appelée encore charge virale) est un excellent marqueur prédictif de l'évolution de l'infection, indépendant du taux de CD4. Il est indispensable pour la décision et le suivi thérapeutique et constitue un marqueur prédictif de la transmission foetomaternelle (Rapport Delfraissy 2004, www.sante.gouv.fr/hm/actu/delfraissy). Dans le cas du suivi thérapeutique, l'objectif est d'obtenir une charge virale inférieure à 50 copies/ml (seuil de détection des kits actuels). De nombreux tests commerciaux sont disponibles et sont équivalents en pratique (Tableau 1). Les techniques utilisées sont multiples, RT-PCR (compétitive ou en temps réel), NASBA, ADN branché par exemple. Les méthodes commerciales quantifient uniquement le virus VIH-1. Tous les sous-types du VIH-1 sauf le sous-type O sont quantifiés. Un seul kit LCx™ HIV-1 permet aussi de quantifier ce dernier sous-type. Il existe une étroite corrélation entre les différents kits utilisés. Mais, le résultat absolu est différent. Il est donc indispensable de toujours quantifier avec la même technique pour un même patient [42,59,67]. Dans l'hypothèse d'un changement de technique, il est indispensable de le préciser au médecin prescripteur.

Le traitement du VIH repose sur l'association de plusieurs antirétroviraux, le but étant bien entendu la diminution maximale du virus (à ce jour, l'élimination totale du virus n'est pas possible). L'échec du traitement amène à considérer plusieurs causes (mauvaise observance, intolérance aux médicaments, interactions médicamenteuses, traitement antirétroviral insuffisant, résistance aux antirétroviraux). Cet échec en fait est souvent multifactoriel. Lorsque l'absence ou l'insuffisance de réponse thérapeutique est présente, on parle d'échec viral (EV) [21]. En addition de la clinique et des autres examens biologiques (notamment le taux de lymphocytes CD4), cet échec thérapeutique est apprécié sur la charge virale dont le taux varie significativement s'il varie de $0,5 \log_{10}$ (c'est-à-dire d'un rapport de 3 en valeur absolue). Il est indispensable de savoir néanmoins que les infections intercurrentes ou les vaccinations peuvent transitoirement augmenter la charge virale. Il est également possible d'observer des élévations

transitoires (< 1000 copies/ml) non significatives et aléatoires de la charge virale (appelées encore *blips*). L'EV est évalué après la mesure de deux CV à un mois d'intervalle. Plusieurs cas de figures sont possibles. Schématiquement, on peut considérer trois types de réponses :

- absence de réponse : diminution de la CV inférieure à $1 \log_{10}$ copies/ml ;
- réduction sub-optimale : valeur significativement diminuée mais sans atteindre « l'indélectabilité » à trois mois ;
- échappement virologique ou rebond : réapparition d'une CV après une période d'indélectabilité.

L'intensité de la charge virale est appréciée selon le nombre de copies/ml.

- EV minime : 1000-5000 copies/ml ;
- EV modéré : 5000 - 30 000 copies/ml ;
- EV majeur : supérieur à 30 000 copies/ml.

Le génotypage du VIH. Dans les cas de figure rapportés au paragraphe précédent, une recherche de résistance aux antirétroviraux doit être effectuée par génotypage du VIH. En pratique, le génotypage consiste à réaliser le séquençage du gène codant pour la reverse transcriptase (RT) et pour la protéase du virus (Fig. 2). Des kits de séquençage sont disponibles, la charge virale minimum pour effectuer ces techniques étant de 1000 copies/ml (Tableau 1). Leurs performances sont équivalentes. Actuellement, environ une cinquantaine de mutations sur la RT et une trentaine sur la protéase sont connues. Des algorithmes d'interprétation sont disponibles pour une prise de décision en fonction du résultat obtenu (disponible par exemple, sur le site www.hivfrenchresistance.org/tab2005.html). Un contrôle de qualité européen a été mis en place. Par ailleurs, il n'existe pas actuellement de kit pour séquencer le gène d'enveloppe (cible des inhibiteurs de fusion). Dans ce dernier cas, chaque laboratoire développe sa technique maison. En règle générale, ces techniques de génotypage permettent l'analyse de la population majoritaire présente dans le sang circulant (les populations minoritaires sont ignorées).

Co-infection du VIH avec les virus des hépatites. Chez les sujets contaminés par le VIH, la co-infection avec d'autres virus est possible. Il est donc important d'y penser. On retrouve ainsi une co-infection avec le virus VHC chez 25 % des sujets VIH positifs, avec le virus VHB chez 8 % des VIH positifs et VHC/VHB chez 0,8 % des sujets VIH positifs.

Les herpes virus (HSV et CMV)

Les herpès virus. Les herpès virus sont parmi les agents infectieux les plus fréquents. À ce jour, huit herpès virus sont connus. Ce sont des virus ADN de la famille des Herpesviridae. En règle générale, les herpès virus constituent des primo-infections cliniquement paucisymptomatiques chez les sujets immunocompétents. Le virus reste ensuite à l'état latent dans de nombreuses cellules et organes. Une réactivation de l'infection est possible dans un deuxième

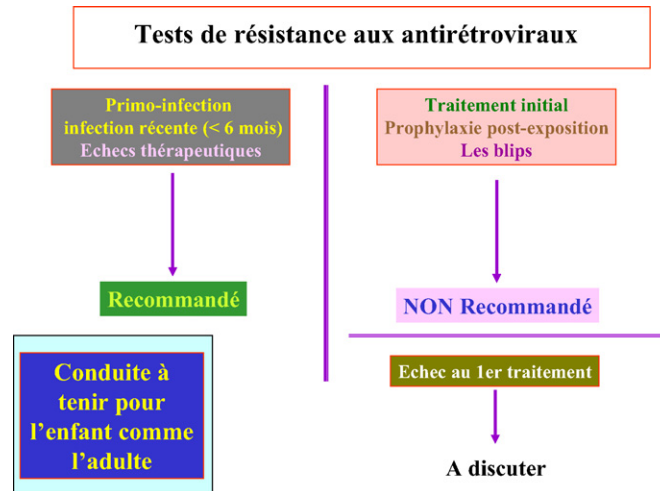


Figure 2 Principes de décision de la recherche d'une résistance aux traitements antirétroviraux au cours de l'infection par le VIH.

temps et peut provoquer une complication grave, notamment chez le sujet immunodéprimé (sida ou transplantation d'organe). La recherche qualitative du virus (recherche de l'ADN viral) n'est en général pas un bon examen de diagnostic. En effet, elle détecte aussi le virus présent à l'état latent. Malgré cela, des kits sont disponibles mais l'interprétation doit être prudente (notamment pour les virus EBV, HHV6 et HHV7). Des tests de biologie moléculaire ont aussi été développés pour quantifier certains de ces virus (cf. EBV). La quantification permet d'évaluer le pronostic de la maladie, suivre son évolution et vérifier l'efficacité thérapeutique.

Le cytomegalovirus (CMV). Après une infection, le CMV, virus de la famille des herpès virus, persiste dans l'organisme dans les leucocytes du sang circulant à l'état latent. La réactivation du virus est observée chez les sujets immunodéprimés (sida, transplantation d'organes) et aboutit à une infection grave. Il est donc important de détecter rapidement et précocement ce virus dont l'infection est potentiellement létale. Par ailleurs, le CMV est la cause principale d'infection intra-utérine et atteint 0,3-2% des nouveau-nés, le risque majeur pour ces derniers se situant dans les 16 premières semaines de la grossesse. Néanmoins, la biologie moléculaire n'est positive que de manière inconsistante dans les primo-infections à CMV au cours de la grossesse (risque de transmission de 20-50%). La biologie moléculaire ne semble donc pas utile dans cette indication [39]. Par ailleurs, la mise en évidence qualitative du virus dans le sang n'a aucune valeur indicative. En effet, elle ne permet pas de distinguer une infection latente (silencieuse) d'une infection active. La mesure de la quantité de virus (la charge virale) permet d'évaluer la gravité de l'infection, son pronostic et d'adapter le traitement. Des kits sont disponibles pour mettre en évidence le virus ou le quantifier (Tableau 1).

Les papillomavirus (HPV)

Les papillomavirus humains (HPV) sont des virus à ADN de la famille des Papovaviridae. Environ 100 types d'HPV sont répertoriés à ce jour dont une trentaine ont un tropisme pour la sphère anogénitale et sont considérés comme

agents coresponsables des cancers du col de l'utérus (risque multiplié par 300-500) [6]. On estime qu'environ 15% des cancers seraient d'origine infectieuse, HPV étant à l'origine de 30% d'entre eux (parmi les autres agents infectieux reconnus inducteurs de cancer, on peut citer des virus comme HBV, HVC, EBV ou certaines bactéries comme *Helicobacter pylori*) [44]. Selon les génotypes des virus HPV, certains sont considérés à bas risque (cf. 6, 11, 42, 43 et 44) et d'autres à haut risque (cf. 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 54, 56, 58, 59 et 66) de participer au développement du cancer du col de l'utérus [15,56,69]. L'infection par HPV est une infection sexuellement transmissible fréquente (la prévalence est estimée à 80% chez les femmes de 18 à 22 ans) et dans la majorité des cas, transitoire. Chez les femmes de plus de 30 ans, la prévalence est faible mais le risque de portage chronique important. Or, la menace d'une persistance de l'infection par un type HPV à haut risque est un facteur majeur d'évolution vers un cancer du col (huit ans sont nécessaires pour le développement d'une lésion invasive après l'infection). Ce cancer représente en France la huitième cause de cancer en incidence et la cinquième cause de cancer en mortalité. Dans plus de 95% des cancers intraépithéliaux du col de l'utérus, l'ADN HPV est retrouvé, les génotypes 16 et 18 étant les plus fréquents. L'adénocarcinome du col utérin est moins fréquemment associé au HPV, le génotype 18 étant le plus fréquent de même que dans le cancer du col à petites cellules. La recherche du HPV est possible dans certaines conditions en association avec le frottis cervical en cas d'anomalie au niveau du col utérin. L'Anaes a publié un avis en 2004 sur l'intérêt de la prescription de test ADN pour la recherche du HPV [4]. Ce rapport n'a malheureusement pas donné de réponse concise et claire. D'autres auteurs ont proposé des indications concrètes de recherche de l'ADN HPV [9, 23]. Actuellement, ce test est effectué chez les patientes présentant au frottis du col des cellules malpighiennes atypiques de signification indéterminée (cellules ASCUS, *atypical squamous cells of undetermined significance*) dont le degré de gravité est mal connu (environ 2-3% des frottis). La mise en évidence d'ADN HPV permet alors de reconnaître les lésions cervicales néoplasiques intraépithéliales de

haut grade. Certaines données récentes amènent à penser que le test serait utile pour les femmes de plus de 30 ans en association avec un frottis cervicovaginal en préventif, les études ayant montré dans ce cas une sensibilité de détection de quasiment 100 %. Certains auteurs proposent de coupler systématiquement frottis et détection de l'ADN HPV dans le dépistage systématique [53] et d'autres uniquement le dépistage par recherche de l'ADN HPV [19]. Un kit de détection et génotypage viral est disponible (Tableau 1). En cas de positivité, une coloscopie avec biopsie est effectuée. Il n'existe cependant aucun consensus lorsque le virus est retrouvé (avec un génotype classé à haut risque) et qu'aucune lésion histologique n'est mise en évidence (mais, il existe un grand nombre de frottis cervicaux faussement négatifs, la sensibilité du test étant d'environ 65 %). Une surveillance accrue semble indispensable dans ce cas, notamment, si un HPV de haut risque (cf. 16 ou 18) est présent, le risque de développer une lésion maligne étant important [9]. Ce test ne semble pas avoir d'intérêt dans le suivi thérapeutique des patientes. Cela est cependant discuté par certains auteurs [9]. Des tests de quantification du virus HPV, notamment du type 16 par PCR en temps réel à partir du frottis ont été décrits [27] et ont démontré dans certains cas (contredits par d'autres études) l'intérêt de la quantification pour différencier les infections à haut risque de cancer de celles à risque faible, voire nul [20,43].

Les autres virus

Tout virus de séquence connue est détectable par amplification génique, la PCR demeurant la technique la plus pratiquée. À titre d'exemple, le Tableau 3 donne quelques exemples de virus détectés par PCR en temps réel.

Les infections bactériennes

Chlamydia trachomatis (CT) et *Neisseria gonorrhoeae* (NG)

Les infections à CT et NG sont parmi les infections sexuellement transmissibles les plus fréquentes dans le monde. Depuis les années 2000, ces infections (associées à la syphilis et la lymphogranulomatose vénérienne) sont en constante augmentation [33]. Une étude réalisée aux États-Unis a montré qu'environ 4 % de la population des jeunes de 18-26 ans étaient infectés par CT et 0,4 % par NG [50]. En France, la prévalence serait plus importante comprise entre 10 et 18 % dans la population la plus atteinte soit les jeunes d'environ 15-30 ans [2,3]. Ces deux infections présentent un polymorphisme clinique important avec atteinte possible de l'utérus, de l'urètre, du rectum, de l'oropharynx, de la conjonctive oculaire. Ces infections sont souvent asymptomatiques (environ 50 % des cas pour CT). Elles peuvent se présenter sous forme d'urétrite ou de cervicite. Chez la femme, ces deux infections peuvent atteindre la sphère génitale haute et provoquer une atteinte inflammatoire du pelvis, une endométrite, une salpingite ou une périhépatite et aboutir à la stérilité, à des douleurs chroniques ou une grossesse extra-utérine. Chez l'homme, ces deux infections donnent une urétrite qui peut évoluer vers l'épididymite pouvant devenir chronique et provoquer une stérilité. Dans les deux sexes, NG peut

Tableau 3 Exemples d'agents infectieux détectés par PCR en temps réel [29]

Bactéries	
<i>Streptococoques</i> des groupes A et B	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Bartonella henselae</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>
<i>Bordetella pertussis</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
<i>Tropheryma whipplei</i>	<i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Yersinia pestis</i>	<i>Clostridium difficile</i>
Virus	
Herpès virus simplex (HSV)	Varicelle-zona (VSV)
Influenza virus	Parainfluenza virus
Metapneumovirus	Adénovirus
Polyomavirus	Entérovirus
Coronarovirus (SARS-CoV)	Poxvirus
West Nile virus	Rotavirus
JCV virus	Parvovirus
Epstein-Barr virus (EBV)	BK virus
Champignons	
<i>Aspergillus</i> sp	<i>Candida</i> sp
<i>Pneumocystis</i>	<i>Cryptococcus</i> sp
<i>Histoplasma</i>	<i>Coccidioides</i>
Parasites	
<i>Plasmodium</i> sp	<i>Babesia</i> sp
<i>Trypanosoma</i> sp	<i>Leishmania</i> sp
<i>Toxoplasma</i> sp	<i>Cryptosporidium</i>
<i>Enterocytozoon</i>	<i>Encephalitozoon</i>
<i>Entamoeba</i>	<i>Giardia</i>

évoluer vers une diffusion plus large avec arthrite, méningite ou endocardite. CT peut aussi être responsable de proctite ou d'un syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter (rhumatisme inflammatoire aigu ou subaigu associé à une atteinte oculaire et urétrale). Par ailleurs, certaines souches de CT (sérovares L1, L2, L2a et L3) sont responsables d'une maladie plus rare mais dont la prévalence augmente significativement depuis quelques années, la lymphogranulomatose vénérienne responsable de lésions génitales ulcérées, transitoires se compliquant de lymphadénite, rectite, fistule et évoluant vers la chronicité. Par ailleurs, la transmission fœtomaternelle est possible pour CT et NG. Chez le nouveau-né, CT peut provoquer une conjonctivite ou une pneumonie et NG, une conjonctivite sévère, voire une septicémie. L'ensemble de ces éléments montre l'importance en termes de santé publique de ces infections et la nécessité de les dépister précocement [2]. Bien que la plupart des kits puissent détecter en même temps CT et NG (Tableau 1), nous les traiterons séparément pour des raisons didactiques.

CT et biologie moléculaire. CT est un organisme intracellulaire dont la croissance en milieu de culture est difficile [32]. Considérée auparavant comme la technique de référence (réservée à quelques laboratoires spécialisés), cette technique est longue (résultat en trois-sept jours) et coûteuse. Bien que sa spécificité soit de 100 %, elle présente une faible sensibilité (40-85 % selon les études). Elle permet d'établir des enquêtes épidémiologiques, voire la réalisation d'un antibiogramme. La recherche directe des antigènes

nes spécifiques possède l'avantage d'être rapide mais est peu sensible (50-60 %) et nécessite une grande habitude de lecture. La sérologie, témoin tardif de l'infection, n'a d'intérêt que pour les infections hautes. L'ensemble de ces inconvénients a été levé grâce à l'apport de la biologie moléculaire. Les différentes techniques disponibles sont toutes équivalentes et permettent la détection de CT dans différents types d'échantillons biologiques (sperme, urine, prélèvements vulvaire ou vaginal). Tant chez l'homme (prélèvements urétraux) que chez la femme (prélèvements endocervicaux ou urinaires), les kits ont une meilleure sensibilité que la culture tout en ayant une spécificité équivalente. En pratique, le test est le plus souvent effectué sur les urines du premier jet (sans toilette préalable) facilement réalisable par la patiente elle-même. Cet examen constitue un test de dépistage excellent. Il peut aussi être couplé au prélèvement au niveau de l'endocol. En fonction de la clinique, d'autres sites peuvent aussi être explorés tels que la conjonctive oculaire (en cas de conjonctivite), le liquide articulaire (en cas de syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter) ou endotrachéal chez le nouveau-né en cas de suspicion de pneumonie [32]. En France, il n'existe actuellement aucune recommandation sur le dépistage de CT par biologie moléculaire. Un rapport de l'Anaes datant de 2003 [3] propose différentes stratégies sans plus de clarification à savoir : soit un dépistage chez les femmes de moins de 25 ans avec traitement du/des partenaires en cas de positivité soit un dépistage des hommes et femmes de moins de 30 ans, voire un dépistage élargi aux sujets ayant plusieurs partenaires sexuels quel que soit l'âge. Des recommandations plus précises ont été données dans d'autres pays [60].

NG et biologie moléculaire. NG est un organisme intracellulaire dont la culture contrairement à CT, est facile. La spécificité (100 %) et la sensibilité de cette technique (85 %) sont excellentes. Le résultat est obtenu en un-trois jours. Par ailleurs, elle permet de réaliser un antibiogramme [60]. Pour certains auteurs, dans les régions où la prévalence de NG est faible, la culture est préférée aux tests d'amplification génique [22]. Cette notion est cependant contestée par d'autres auteurs qui n'ont pas observé de différence de performances des kits en termes de sensibilité et de spécificité en fonction de la prévalence [16].

Les tests de biologie moléculaire (CT et NG). Les tests de biologie moléculaire sans amplification (hybridation directe) sont parfois employés. Les tests à l'aide des techniques d'amplification sont cependant préférés et utilisés de manière courante (Tableau 1). Les tests d'amplification sont réalisables sur urines, prélèvement urétral, endocervical ou vaginal. Selon l'origine biologique de l'échantillon, la spécificité et la sensibilité des tests varient [60]. À titre d'exemple, pour CT, le kit AmpliCor™ (société Roche) a une sensibilité variant de 45 à 80 % chez la femme, de 92 % chez l'homme dans les urines et de 98 % au niveau urétral. Pour NG, le kit AmpliCor a une sensibilité de 84-100 % pour les prélèvements endocervicaux, de 100 % pour l'urètre, de 67 % pour les urines chez la femme et de 95 % pour les urines chez l'homme. Pour certains auteurs, tant chez l'homme que chez la femme, la recherche de CT (et non de NG) dans les urines présente la même sensibilité et spécificité que les prélèvements urétraux ou cervicovagi-

naux [16]. Par ailleurs, les kits quelle que soit la technique d'amplification utilisée sont équivalents tant sur le plan de la sensibilité que de la spécificité [16,60]. Les tests d'amplification génique ne peuvent cependant pas différencier un organisme vivant d'un organisme mort. Il est donc recommandé de ne pas effectuer cette recherche si le sujet a suivi un traitement spécifique (antibiotiques notamment) dans les trois semaines précédentes. Par ailleurs, dans les zones de faible prévalence, si un test d'amplification est utilisé, certains auteurs recommandent en cas de positivité d'effectuer un deuxième test de confirmation (pour éliminer les faux positifs) sur le même échantillon ou sur un nouvel échantillon, voire d'effectuer une culture [10].

La tuberculose

Généralités. Dans le monde, l'infection à *Mycobacterium tuberculosis* (MT) constitue un problème majeur de santé publique, un tiers de la population mondiale étant considéré comme contaminé et huit millions de nouveaux cas étant détectés chaque année. Par ailleurs, on assiste dans les pays développés à une résurgence de la maladie et à l'apparition de souches multirésistantes (notamment chez les sujets VIH positifs). En France, la tuberculose touche essentiellement les immigrés, les SDF et les prisonniers avec une forte prévalence en Île-de-France, trois fois et demi supérieure au reste du territoire. La multirésistance (isoniazide et rifampicine) est encore faible (estimée à 1,4 %) mais semble continuer à augmenter. En 2003, 6100 cas de tuberculose ont été déclarés (dont 6000 en France métropolitaine). Par rapport à 1997, date d'un recensement important, les chiffres de 2003 montraient une stabilisation de l'infection. Mais, l'importance de l'infection chez les immigrés (notamment d'Afrique subsaharienne) fait craindre un risque d'augmentation de l'incidence de la maladie (évaluée en 2003 à 10,2 cas pour 100 000 habitants). Il est donc important de dépister rapidement la tuberculose. En effet, en cas de suivi rigoureux et de traitement bien adapté, la guérison à six mois est d'environ 85 % [12]. Pour déceler une mycobactérie, les méthodes traditionnelles de diagnostic telles que l'examen direct des crachats (après coloration à l'auramine ou de Ziehl-Nielsen) nécessitent au moins 10^4 bacilles alcoolrésistants/ml. Cet examen, par ailleurs, ne permet pas de trancher entre MT et les autres mycobactéries. La culture permet d'affirmer l'infection par MT et représente l'examen de référence (*gold standard*) pour affirmer le diagnostic. Malheureusement, pour obtenir un résultat, la culture sur milieu de Lowenstein-Johnson nécessite quatre à six semaines. De plus, l'examen des crachats ou des lavages bronchoalvéolaires nécessite au préalable une décontamination par du N-acétyl-L-cystéine et de la soude, ce qui provoque une baisse sensible du nombre de bactéries. L'utilisation d'un automate de détection (système BacT/ALERT™ ou le système Bactec™ par exemple) permet d'augmenter la sensibilité de détection en ramenant le temps de diagnostic à 12-14 jours environ. D'autres méthodes telles que la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase gazeuse ou la technique Elisa n'ont pas amélioré la détection [57]. La question s'est alors posée de l'indication de la biologie moléculaire dans ce contexte.

Apports et limites de la biologie moléculaire dans la tuberculose. Étude dans les échantillons cliniques. Un diagnostic précoce est important pour un traitement efficace [47]. Certains kits ont donc été développés dans le but d'obtenir un diagnostic rapide de la tuberculose pulmonaire (Tableau 1). Ces tests se sont révélés très performants lors d'études sur les crachats positifs après coloration spécifique (sensibilité supérieure à 95 %, spécificité 100 %). Sur les échantillons négatifs après coloration, la sensibilité est moins bonne (80-85 %) alors que la spécificité reste excellente (99 %). Par ailleurs, de nombreux auteurs ont rapporté leur expérience à l'aide de développement personnel d'outils de recherche par biologie moléculaire (technique « maison »). Certaines études ont comparé les kits et les techniques « maison » et ont retrouvé des résultats équivalents [13]. Depuis la commercialisation de kits spécifiques, la place de la biologie moléculaire a été régulièrement discutée dans les nombreux essais réalisés [13,57]. Il n'existe toujours pas de consensus sur son intérêt pratique. D'après les nombreuses études réalisées sur ce sujet, il est clair que les renseignements cliniques jouent un rôle important dans la prise de décision d'une prescription d'examen par biologie moléculaire. Quelques études ont été réalisées sur les tuberculoses extrapulmonaires (par exemple, la méningite tuberculeuse). Ainsi, dans le cas des méningites tuberculeuses, l'analyse du liquide céphalorachidien retrouve le germe avec une sensibilité de 56 % et une spécificité de 98 % [14,61]. Par conséquent, de manière générale, bien que ces tests soient rapides et spécifiques, leur faiblesse réside dans la sensibilité qui tout en étant variable selon la nature des échantillons, est le plus souvent insuffisante. L'un des problèmes liés à cette sensibilité insuffisante est la présence d'inhibiteurs de polymérase allant de 4 % dans les échantillons pulmonaires à 18 % dans les échantillons extrapulmonaires. Les kits d'extractions d'ADN de mycobactéries ont été améliorés pour limiter le problème des inhibiteurs (notamment sur les échantillons extrapulmonaires). Certains préconisent une courte culture de deux-trois jours en milieu de Lowenstein-Jensen avant d'effectuer l'amplification [25]. Par ailleurs, des faux positifs (non liés à une contamination) ont été rapportés. Il s'agissait d'ADN de mycobactéries non viables mis en évidence après traitement antituberculeux [13]. Ainsi, l'intérêt de la recherche de mycobactéries par amplification génique est limité, voire pour certains discutable et ne remplace en aucun cas les tests conventionnels (examen direct et culture) auxquels ils peuvent éventuellement être associés [47] (par exemple, pour confirmer le diagnostic de *Mycobacterium tuberculosis* sur un examen direct de crachats positif ou pour d'autres, en cas de localisation viscérale et en cas d'examen direct négatif). Un test négatif n'élimine cependant jamais le diagnostic (notamment en cas de suspicion de tuberculose extrapulmonaire avec crachats négatifs). Il n'existe donc aucun consensus sur l'indication des tests de biologie moléculaire dans les infections à mycobactéries. Outre le diagnostic de tuberculose, la recherche d'ADN mycobactérien a été rapportée dans la surveillance du traitement spécifique et dans la recherche des rechutes. Au bout de six mois, environ 30 % des patients présentent toujours un test moléculaire positif. Parmi eux, certains avaient une tuberculose grave ou une résistance au traite-

ment. La positivité pouvait s'expliquer dans certains cas par la présence de faux positifs (mycobactéries non viables). [75]. Il ne faut donc jamais utiliser les tests d'amplification génique chez des patients traités, le risque de faux positif pouvant être important. Certains ont évalué la charge bactérienne mais n'ont pas mis en évidence d'intérêt à cette étude tant sur le plan pronostic que sur celui de l'évaluation thérapeutique [49].

Identification des mycobactéries en milieu de culture.

En revanche, la mise en évidence de mycobactéries sur milieux de culture par identification directe à l'aide de sondes spécifiques semble beaucoup plus intéressante. Un certain nombre de kits ont été développés dans ce but (Tableau 1). Selon les kits, une ou plusieurs espèces de mycobactéries peuvent être identifiées. Le développement de puces d'ADN permettant à la fois l'identification de mycobactéries et l'étude de résistance aux antibiotiques a aussi été décrit [30].

Étude des résistances aux antibiotiques. Les dernières études en France montrent un taux de multirésistance des mycobactéries d'environ 1,4 %, taux similaire à ce qu'on retrouve dans le reste de l'Europe avec une forte proportion pour l'isoniazide et la rifampicine [65]. Bien que faible, cette prévalence semble augmenter d'année en année depuis 2000. La biologie moléculaire à l'instar de ce qui est réalisé pour les virus permet d'étudier ces résistances en analysant les gènes responsables. Pour permettre l'étude de résistances, il est cependant nécessaire d'obtenir suffisamment de mycobactéries. Certains automates (par exemple, de la gamme Bactec™) permettent ainsi de détecter les mycobactéries à partir du quatrième jour de culture. Parmi les techniques d'analyse, la biologie moléculaire a démontré sa capacité à réaliser ces tests soit en kits (Tableau 1) soit à l'aide de techniques maison (cf. séquençage, pyroséquençage, PCR-RFLP, PCR en temps réel). Ils sont cependant réservés à quelques laboratoires spécialisés. Plusieurs gènes de résistance peuvent être étudiés par exemple les gènes *rpoB* (rifampicine), *katG* (isoniazide), *embB* (éthambutol), *gyrA* (fluoroquinolone) [73]. Néanmoins, ces tests moléculaires ne doivent en aucun cas remplacer les tests phénotypiques dont ils sont complémentaires. En effet, la complexité des mécanismes de résistance impliqués rend indispensables les tests phénotypiques.

Enquêtes épidémiologiques. Les études épidémiologiques sont importantes dans certains cas, notamment en zone d'épidémie ou d'endémie. Parmi les techniques d'analyse, la PCR-RFLP de la séquence d'insertion IS6110 du complexe *Mycobacterium tuberculosis* est la plus utilisée. Cette séquence est une séquence répétée retrouvée en moyenne en cinq dix exemplaires dans les mycobactéries. Néanmoins, dans certains cas, cette séquence n'est pas présente, ce qui nécessite l'analyse d'autres cibles [14].

Les autres bactéries

Comme cela a déjà été dit dans cet article, tout agent infectieux peut être mis en évidence par les outils de biologie moléculaire. Bien que de nombreuses techniques d'amplification existent, la principale technique utilisée reste la PCR. Le Tableau 3 donne quelques exemples de bactéries détectées par des techniques « maison » par PCR

en temps réel. De manière générale, la biologie moléculaire présente de nombreux avantages sur la culture souvent considérée comme la technique de référence. En effet, la biologie moléculaire est plus rapide et plus sensible que la culture. Cependant, selon les échantillons, la PCR présente quelquefois certaines limites. En effet, certains échantillons possèdent des inhibiteurs qui peuvent être difficiles à éliminer (par exemple, crachats, urines, fèces). Parmi les indications utiles de la biologie moléculaire en bactériologie, on peut citer :

- les agents difficilement ou non cultivables (par exemple, *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi* ou *Tropheryma whippelii*) ;
- les bactéries opportunistes (par exemple, *Legionella* sp) ;
- les bactéries traditionnellement détectées par la sérologie (par exemple, les antigènes du *Streptococcus* groupe A ou de la toxine *Escherichia coli* O157:H7). Pour certaines bactéries pouvant être présentes en absence de pathologie (par exemple, *Streptococcus pneumoniae*), la quantification de la bactérie a été proposée pour apprécier son rôle dans la pathologie étudiée [31] ;
- un diagnostic infectieux d'urgence (par exemple, suspicion d'une méningite à *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*) ;
- la recherche de résistance aux antibiotiques (cf. *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline ou *Enterococcus* sp résistants à la vancomycine).

Un cas particulier : le bioterrorisme et la guerre biologique. Les agents biologiques peuvent être des armes terribles que ce soit dans le cas d'actes terroristes ou d'actes de guerre. Officiellement, de nombreuses chartes internationales ont été signées pour que les nations ne développent aucune arme biologique. La réalité est tout autre (CNS, Center for Non-proliferation Studies, cns.miis.edu/research/cbw). Par conséquent, la nécessité de détecter et d'identifier rapidement un agent bioterroriste a amené naturellement les biologistes à développer des moyens diagnostiques d'urgence parmi lesquels les

techniques de biologie moléculaire. Nous évoquerons brièvement les aspects importants de la biologie moléculaire dans ce contexte très particulier et reportons les lecteurs à la revue générale récente de Lim DV et al. sur ce sujet pour des informations plus complètes [41]. Un ensemble de conseil pour la détection, le diagnostic et la déclaration d'agents susceptibles d'être liés au bioterrorisme sont accessibles sur le site Internet du centre américain CDC (Center for Disease Control, www.bt.cdc.gov/lrn/factsheet.asp). En France, un plan spécifique le plan Biotox, a été décrété le 5 octobre 2001 pour la prise en charge de patients en cas d'actes de bioterrorisme (des fiches de prise en charge et de traitement sont disponibles sur le site de l'Afssaps, afssaps.sante.fr/htm/10/piratox/indpira.htm et des informations générales sur chaque pathologie sur le site du ministère de la santé, www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/biotox/index.htm). La détection de ces agents est un véritable défi technologique, l'urgence de la détection, la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité devant être élevées. De nombreuses bactéries peuvent être utilisées comme agents bioterroristes (Tableau 4). Parmi les techniques de détection, l'amplification par PCR est la technique la plus souvent décrite. Par ailleurs, l'autre composante analytique importante dans ce cadre est l'extraction des acides nucléiques. En effet, ceux-ci doivent pouvoir être isolés de sources variables porteuses potentielles d'inhibiteurs. De plus, les cibles recherchées (séquences nucléotidiques) peuvent avoir été modifiées accroissant encore la difficulté de leur détection. La première étape de cette détection doit donc être le traitement optimisé de l'échantillon (dont la nature peut être diverse telle que poudre, sang, air) pour pouvoir isoler la cible. Nous ne développerons pas les techniques disponibles. Nous citerons simplement quelques exemples permettant de concentrer la cible et donc d'accroître la probabilité de détecter un agent bioterroriste potentiel [41] :

- la centrifugation par gradient de densité ;
- la filtration : après lavage du filtre, l'agent bactérien peut être recherché directement sur le filtre ;

Tableau 4 Exemples d'agents infectieux potentiellement utilisables dans un but terroriste

Bactéries	Virus
<i>Bacillus anthracis</i> (Charbon)	Arenavirus (Fièvre de Lassa, de Machupo)
<i>Clostridium botulinum</i> (Botulisme)	Filovirus (Ebola, Marburg)
<i>Brucella</i> sp (Brucellose)	Hantavirus
<i>Burkholderia mallei</i> (morve)	Virus Nipah
<i>Burkholderia pseudomallei</i> (mélioïdose)	Smallpox virus (Variole)
<i>Chlamydia psittaci</i> (psittacose)	Virus responsables d'encéphalite
<i>Vibrio cholerae</i> (cholera)	Virus des fièvres hémorragiques
<i>Coxiella burnetii</i> (Fièvre Q)	
<i>Clostridium perfringens</i>	
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	
<i>Salmonella</i> sp (Fièvre typhoïde et apparenté)	
<i>Shigella</i> sp	
<i>Francisella tularensis</i> (tularémie)	
<i>Yersinia pestis</i> (peste)	
<i>Rickettsia prowazekii</i> (Typhus)	

- la diélectrophorèse : des bioparticules diélectriques permettent la séparation de particules en fonction de leur conductivité dans un champ électrique non uniforme ;
- la séparation par particules immunomagnétiques.

L'extraction des acides nucléiques est ensuite l'étape obligatoire. Certains systèmes ont été adaptés pour la détection rapide d'acides nucléiques. C'est le cas par exemple du système GeneXpert[®] de la société Cepheid qui réalise dans une cartouche à usage unique toutes les étapes depuis l'extraction jusqu'à la révélation après PCR en temps réel de la cible recherchée. L'ensemble de ces étapes s'effectue en 30 minutes environ. Ce système a notamment été adapté pour *Bacillus anthracis* (le bacille de l'anthrax). D'autres systèmes ont aussi été développés mais ne sont pas aussi rapides (par exemple, l'automate d'extraction MagNaPure[®] suivi d'amplification sur le LightCycler[®] de la société Roche).

Les échantillons selon leur origine peuvent nécessiter des traitements différents :

- la nourriture : les aliments étant d'origine variée, il n'existe pas de système universel de préparation. Dans ces derniers, la présence de lipopolysaccharides, de lipides ou d'acides divers peut, en effet, inhiber la PCR. En dehors d'une culture des aliments (préalable à une PCR), méthode d'amplification naturelle lente, les autres méthodes de purification comme celles décrites ci-dessus ne sont pas toujours suffisantes pour mettre en évidence la cible recherchée ;
- l'eau : il est nécessaire là aussi de concentrer l'eau pour recueillir la cible. Malheureusement, dans ce système, les inhibiteurs sont aussi fréquents (par exemple certains sels, les acides humiques). L'ultrafiltration est alors souvent utilisée pour retenir les agents pathogènes ;
- les poudres et les sols : la recherche de spores est souvent difficile (par exemple, spores de *Bacillus anthracis*). Des techniques efficaces [45] et des kits ont été développés dans ce but [41] ;
- les aérosols : selon la taille des particules, l'utilisation de filtres et/ou de liquides ou de supports semi-solides sont utilisées [68] ;
- les surfaces : l'utilisation d'un chiffon ou d'un écouvillon humide permettent de recueillir un agent pathogène (par exemple, des spores). Des systèmes d'aspiration et de centrifugation permettent aussi ce recueil [41].

Bien qu'un certain nombre de kits aient été développés en microbiologie, peu de kits l'ont été dans le cadre d'une menace bioterroriste (Tableau 1). On retrouve, en revanche dans la littérature de nombreuses références sur ce sujet [41]. Les cultures bactériennes par exemple, ne sont pas optimisées pour la détection d'agents bioterroristes. Des stratégies diverses ont été développées pour cette détection (voir le site du CDC www.bt.cdc.gov/labissues/index.asp#testing). Des automates, des systèmes immunologiques ou chimiques ont aussi été décrits [41]. Nous ne les détaillerons pas. En biologie moléculaire, des systèmes de PCR en temps réel ont été développés, notamment pour la détection de *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:

H7, *Salmonella* sp, *Brucella* sp, *Listeria* sp, le virus de la dengue, smallpox virus [41]. C'est le cas par exemple du kit PathAlert[™] de la société InVitrogen. La plupart des appareils commercialisés (par exemple, LightCycler[®], la gamme des ABI7000[™], le système GeneXpert[®]) ainsi que les kits sont utilisables en laboratoire. Ils présentent tous l'inconvénient majeur de ne pas pouvoir être utilisable « en rase campagne » (ce ne sont pas des appareils de terrain). Certaines sociétés ont cependant adapté certains thermocycleurs pour être utilisables en zone hostile (thermocycleurs portables pour PCR en temps réel). C'est le cas par exemple du thermocycleur RAPID[™] (*Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device*) de la société Idaho Technologies (États-Unis) ou le thermocycleur Bio-Seq[™] de la société Smiths Detection (États-Unis). Il s'agit de thermocycleurs ultrarapides capable de donner en théorie une réponse en 30 minutes après extraction de l'acide nucléique.

Ainsi, le développement de la biologie moléculaire dans le cadre du bioterrorisme reste peu développé et peu décrit dans la littérature scientifique. Il reste donc beaucoup à faire dans ce domaine. En plus, l'évaluation de ces techniques moléculaires « en grande nature » n'a pas été réalisée à notre connaissance. De nombreuses questions restent donc en suspens. Quelle est la meilleure technique à utiliser selon l'échantillon suspecté ? Comment détecter très rapidement plusieurs agents potentiels en même temps ? Comment mettre en évidence un agent pathogène non caractérisé ?

Les champignons et les parasites

Les champignons

Les infections par champignons sont de plus en plus importantes en milieu hospitalier, notamment les mycoses invasives opportunistes. Quant aux mycoses cutanées, elles sont fréquentes et ne posent en général pas de problème diagnostique. En effet, le diagnostic est alors réalisé par les méthodes traditionnelles telles que la culture, l'identification en galeries (panels enzymatiques et biochimiques), voire l'histologie (dans ce dernier cas, l'identification précise de l'agent pathogène n'est pas toujours réalisable). À l'opposé, les mycoses invasives sont de diagnostic plus difficile et les techniques habituelles manquent souvent de sensibilité et de spécificité (par exemple, 50 % de sensibilité pour l'hémoculture). La biologie moléculaire peut donc trouver une place comme moyen diagnostique dans ce contexte [7,8]. Elle peut aussi être utilisée dans les études épidémiologiques (infections opportunistes), le typage des souches, l'étude de la résistance aux antimycosiques. Malheureusement, peu de kits ont été développés dans cette indication (Tableau 1) [17]. De nombreux champignons sont responsables de pathologie humaine le plus souvent dans le cadre de sujets immunodéprimés (cf. transplantation d'organe, sida, chimiothérapie anticancéreuse), les plus fréquents étant *Aspergillus* sp, *Candida* sp et *Pneumocystis* sp. Ainsi, on estime qu'environ 30 % des aspergilloses invasives ne sont pas diagnostiqués [8]. Cinquante pour cent seulement des aspergilloses sont diagnostiqués après culture de liquide bronchoalvéolaire. Il en est de même pour la recherche de *Candida* sp dans le sang après culture [8]. Bien que toutes les techniques de biologie moléculaire soient applicables à l'étude des champignons (électropho-

rèse en champs pulsé, séquençage de gènes d'ARNr par exemple) [40], ces dernières années, la PCR en temps réel a permis de développer efficacement et avec une plus grande sécurité (moins de risque de contamination) la recherche de certains champignons fréquemment retrouvés tels que *Aspergillus* sp (cf. *fumigatus*, *niger*, *flavus*), *Candida* sp (cf. *albicans*, *glabrata*, *krusei*), *Pneumocystis carinii* (ou *jirovecii*), *Cryptococcus* sp [24]. Les tests d'amplification peuvent être effectués soit à partir de colonies isolées de milieux de culture soit à partir d'échantillon biologique (le plus souvent, le sang total). Cependant, les nombreuses techniques décrites depuis l'extraction des acides nucléiques jusqu'à la PCR n'ont pas abouti à ce jour à une standardisation des techniques d'étude des champignons. La sensibilité et la spécificité des tests sont variables selon la cible amplifiée et la technique (par exemple, sensibilité de 50 à 70 % pour la détection de *Aspergillus* sp) [63]. De nombreux autres problèmes se posent, notamment pour interpréter les résultats. En effet, certains champignons pouvant faire partie de la flore commensale (cf. *Candida albicans*), la mise en évidence de l'ADN du champignon ne signifie donc pas systématiquement son implication dans la pathologie. Par ailleurs, la mise en évidence d'ADN fongique dans les échantillons peut être la conséquence d'un champignon nécrosé (donc, non viable). D'autre part, pour certains auteurs, lors de prélèvements de liquide bronchoalvéolaire (en cas de suspicion d'aspergillose par exemple), il est possible d'avoir de faux positifs, des spores ou des conidies de ce champignon pouvant se trouver à l'air libre et contaminer l'échantillon. La quantification des acides nucléiques peut alors se discuter afin de trancher sur le lien de cause à effet en cas de positivité [8]. Ce problème ne se rencontre pas en cas d'analyse du sang total. Il est donc nécessaire d'être prudent dans cette recherche et surtout dans l'interprétation (risque de faux positifs). Par ailleurs, pour limiter encore le risque de faux positifs, certains préconisent l'utilisation d'automates d'extraction [8]. Pour d'autres, l'association de tests de biologie moléculaire à des tests immunologiques (par exemple, le test au galactomannane pour l'aspergillose ou les tests Elisa) permettrait d'établir le diagnostic [35,63,72].

Les parasites

Les parasitoses constituent un problème majeur de santé publique dans le monde. Elles sont couramment diagnostiquées par les méthodes traditionnelles (cf. examen direct, coproculture, tests immunologiques). La biologie moléculaire s'est également développée dans ce domaine. Malheureusement, peu de kits sont disponibles (Tableau 1). Par ailleurs, on retrouve essentiellement dans la littérature des tests « maison ». De plus, il n'existe pas de standardisation internationale. Parmi les nombreuses publications rapportées, certains parasites sont plus fréquemment étudiés. Nous les évoquerons brièvement [8].

Le paludisme (*Plasmodium* sp). Il s'agit d'un problème majeur de santé publique. En France, cette pathologie se retrouve chez les touristes et les migrants avec une fréquence croissante. Le diagnostic habituel est simple (frottis et goutte épaisse) et permet en 30 minutes d'établir le diagnostic. Néanmoins, des faux négatifs sont possibles. La sensibilité de la goutte épaisse est environ de 50-500 parasites/ μ l [54]. Avec la PCR, cette sensibilité peut descendre

à cinq-dix parasites dans le volume testé quel que soit le plasmodium responsable. Le résultat peut être rendu en deux heures (extraction incluse) [66]. Cependant, la PCR ne permet pas de différencier les quatre principales espèces de plasmodium (la cible amplifiée est commune aux quatre espèces). La corrélation avec l'étude au microscope est excellente. La PCR en temps réel permet aussi la quantification du parasite. Cependant, pour l'instant, la corrélation avec la parasitémie analysée au microscope est faible [24]. D'autres techniques d'étude moléculaire des parasites ont été développées, nous ne les détaillerons pas [52]. De plus, à l'heure actuelle, les techniques de biologie moléculaire ne sont pas accessibles dans les régions tropicales situées en zone d'endémie (hors de quelques grandes villes), le matériel et les infrastructures étant trop coûteux. Les techniques traditionnelles restent donc toujours les références, la biologie moléculaire étant réservée aux grands centres spécialisés.

La toxoplasmose (*Toxoplasma gondii*). La toxoplasmose, parasitose endémique dans le monde entier, est une pathologie potentiellement grave chez le sujet immunodéprimé (cf. greffe de moelle, sida) et chez la femme enceinte. Le diagnostic peut être porté par la sérologie et éventuellement confirmé par inoculation à la souris. La sérologie permet d'évaluer le risque de transmission foetomaternelle et de réactivation chez le sujet immunodéprimé. Actuellement, lors d'une forte suspicion de transmission foetomaternelle dans le cadre d'un diagnostic prénatal, l'étude du liquide amniotique par PCR a remplacé la technique classique d'inoculation à la souris dans de nombreux laboratoires spécialisés [70]. Chez les sujets immunodéprimés, la recherche de l'ADN du parasite par PCR dans le sang total permet un diagnostic rapide. D'autres échantillons biologiques ont aussi été étudiés pour la recherche du parasite (cf. humeur aqueuse, LCR, liquide bronchoalvéolaire). Il n'existe cependant pas de kit et les techniques de PCR ne sont pas standardisées. Des contrôles de qualité sont disponibles pour permettre une homogénéisation des techniques et des cibles amplifiées (cf. www.qcmd.org). Outre le diagnostic de l'infection, la biologie moléculaire a aussi été utilisée dans le cadre d'études épidémiologiques [70].

Autres parasitoses. Comme exemples de parasites étudiés par biologie moléculaire dans la littérature, nous citerons ceux responsables des leishmanioses (*Leishmania* sp), de la babésiose (*Babesia* sp), des trypanosomiasés (*Trypanosoma* sp), des giardiases (*Giardia* sp), de la trichomonase (*Trichomonas* sp), de la cryptosporidiose (*Cryptosporidium* sp), des amibes (*Entamoeba* sp), des microsporidiosés (*Encephalitozoon* sp). Bien entendu, dans tous les cas, il s'agit de techniques « maison », aucun kit n'étant disponible [24,51].

La biologie moléculaire d'urgence en infectiologie

À ce jour, dans un laboratoire de biologie moléculaire, en conditions optimisées, un résultat peut être rendu en trois à quatre heures (depuis la préparation de l'échantillon jusqu'au résultat final). La biologie moléculaire d'urgence est encore en phase de développement. En dehors du cas particulier du bioterrorisme, elle est moins étudiée. L'apport de la PCR en temps réel et le développement

d'automates d'extraction ont permis d'accélérer les étapes de préparation puis d'amplification et de détection des acides nucléiques. Les thermocycleurs disponibles sur le marché (www.biocompare.com) sont de plus en plus rapides. Certaines machines permettent d'obtenir des résultats en cinq minutes, le record actuel étant l'amplification d'un fragment de 85 pb en 78 secondes (30 cycles d'amplification). Un fragment de 2331 pb a pu être amplifié en deux minutes par PCR en temps réel [18]. Des auteurs ont déjà rapporté leur expérience sur ce sujet avec des résultats obtenus en moins de deux heures, traitement de l'échantillon inclus [74]. Outre la PCR en temps réel qui permet d'obtenir un résultat rapidement, d'autres techniques de biologie moléculaire sont en développement [18]. Parmi les autres techniques rapides, on peut citer un certain nombre de techniques d'amplification isotherme qui présentent l'avantage de ne pas nécessiter d'appareils coûteux et d'être rapides comme l'amplification par ramification (RAM, *ramification amplification*), l'amplification par cercles roulants (RCA, *rolling circle amplification*), l'amplification par déplacement de brin, la SDA (*strand displacement amplification*), l'amplification dépendante de l'hélicase, la HDA (*helicase-dependent amplification*). Des systèmes de détection de plus en plus rapides et à haut débit sont aussi développés. Avec les progrès de l'automatisation et des nanotechnologies, la biologie d'urgence peut devenir rapidement une réalité. Des techniques sans amplification de la cible sont aussi en développement. Il s'agit en général de techniques d'amplification de signal très puissantes. Par exemple, l'hybridation de sondes marquées à l'aide de fluorophores puissants et couplées à des systèmes de détection laser ultrasensibles permet la détection spécifique de bactéries [5,46]. Ces systèmes (et d'autres) sans amplification de cibles sont rapides (30-40 mn) et utilisent des machines compactes et légères. On peut ainsi penser que dans un avenir proche, la détection ultrarapide d'agents pathogènes y compris sur un terrain éloigné sera possible [18]. En dehors du contexte de bioterrorisme déjà évoqué, la biologie moléculaire appliquée à la recherche d'agents pathogènes en urgence en milieu hospitalier sera une réalité probablement dans quelques années.

Quels agents détecter en urgence (en dehors du bioterrorisme) ?

Comme exemple d'indications, on peut penser aux cas suivants :

- lorsque la vie du patient est en jeu et nécessite un traitement adapté rapidement. C'est le cas par exemple en cas de méningite à méningocoques (avec éventuellement détection multiplex par exemple d'entérovirus) ou d'infections par le streptocoque B ;
- lorsqu'une décision de traitement doit être prise rapidement (infection à *Mycobacterium tuberculosis* par exemple, entérocoques résistants à la vancomycine, *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline) ;
- lorsqu'un patient est suspect d'une infection sexuelle transmissible et a peu de chances de revenir en consultation.

Génétique, infections et biologie moléculaire

Face à l'infection de quelque nature qu'elle soit, chaque individu tout en ayant un mécanisme commun de défense, présente des variabilités génétiques non pathologiques (les polymorphismes) pouvant dans certains cas les rendre soit plus susceptibles (plus « fragiles ») soit plus résistants à certaines agressions microbiennes. On parle de facteurs génétiques liés à l'hôte. Les gènes impliqués sont essentiellement des gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la reconnaissance de l'agent infectieux et dans la coagulation [11,26,37]. L'hypothèse de facteurs génétiques impliqués dans la résistance ou non à des infections est partie de plusieurs observations cliniques telles par exemple que la résistance au paludisme grave des sujets atteints de drépanocytose. Des études sur jumeaux ont pu aussi démontrer le lien entre la génétique et la susceptibilité potentielle aux infections. La plupart des polymorphismes retrouvés impliqués dans la susceptibilité ou la résistance aux infections présentent des effets de sensibilité ou de protection mineurs. En fait, la réponse globale de sensibilité-résistance aux infections correspond à des effets additifs/soustractifs/synergiques/d'interactions entre de multiples facteurs. Il s'agit de la résultante d'interactions complexes que seuls, quelques polymorphismes ne peuvent expliquer [38]. La réponse à l'infection, quel que soit son sens, est trop complexe pour ne se résumer qu'à quelques variants alléliques. L'étude des facteurs génétiques impliqués dans la résistance ou la sensibilité aux infections n'en est donc qu'à ses débuts (domaine de la recherche) et ne présente pas d'intérêt pour le clinicien à ce jour. Il est probable cependant que prochainement, la recherche de plusieurs polymorphismes présents dans un ou plusieurs gènes soit effectuée en parallèle de la mise en évidence de l'agent infectieux causal. Cette carte polymorphique pourra alors par exemple établir un profil de résistance ou de sensibilité à tel ou tel agent infectieux permettant ainsi d'adapter la prévention (vaccination par exemple) ou d'établir le meilleur traitement (domaine de la pharmacogénétique). Le Tableau 5 donne de manière simplifiée quelques exemples.

L'évolution de la biologie moléculaire

Les appareils

Sur le plan technique et technologique, la biologie moléculaire est en constante évolution et de nouveaux appareils plus rapides, plus compacts sont commercialisés [18,34]. Il est donc impossible d'être exhaustif sur ce sujet et nous n'aborderons que quelques points généraux. Nous avons déjà évoqué dans les paragraphes précédents certaines évolutions concernant la rapidité des thermocycleurs ou l'évolution des techniques de recherche d'acides nucléiques (avec ou sans amplification de cible). Le regroupement des laboratoires en pôles, la centralisation sur certains hôpitaux ou laboratoires privés de certaines recherches sont en cours. Le développement d'automates/robots de plus en plus performants est aussi en cours (Tableau 6). Pour accélérer la recherche d'agents pathogènes, outre le développement de techniques de recherche et

Tableau 5 Exemples de polymorphismes génétiques liés à la réponse aux infections (Certains des polymorphismes décrits sont le résultat d'études à faible effectif et attendent donc confirmation d'études à plus grande échelle. Ce tableau est donc donné à titre informatif et à interpréter avec prudence [42])

Gènes contenant des polymorphismes d'intérêt	Rôle schématique des gènes	Agent infectieux ou états infectieux associés à certains polymorphismes
Polymorphisme au rôle potentiellement délétère		
Polymorphismes modifiant la reconnaissance de l'agent pathogène		
Les récepteurs TLRs (<i>Toll-like receptors</i>)	Rôle dans l'immunité non spécifique (innée) Présents à la surface des monocytes-macrophages, des polynucléaires et des cellules dendritiques, récepteurs reconnaissant la surface d'agents bactériens et participant à l'initiation de la réponse inflammatoire	
TLR2, 4 et 5 • TLR2 (cf R753Q)	Récepteur pour les bactéries Gram (+), les mycobactéries et les levures	Association à un sepsis sévère • Blocage de la réponse aux lipoprotéines bactériennes et à certaines bactéries Gram + (cf <i>staphylococcus</i> sp)
• TLR4	Récepteur pour les liposaccharides (LPS) des bactéries Gram (-)	• Infections post-opératoires à Gram (-) • Protection contre la légionellose • Risque de survenue de méningococcémies • Risque de bronchiolite sévère à virus respiratoire syncytial (VRS)
• TLR5 CD14	Récepteur pour les flagellines des bactéries Rôle dans l'immunité non spécifique Situé sur la membrane des macrophages ou sous forme soluble, co-récepteur des TLRs pour les bacilles gram (+) et (-)	• Légionellose grave Augmentation de la morbidité et la mortalité au cours de sepsis sévères (Allèle -159TT)
MBL (<i>mannose binding lectin</i>)	Protéine soluble de la phase aigüe de l'inflammation reconnaissant les sucres à la surface de certaines bactéries, virus et parasites et activant le complément (voie des lectines)	Risque d'infection grave quel que soit l'agent pathogène notamment chez les sujets immunodéprimés
Collectines du surfactant (SP-A et SP-D) Récepteur FcγIIA (ou CD32)	Rôle de défense (immunité non spécifique) dans les alvéoles pulmonaires Récepteur à la surface des macrophages et polynucléaires activant la phagocytose après fixation de l'IgG2a, immunoglobuline opsonisant les bactéries encapsulées	Risque de développer une bronchiolite à VRS Risque de pneumopathie sous ventilation mécanique Risque de développer une pneumonie à pneumocoques Risque de développer une méningococcémie
Polymorphismes affectant la réponse à l'infection		
TNFα	Cytokine pro-inflammatoire - rôle central dans le choc septique	Risque de choc septique grave Risque de surmortalité chez les prématurés sous ventilation mécanique
Interleukine 1 (IL-1)	Cytokines pro-inflammatoires (1α, 1β, 1ra)	Surmortalité dans les chocs septiques et les méningococcémies
Interleukine 4 (IL-4)	Cytokine pro-inflammatoire jouant un rôle dans la stimulation et la différenciation des lymphocytes T helper 2 (Th2)	Risque de survenue d'une bronchiolite
Interleukine 6 (IL-6)	Cytokine pro-inflammatoire	Risque de sépticémie en période néonatale en cas d'infection à cocci gram (+)
Interleukine 10 (IL-10)	Cytokine pro-inflammatoire	• Risque de bronchiolite sévère • Etats septiques sévères
IRAK (<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>) Caspase 12	Kinase intracellulaire induisant NK-κB et participant à la réaction inflammatoire Protéase, inhibiteur de la réponse inflammatoire	Infections graves à cocci gram (+) et (-), à champignons et infections opportunistes Risque de sepsis plus sévère
Polymorphismes des voies de la coagulation		
PAI-1 (<i>plasminogen activator inhibitor</i>)	Régulation de la fibrinolyse	Méningococcémie sévère
Polymorphisme au rôle potentiellement protecteur		
CCR5	Chimiokine, récepteur membranaire présent sur les lymphocytes CD4 participant à la fixation du VIH sur sa cible	Rôle protecteur du polymorphisme D32 (CCR5D32) empêchant/limitant la fixation du virus VIH sur le lymphocyte T CD4
CC3L1	Chimiokine, ligand de CCR5	Passage au stade sida plus tardif Nombre de duplications segmentaires variables (nombre de copies du gène variable) Un nombre bas de copies est associé à une évolution de la maladie plus rapide

Tableau 6 Exemples de sociétés impliquées dans la commercialisation de systèmes de biologie moléculaire pour l'infectiologie (par ordre alphabétique) - Non exhaustif

Compagnie	Site internet
Advandx	www.advandx.com
Affigene	www.affigene.com
Affymetrix	www.affymetrix.com
Applied Biosystems	www.appliedbiosystems.com
BAG (BiologischeAnalysensystemGmbH)	www.bag-germany.com/einfekt.cgi
Bayer Diagnostics	www.bayerdiag.com
Beckton Dickinson	www.bdeurope.com
Biocentric	www.biocentric.com
BioMérieux	www.biomerieux.com
Biotage	www.biotagebio.com
Bruker	www.bdal.com
Celera	www.celeradiagnostics.com
Cepheid	www.cepheid.com
Chiron Corporation	www.chiron.com
CliniSciences	www.clinisciences.com
Digene	www.digene.fr
Enigma diagnostics	www.enigmadiagnostics.com
GeneOhm Sciences	www.geneohm.com
Gen-Probe	www.gen-probe.com
Idaho Technologies	www.idahotech.com
InnoGenetics	www.innogenetics.com
LightUp Technologies	www.lightup.se
Iquum	www.iquum.com
Luminex	www.luminexcorp.com
Nanogen	www.nanogen.com
Nanosphere	www.nanosphere-inc.com/
Qiagen	www.artus-biotech2.de www1.qiagen.com
Ribo Technologies	www.microscreen.com
Roche Molecular Diagnostics	www.roche-diagnostics.com
Smiths	trace.smithsdetection.com
Third Wave Technologies	www.twt.com

détection des acides nucléiques, de véritables plates-formes permettant d'analyser plusieurs échantillons en parallèle sont à l'étude. Ces appareils sont réservés aux grandes séries. Néanmoins, dans le contexte d'épidémies, on peut imaginer que celles-ci pourraient être utiles dans un contexte d'urgence. Certaines machines permettent ainsi l'analyse de 384 échantillons en parallèle par PCR en temps réel et donnent un résultat en 35 minutes [55]. D'autres systèmes permettent l'analyse par PCR multiplex. D'autres systèmes miniaturisés permettent l'analyse de 1536 échantillons (20 nl à 10 µl distribués par un robot en moins de deux minutes). Bien que ces systèmes n'aient pas encore été utilisés pour les recherches d'agents pathogènes, on peut s'attendre à un développement proche [18]. Par ailleurs, le développement de la portabilité des thermocycleurs laissent penser que la biologie moléculaire sera réalisable non seulement en milieu hospitalier ou en laboratoire privé mais aussi en milieu éloigné comme par exemple, la brousse.

La miniaturisation

La miniaturisation des automates progresse grâce aux nanotechnologies [18]. La littérature décrit régulièrement de

véritables laboratoires sur puces (« *lab-on-a-chip* ») non commercialisés pour le moment. Par exemple, l'utilisation de particules d'or ou de nanopores dans l'approche diagnostique a été décrite [28,48].

La limite de détection

À ce jour, on a pu démontrer qu'il était possible de détecter 5-10 pg d'ADN, ce qui représente le contenu d'une seule cellule et 2 pg d'ARN équivalent au contenu en ARNm de 20 cellules. Certains auteurs ont pu détecter des concentrations zeptomolaires d'ADN (10^{-21} mole) [58]. La limite de détection s'abaisse donc considérablement et la possibilité de détecter moins de 1 ng d'ADN sera probablement une réalité dans un avenir proche [18].

Conclusion

En 2007, la biologie moléculaire en pratique quotidienne de microbiologie générale présente un intérêt restreint à certaines indications, les autres indications étant réservées aux laboratoires spécialisés (hôpitaux universitaires ou centres de recherche) (Fig. 3a et b). Ces derniers jouent un rôle primordial plus particulièrement et idéalement dans

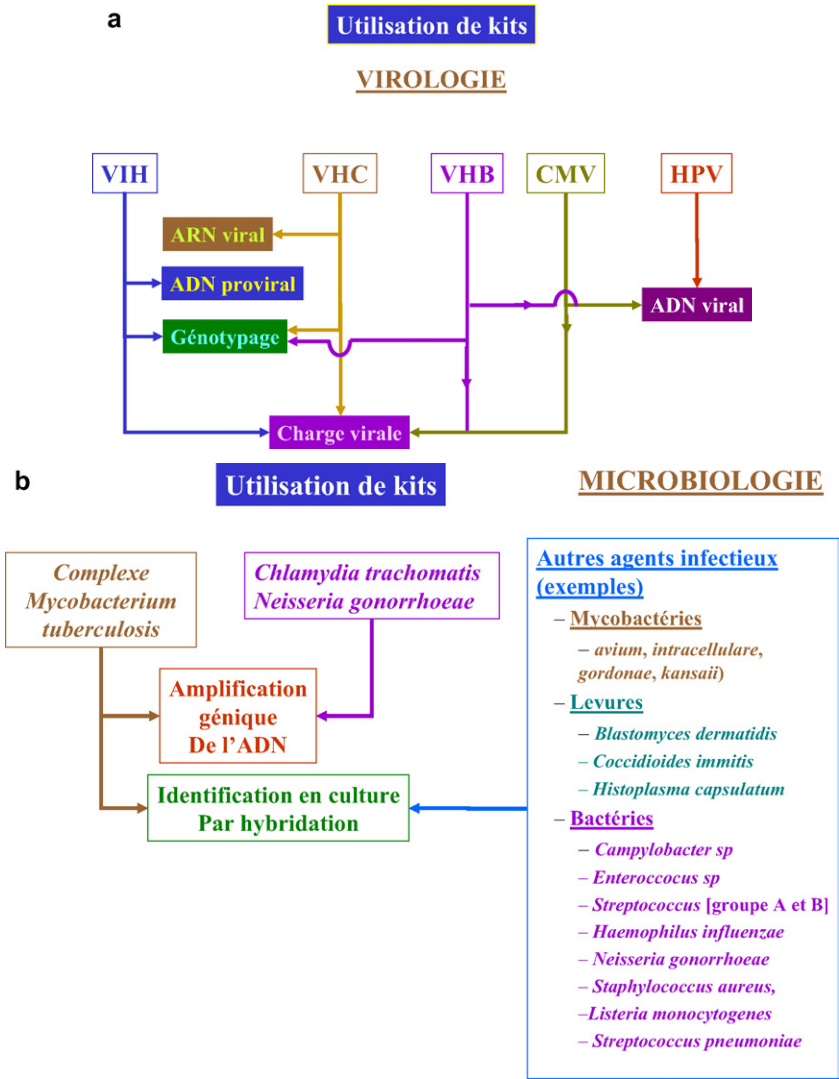


Figure 3 Principaux agents infectieux actuellement recherchés en biologie moléculaire et pour lesquels des kits sont disponibles en France. 3a. Principaux virus. 3b. Principales bactéries et champignons.

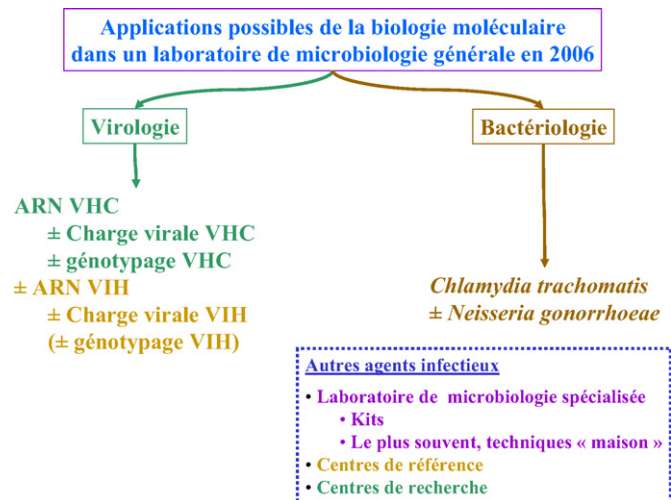


Figure 4 Agents infectieux et laboratoire de microbiologie générale.

le cadre de réseaux en association avec les organismes internationaux (OMS avec par exemple, les réseaux GOARN, *global outbreak alert and response network*, GPHIN, *global public health intelligence network*) afin de surveiller, détecter, isoler, diagnostiquer et prévenir l'apparition de nouveaux agents pathogènes dans le cadre des maladies émergentes (virus du SRAS par exemple) [29]. La Fig. 4 résume les principales indications en microbiologie générale, l'étude du virus de l'hépatite C et la recherche des chlamydiaes représentant les indications les plus courantes et les plus utiles dans les laboratoires de microbiologie générale.

Références

- [1] Anaes - Haute Autorité de santé. Conférence de consensus sur le traitement de l'hépatite C (www.anaes.fr). Février 2002.
- [2] Anaes - Haute Autorité de Santé. Évaluation du dépistage des infections urogénitales basses à *Chlamydia trachomatis* en France. Rapport; 2003.
- [3] Anaes - Haute Autorité de santé. Place des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des infections urogénitales basses à *Chlamydia trachomatis*. Rapport; 2003.
- [4] Anaes - Haute Autorité de santé. Évaluation de l'intérêt de la recherche des papillomavirus humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus. Rapport Anaes; 2004.
- [5] Bäumner AJ, Jones C, Wong CY, Price AA generic sandwich-type biosensor with nanomolar detection limits. *Anal Bioanal Chem* 2004;378:1587-93.
- [6] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* 2002;55:244-65.
- [7] Bretagne S, Costa JM. Towards a molecular diagnosis of invasive aspergillosis and disseminated candidosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45:361-8.
- [8] Bretagne S, Costa JM. Towards a nucleic acid-based diagnosis in clinical parasitology and mycology. *Clin Chim Acta* 2006; 363:221-8.
- [9] Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ, Berkhof J, Verheijen RH. HPV testing in cervical screening. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2006;20:253-66.
- [10] CDC (Center for Disease Control). Screening tests to detect *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections - 2002. *Mor Mortal Wkly Rep* 2002;51:1-38.
- [11] Chang J, Naif HM, Li S, Sullivan JS, Randle CM, Cunningham AL. Twin studies demonstrate a host cell genetic effect on productive human immunodeficiency virus infection of human monocytes and macrophages in vitro. *J Virol* 1996;70: 7792-803.
- [12] Che D. Le point sur la tuberculose. *Bull Epidemiol Hebd* 2005; 17-18:65-84.
- [13] Cheng VC, Yam WC, Hung IF, Woo PC, Lau SK, Tang BS, et al. Clinical evaluation of the polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculosis. *J Clin Pathol* 2004;57:281-5.
- [14] Cheng VC, Yew WW, Yuen KY. Molecular diagnostics in tuberculosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005;24:711-20.
- [15] Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al., IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet* 2005;366:991-8.
- [16] Cook RL, Hutchison SL, Ostergaard L, Braithwaite RS, Ness RB. Systematic review: noninvasive testing for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Ann Intern Med* 2005;142: 914-25.
- [17] Costa JM, Botterel F, Bretagne S. A-t-on besoin de la biologie moléculaire en mycologie hospitalière ? *Med Mal Inf* 2005;35: 554-5.
- [18] Csako G. Present and future of rapid and/or high-throughput methods for nucleic acid testing. *Clin Chim Acta* 2006;363:6-31.
- [19] Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer* 2006;119:1095-101.
- [20] Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer* 2003;106:396-403.
- [21] Delfraissy JF et al. La prise en charge thérapeutique des personnes infectées par le VIH. Rapport 2004 (www.sante.gouv).
- [22] Diemert DJ, Libman MD, Lebel P. Confirmation by 16S rRNA PCR of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for diagnosis of *Neisseria gonorrhoeae* infection in a low-prevalence population. *J Clin Microbiol* 2002;40:4056-9.
- [23] Domiati-Saad R, Scheuermann RH. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clin Chim Acta* 2006;363: 197-205.
- [24] 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.
- [25] Fernstrom MC, Dahlgren L, Ranby M, Forsgren A, Petrini B. Increased sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* Cobas Amplicor PCR following brief incubation of tissue samples on Lowenstein-Jensen substrate. *APMIS* 2003;111:1114-6.
- [26] Fieschi C. Susceptibilité mendélienne aux infections mycobactériennes: défauts de l'axe IL-12/IFN γ . *Presse Med* 2006;35: 879-86.
- [27] Flores-Munguia R, Siegel E, Klimecki WT, Giuliano AR. Performance assessment of eight high-throughput PCR assays for viral load quantitation of oncogenic HPV types. *J Mol Diagn* 2004;6:115-24.
- [28] Fologea D, Gershow M, Ledden B, McNabb DS, Golovchenko JA, Li J. Detecting single stranded DNA with a solid state nanopore. *Nano Lett* 2005;5:1905-9.
- [29] Formenty P, Roth C, Gonzalez-Martin F, Grein T, Ryan M, Drury P, et al. Emergent pathogens, international surveillance and international health regulations (2005). *Med Mal Infect* 2006; 36:9-15.
- [30] Fukushima M, Kakinuma K, Hayashi H, Nagai H, Ito K, Kawaguchi R. Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol* 2003;41:2605-15.
- [31] Grisold AJ, Leitner E, Muhlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2392-7.
- [32] Hamdad F, Orfila J, Boulanger JC, Eb F. *Chlamydia trachomatis* urogenital infections in women. Best diagnostic approaches. *Gynecol Obstet Fertil* 2004;32:1064-74.
- [33] Herida M, Michel A, Goulet V, Janier M, Sednaoui P, Dupin N, et al. Epidemiology of sexually transmitted infections in France. *Med Mal Infect* 2005;35:281-9.
- [34] Holland CA, Kiechle FL. Point-of-care molecular diagnostic systems -past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8:504-9.
- [35] Hope WW, Walsh TJ, Denning DW. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *Lancet Infect Dis* 2005;5:609-22.
- [36] Institut de Veille Sanitaire (INVS). Surveillance du VIH/sida en France. Rapport numéro 2 (Données au 31 mars 2004). 2005.

- [37] Joram N, Lopez E, Texereau J, Mira JP. Polymorphismes génétiques et infections. *Med Mal Inf* 2006;36:314-21.
- [38] Kellam P, Weiss RA. Infectogenomics: insights from the host genome into infectious diseases. *Cell* 2006;124:695-7.
- [39] Lazzarotto T, Gabrielli L, Lanari M, Guerra B, Bellucci T, Sassi M, et al. Congenital cytomegalovirus infection: recent advances in the diagnosis of maternal infection. *Hum Immunol* 2004;65:410-5.
- [40] Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara JP, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. *J Clin Microbiol* 2006;44:693-9.
- [41] Lim DV, Simpson JM, Kearns EA, Kramer MF. Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare. *Clin Microbiol Rev* 2005;18:583-607.
- [42] Lin HJ, Pedneault L, Hollinger FB. Intra-assay performance characteristics of five assays for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998;36:835-9.
- [43] Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet* 2002;360:228-9.
- [44] Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *J Clin Invest* 2006;116:1167-73.
- [45] Luna VA, King D, Davis C, Rycerz T, Ewert M, Cannons A, et al. Novel sample preparation method for safe and rapid detection of *Bacillus anthracis* spores in environmental powders and nasal swabs. *J Clin Microbiol* 2003;41:1252-5.
- [46] Marina O, Castro A. Applications of single-molecule detection to the analysis of pathogenic DNA. *Curr Pharm Biotechnol* 2004;5:279-84.
- [47] Martinez V, Gicquel B. Techniques diagnostiques de la tuberculose et des autres mycobactérioses. *Arch Pediatr* 2005;12 (Suppl 2):S96-S101.
- [48] Meller A, Nivon L, Brandin E, Golovchenko J, Branton D. Rapid nanopore discrimination between single polynucleotide molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:1079-84.
- [49] Miller N, Cleary T, Kraus G, Young AK, Spruill G, Hnatyszyn HJ. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:4143-7.
- [50] Miller WC, Ford CA, Morris M, Handcock MS, Schmitz JL, Hobbs MM, et al. Prevalence of chlamydial and gonococcal infections among young adults in the United States. *JAMA* 2004;291:2229-36.
- [51] Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Andrew Thompson RC. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends Parasitol* 2005;21:340-6.
- [52] Monis PT, Giglio S. Nucleic acid amplification-based techniques for pathogen detection and identification. *Infect Genet Evol* 2006;6:2-12.
- [53] Monson J. Évaluation de l'intérêt de la recherche des papillomavirus humains (HPV) dans le dépistage des lésions précancéreuses et cancéreuses du col de l'utérus (mai 2004). *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:357-60.
- [54] Moody A. Rapid diagnostic tests for malaria parasites. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:66-78.
- [55] Moore P. PCR: replicating success. *Nature* 2005;435:235-8.
- [56] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al., International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
- [57] Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:103-10.
- [58] Nam JM, Stoeva SI, Mirkin CA. Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity. *J Am Chem Soc* 2004;126:5932-3.
- [59] Nolte FS, Boysza J, Thurmond C, Clark WS, Lennox JL. Clinical comparison of an enhanced-sensitivity branched-DNA assay and reverse transcription-PCR for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998;36:716-20.
- [60] Olshen E, Shrier LA. Diagnostic tests for chlamydial and gonorrheal infections. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005;16:192-8.
- [61] Pai M, Flores LL, Pai N, Hubbard A, Riley LW, Colford Jr. JM. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:633-43.
- [62] Patel K, Muir AJ, McHutchison JG. Diagnosis and treatment of chronic hepatitis C infection. *BMJ* 2006;332:1013-7.
- [63] Patterson TF. Advances and challenges in management of invasive mycoses. *Lancet* 2005;366:1013-25.
- [64] Pol S. Histoire naturelle de l'infection par le virus de l'hépatite B. *Presse Med* 2006;35:308-16.
- [65] Robert J, Veziris N, Truffot-Pernot C, Grigorescu C, Jarlier V. La tuberculose multirésistante en France : surveillance et prise en charge, 1992-2002. *Bull Epidemiol Hebd* 2005;17-18: 78-80.
- [66] Rougemont M, Van Saanen M, Sahli R, Hinrikson HP, Bille J, Jaton K. Detection of four *Plasmodium* species in blood from humans by 18S rRNA gene subunit-based and species-specific real-time PCR assays. *J Clin Microbiol* 2004;42:5636-43.
- [67] Segondy M, Izopet J, Pellegrin I, Montes B, Dumon B, Pasquier C, et al. Comparison of the QUANTIPLEX HIV-1 RNA 2.0 assay with the AMPLICOR HIV-1 MONITOR 1.0 assay for quantitation of levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma of patients receiving stavudine-didanosine combination therapy. *J Clin Microbiol* 1998;36:3392-5.
- [68] Stetzenbach LD, Buttner MP, Cruz P. Detection and enumeration of airborne biocontaminants. *Curr Opin Biotechnol* 2004; 15:170-4.
- [69] Stoler MH. Human papillomavirus biology and cervical neoplasia: implications for diagnostic criteria and testing. *Arch Pathol Lab Med* 2003;127:935-9.
- [70] Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:170-6.
- [71] Watzinger F, Ebner K, Lion T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR. *Mol Aspects Med* 2006;27: 254-98.
- [72] White PL, Archer AE, Barnes RA. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. *J Clin Microbiol* 2005;43:2181-7.
- [73] Woodford N, Sundsfjord A. Molecular detection of antibiotic resistance: when and where? *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:259-61.
- [74] Yang S, Lin S, Khalil A, Gaydos C, Nuemberger E, Juan G, et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:3221-6.
- [75] Yuen KY, Chan KS, Chan CM, Ho PL, Ng MH. Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction assay. *J Infect* 1997;34:29-33.
- [76] Zarski JP. Épidémiologie de l'hépatite chronique B. *Presse Med* 2006;35:304-7.
- [77] Zoulim F. Nouveaux tests virologiques et leurs applications dans la prise en charge de l'hépatite B chronique. *Presse Med* 2006;35:317-26.