



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.

DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE EN PATHOLOGIE INFECTIEUSE : INTÉRÊT D'UN DIAGNOSTIC MULTIPLEX DANS LES PNEUMOPATHIES ATYPIQUES

Daniel Garin ^{a,*}, Benoît Cuillerier ^b, Jean-Noël Dauendorffer ^c, Jean-Marc Crance ^a, Bruno Lina ^d, Alain Lozniewski ^e, Emmanuel Da Conceição ^a, Benoît Jaulhac ^f, Dominique André DeBriel ^b

Résumé

Parmi les pathogènes responsables de pneumopathies atypiques, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, et *Legionella pneumophila* sont trois bactéries fréquentes pour lesquelles un diagnostic étiologique rapide est difficile à obtenir. L'amplification génique in vitro offre une possibilité de rendu de résultats dans la journée, mais souvent au détriment d'un temps de réalisation important du fait du manque d'automatisation. Cet inconvénient est réduit en cas d'utilisation de techniques d'amplification génique multiplex, dont un exemple de réalisation est présenté dans cet article.

Diagnostic - PCR multiplex - *Chlamydia* - *Legionella* - *Mycoplasma*.

Summary

Among frequent potential respiratory pathogens, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila* are difficult to isolate with usual laboratory techniques (culture, serologic tests). Adapted molecular biology tools are able to amplify a specific genomic target and allow the diagnosis the same day, but with a very time consuming process. The proposed technique allows the diagnosis of the three bacteria in a few hours time using a multiplex single-tube polymerase chain reaction.

Diagnosis - multiplex PCR - *Chlamydia* - *Legionella* - *Mycoplasma*.

^a Centre de recherches du Service de Santé des Armées - Unité de virologie (Dr Jouan)

24, av. des Maquis-du-Grésivaudan - B.P. 87 - 38702 La Tronche cedex

^b Service de microbiologie - Hôpital Pasteur

39, av. de la Liberté - 68024 Colmar cedex

^c Service de bactériologie (Dr Weber) - Hôpital central

Av. de Lattre-de-Tassigny - 54000 Nancy

^d Laboratoire de virologie (Pr Aymard) - Université Claude-Bernard

8, av. Rockefeller - 69373 Lyon cedex

^e Service d'anesthésie réanimation (Pr Pitti) - H.I.A. Legouest

27, av. Plantières - B.P. 57998 Metz Armées

^f Institut de bactériologie de la Faculté de médecine

Université Louis-Pasteur et Hôpitaux Universitaires

3, rue Koeberlé - 67000 Strasbourg.

* Correspondance

article reçu le 8 mars, accepté le 15 juin 1999.

© Elsevier, Paris.

1. Introduction

Le diagnostic étiologique d'une pneumopathie est peu performant : il reste inconnu, même en milieu hospitalier, dans 25 à 50 % des cas [26]. Les difficultés sont multiples. Pour le praticien, il s'agit de décider la réalisation d'examens endoscopiques invasifs, seuls capables de fournir au laboratoire des spécimens valides, mais pouvant mettre en danger l'équilibre respiratoire précaire du patient. Pour le biologiste, il est nécessaire de différencier les agents potentiellement pathogènes d'une contamination par la flore commensale aérodigestive, de prendre en compte un possible portage asymptomatique rendant parfois nécessaire le rendu d'un résultat quantitatif soumis à interprétation et d'analyser la présence simultanée de plusieurs germes. Si certaines bactéries, comme *Streptococcus pneumoniae* et *Haemophilus influenzae*, sont faciles à cultiver et isolées dans près de la moitié des pneumopathies lobaires aiguës communautaires dont l'étiologie est déterminée, un tableau radiologique moins systématisé, l'absence de polynucléose et d'expectorations purulentes, de syndrome inflammatoire biologique, de réponse à un traitement aux β -lactamines, peuvent orienter vers une « pneumopathie atypique ». C'est un concept avant tout microbiologique : les pathogènes atypiques, dont la liste s'allonge régulièrement (tableau I) au fur et à mesure des progrès du diagnostic microbiologique, sont en fait la cause la plus fréquente des atteintes infectieuses pulmonaires [28]. De ce tableau émergent trois bactéries en terme de fréquence relative : *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* et *Legionella pneumophila*, qui nécessitent des conditions de culture plus difficiles à mettre en œuvre, et le plus souvent peu performantes in vitro. L'ensemble de ces difficultés nous a incités à développer une amplification génique multiplex in vitro pour ces trois pathogènes pulmonaires, pour lesquels un résultat sensible et spécifique doit être donné rapidement (sous 24 heures), directement à partir du spécimen clinique et indépendamment de la flore respiratoire.

2. Matériel et méthodes

2.1. PCR

La PCR multiplex mise au point permet la détection simultanée dans un seul tube des trois pathogènes respiratoires suivants :

- *C. pneumoniae* (PCR nichée)
- *M. pneumoniae* (PCR semi-nichée)
- *L. pneumophila* (PCR nichée)

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir de 500 μ l de spécimen en présence de 100 μ l de tampon de lyse. Ce tampon de lyse hypertonique associe du TRIS (10 mM), un détergent (Triton X-100 0,1 %), la protéinase K (100 μ g par ml) et de l'eau ultra pure. Le cycle de lyse

Tableau 1 / Liste des principaux pathogènes atypiques responsables de pneumopathies [d'après 27].

Agents pathogènes	Aspects épidémiologiques
Bactéries	
<i>Legionella pneumophila</i>	Epidémique
Autres espèces de <i>Legionella</i>	Rare
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Fréquent
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Fréquent
<i>Chlamydia psittaci</i>	Rare, zoonose
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Rare, enfants
<i>Coxiella burnetii</i>	Rare, zoonose
Virus	
<i>Myxovirus influenzae A et B</i>	Epidémique
<i>Adenovirus 3, 4 et 7</i>	Fréquent
<i>Myxovirus parainfluenza virus</i>	Fréquent
Virus respiratoire syncytial	Fréquent
<i>Rhinovirus</i>	Rare
<i>Enterovirus</i>	Rare
<i>Coronavirus</i>	Rare
<i>Herpesvirus</i>	Rare
<i>Hantavirus</i>	Exceptionnel

est réalisé dans le thermocycleur avec un programme comprenant 30 min à 56 °C et 10 min à 95 °C.

Les deux amplifications successives sont réalisées en présence de Taq polymérase® (1,25 UI par tube), de 200 µm de dNTP, de 2 mM de MgCl₂ et d'un mélange de 6 amorces. La première amplification consiste en 45 cycles (95 °C, 55 °C, et 72 °C; 30 secondes à chaque température). La PCR nichée est faite à partir de 1 µl du produit de première amplification avec 30 cycles (95 °C, 55 °C, et 72 °C; 30 secondes à chaque température).

Pour *C. pneumoniae*, la première amplification est effectuée sur une partie du gène *Omp A* codant pour une protéine de la membrane externe de *C. pneumoniae* et *C. psittaci* (segment amplifié de 303 paires de bases (pb) avec les amorces CP1 et CP2). La deuxième amplification est réalisée avec des amorces internes (CPC et CPD) sur un domaine de 207 pb du gène *Omp A* spécifique de *C. pneumoniae* [29].

Pour *M. pneumoniae*, les amorces utilisées (MPP11 et MPP12) amplifient un premier fragment de 466 pb du gène codant pour une protéine de 165 à 190 000 daltons, l'adhésine P1 [2]. La deuxième amplification d'un fragment de 193 pb est réalisée avec les amorces MPP12 et MP-1.

L. pneumophila est mise en évidence, dans un premier temps, par amplification d'un fragment de 649 pb du gène *mip* (LmipL920 et LmipR 1548), puis dans un deuxième temps, par amplification d'un fragment interne de 489 pb (LmipL997 et LmipR 1466) [21].

Il est réalisé pour chaque spécimen clinique un témoin d'inhibition en ajoutant à 5 µl de l'échantillon préalablement préparé, 5 µl du témoin positif contenant les trois bactéries cibles à une concentration 10 fois supérieure au seuil de sensibilité d'un extrait d'ADN de chaque pathogène (*M. pneumoniae* FH, *L. pneumophila* LP3, *C. pneumoniae* TWAR).

La révélation est faite par simple migration en gel d'agarose à 2 % en présence de bromure d'éthidium sous éclairage ultraviolet.

2.2. Nature des prélèvements

Les prélèvements cliniques ont été adressés au laboratoire par les services hospitaliers pour les liquides pleuraux, bronchio-alvéolaires et d'aspirations bronchiques. Ils ont fait systématiquement l'objet d'une culture bactériologique incluant l'utilisation de milieux BCYE pour la

recherche de *Legionella* pour tous les prélèvements d'origine respiratoire. Les frottis pharyngés étaient adressés par les médecins généralistes participant au groupe régional d'observation de la grippe. Ils ne faisaient pas l'objet de culture bactériologique, mais d'une recherche par technique immuno-enzymologique des virus de la grippe et des virus respiratoires syncytial et parainfluenzae.

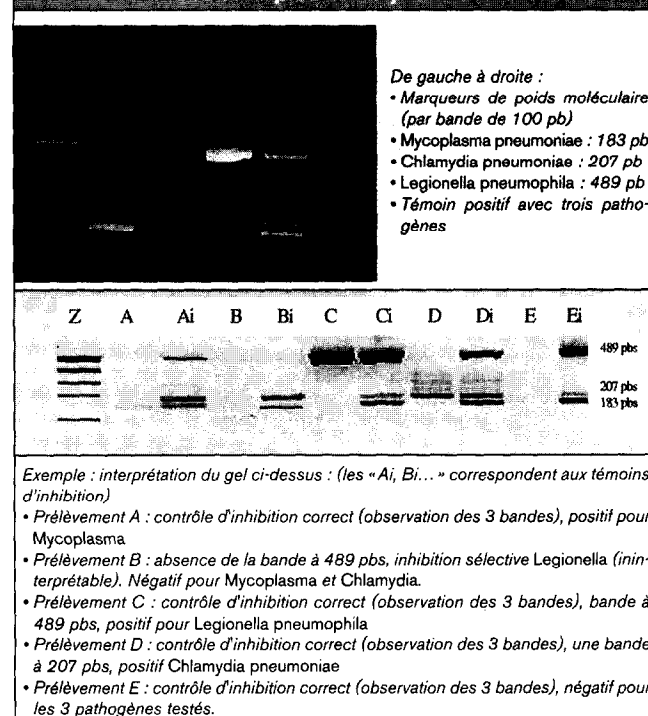
L'enquête sur la spécificité et les taux d'inhibition a porté sur tous les prélèvements reçus à l'Hôpital d'Instruction des Armées Legouest entre le 30 octobre 1997 et le 18 novembre 1998. A l'issue de cette période et dans le but d'augmenter le nombre de prélèvements positifs, une enquête prospective a été réalisée uniquement à partir de prélèvements pulmonaires dans les hôpitaux militaires parisiens, à Lyon, Nancy, Strasbourg et Colmar. Ces hôpitaux ont utilisé la PCR multiplex en complément de leurs techniques habituelles de détection de ces trois pathogènes.

3. Résultats

Un exemple de gel de la multiplex, ainsi que quelques exemples d'interprétation, sont montrés dans la figure 1. L'amplification est possible simultanément sur les trois bactéries recherchées, et leur identification est possible à la lecture directe du gel. Nous avons comparé les sensibilités de l'amplification multiplex par rapport à une amplification réalisée à l'aide de paires d'amorces d'un seul pathogène par les techniques décrites dans la littérature. Les pertes de sensibilité sont très faibles : de l'ordre de 1 log₁₀ pour *Mycoplasma* (sensibilité résultante de 10 cfu dans 500 µl), inférieur à 1 log₁₀ pour *Legionella* (sensibilité inférieure à dix bactéries présentes dans 500 µl). La sensibilité est équivalente pour *Chlamydia* (entre 5 et 10 corps élémentaires contenus dans 500 µl).

En terme de spécificité, la liste des pathogènes rencontrés dans des prélèvements respiratoires qui n'ont pas entraîné de faux positifs avec

Figure 1 / Résultats de l'amplification génique multiplex. Le deuxième gel, en négatif, donne des exemples d'interprétation.



la PCR multiplex est fournie dans le *tableau II*. Les taux d'inhibition de la PCR multiplex sont présentés dans le *tableau III*.

Dans notre expérience sur un total de 880 prélèvements, tous les malades détectés par les techniques conventionnelles des laboratoires ont été positifs avec la multiplex (Nombre de prélèvements positifs : *Legionella* 17 ; *Mycoplasma* 20 ; *Chlamydia* 2).

4. Discussion

La découverte de *Chlamydia pneumoniae* ne date que d'une quinzaine d'années, date à laquelle cette espèce fut distinguée de *Chlamydia psittaci* sous le nom de souche « TWAR » [10]. Les infections ne sont pas toujours symptomatiques et la totalité de la population est en contact au cours de sa vie avec cette bactérie. Mais elle peut entraîner rhinites, sinusites, pharyngites, otites, bronchites, et surtout pneumopathies à tout âge de la vie : enfants [12], jeunes adultes [20] et personnes âgées [30]. Elle peut se comporter en pathogène opportuniste chez des patients porteurs du virus VIH [32] et être responsable d'infections nosocomiales [11]. Sa responsabilité a été mise en cause dans la formation des plaques d'athérome [6]. Les méthodes de diagnostic sont nombreuses (micro-immunofluorescence, culture cellulaire, sérologie IgM, IgG, IgA...) mais il n'existe pas de consensus sur une méthode de référence [31] car aucune n'est réellement satisfaisante pour des prélèvements cliniques. L'amplification génique in vitro reste une alternative récente très utilisée. Il existe plusieurs cibles potentielles dans le génome de *C. pneumoniae* pour la définition des amorces d'amplification. Les principales sont le gène *Omp A* codant la protéine de la membrane externe [4] que nous avons utilisé et le gène 16S ADNr codant l'ARN ribosomal [9]. Certaines techniques permettent de distinguer les différentes espèces de *Chlamydia* [29, 33]. L'absence de méthode de référence rend difficile l'évaluation de la spécificité et de la sensibilité de ces différentes techniques d'amplification. Un portage asymptomatique nasopharyngé de *C. pneumoniae* détecté par amplification génique a été clairement démontré [15], mais la spécificité d'un prélèvement positif réalisé chez un patient souffrant d'une pneumopathie reste bonne. La détection de *C. pneumoniae* par amplification génique in vitro est parfois décrite comme plus sensible dans des prélèvements d'origine pharyngée [31].

M. pneumoniae est responsable de pharyngites, de bronchites et de pneumopathies [5]. Son diagnostic est actuellement sérologique [16], sa culture sur milieux spéciaux (par exemple milieu de Hayflick) est lente et difficile. L'amplification génique in vitro est considérée comme une technique diagnostique alternative efficace [1]. Plusieurs cibles sont utilisées : le gène de la protéine d'adhésion P1, adhésine permettant à *M. pneumoniae* d'adhérer à de nombreux supports tels que le verre, les globules rouges et les cellules d'épithélium trachéal. [2, 3], et le gène 16S ADNr codant l'ARN ribosomal [19]. La combinaison d'une technique d'amplification génique et d'une détection sérologique permet un diagnostic exhaustif [7].

Mille trois cent soixante cas de maladie des légionnaires ont été notifiés à l'OMS en Europe en 1997. Le taux de létalité varie de moins de 10% à 30%, 29% des cas sont d'origine communautaire, la proportion des cas d'origine nosocomiale et de ceux dus aux voyages était respectivement de 16% et 22% [24]. La description de certains gènes de *Legionella*, comme le gène *mip* pour « macrophage infectivity potentiator » [8] ou le gène codant pour le 5S ADNr [23] a rapidement permis la mise au point de techniques d'amplification génique en réponse à une culture lente et à un sérodiagnostic délicat du pathogène, que ce soit dans l'environnement hydrique [21] ou dans les spécimens cliniques [17, 22]. Les amorces *mip* ne permettent que l'amplification des différents sérotypes de *L. pneumophila*, à l'exclusion des autres espèces, les amorces définies sur le gène 5S ADNr autorisent un diagnostic plus large.

Les techniques d'extraction peuvent influencer les performances des tests [18]. La procédure d'extraction proposée a été comparée à la technique traditionnelle par phénol-chloroforme et s'est révélée plus sensible pour l'ensemble des pathogènes. L'utilisation de la protéinase K réduit les risques d'inhibition. Mais la pratique a montré que les différents laboratoires qui ont testé la multiplex ont souvent adopté la technique qu'ils maîtrisaient.

Tableau II / Liste des micro-organismes présents dans 708 prélèvements d'origine respiratoire n'ayant pas entraîné de difficultés d'interprétation de la multiplex (taux positifs et bandes non spécifiques).

<i>Aspergillus spp.</i>	<i>Staphylococcus capitis</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus chromogenes</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Streptococcus acidominus</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Streptococcus constellatus</i>
<i>Gemella haemolysans</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Gemella morbillorum</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Haemophilus arophilus</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Neisseria spp.</i>	<i>Virus Herpes simplex</i>
<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Myxovirus influenzae (A et B)</i>
<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Myxovirus parainfluenzae</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Virus respiratoire syncytial</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Tableau III / Pourcentage d'inhibition observé dans 769 échantillons cliniques

Type de prélèvements (nombre)	<i>Mycoplasma</i>	<i>Legionella</i>	<i>Chlamydia</i>	Commentaire
Liquides pleuraux (44)	27 %	0 %	0 %	Les inhibitions observées sont indépendantes de la présence de sang dans le prélèvement.
Liquides bronchio-alvéolaires (170)	14 %	14 %	13 %	Présence de sang dans 80 % des prélèvements inhibés.
Aspirations bronchiques (165)	7 %	6 %	5 %	Présence de sang dans 80 % des prélèvements inhibés.
Frottis pharyngés (329)	<1 %	0 %	<1 %	Les rares inhibitions sont observées sur les prélèvements contenant du sang sur les écouvillons.

Les techniques d'amplification génique sont rarement automatisées et donc très consommatrices en temps de travail, particulièrement pour les prélèvements pulmonaires dont les résultats sont attendus dans un délai le plus court possible pour permettre la prescription d'une antibiothérapie adaptée, ce qui nécessite de travailler rapidement sur un faible nombre d'échantillons. Les amplifications géniques dites « multiplex » permettent d'économiser une partie de ce temps de travail en réalisant la recherche de plusieurs pathogènes dans un même temps technique. Elles permettent aussi de réduire la quantité du volume de prélèvement nécessaire (intérêt en pédiatrie par exemple), voire de travailler à partir d'un seul écouvillon périphérique (pharyngé ou nasal) [27]. Ce type de technique est utilisable aussi bien pour des bactéries [14] que pour des virus [25], permettant parfois jusqu'à la détection de neuf micro-organismes [13]. Mais dans ce dernier cas, il devient difficile de mettre en œuvre l'ensemble des témoins positifs, et l'auteur ne propose pas de témoin d'inhibition. En effet, les prélèvements cliniques peuvent contenir des inhibiteurs de la Taq polymérase (au premier rang desquels figure l'hémoglobine), à l'origine de faux négatifs. Ces inhibiteurs peuvent être détectés par les témoins spécifiques, qui consistent à vérifier la présence d'une amplification dans un spécimen artificiellement contaminé avec l'ADN du pathogène cible. Si les résultats d'inhibition présentés n'ont pas tous un intérêt clinique (recherche de *L. pneumophila* dans les prélèvements pharyngés par exemple), ils mettent en évidence des inhibitions dépendant essentiellement du type de prélèvement, de chaque PCR et de la présence de sang dans le prélèvement. Cette observation justifie la présence d'un témoin d'inhibition propre à chaque pathogène et pour tout prélèvement. L'amplification concomitante d'une autre cible (β globine par exemple), n'est donc pas suffisante pour dénoncer une inhibition de l'amplification spécifique du pathogène recherché.

Les trois pathogènes ciblés sont responsables d'un tableau clinique univoque. Il est vrai que le contexte épidémiologique est parfois différent et permet une meilleure orientation du clinicien. Mais ce contexte n'est pas toujours connu en urgence, et la multiplex permet une simplification de la demande d'examen biologique du médecin à un coût de réalisation équivalant à celle d'une simple PCR :

le coût des amorces représente moins de 1 % du coût total d'une amplification génique.

5. Conclusion

Les techniques multiplex sont des alternatives diagnostiques efficaces vis-à-vis des pathogènes respiratoires. Les techniques d'extraction d'ADN récentes (type gel de silice) pourraient permettre de réduire le nombre de résultats ininterprétables du fait de la présence d'inhibiteurs de la Taq polymérase. Cette PCR multiplex devrait naturellement évoluer vers une deuxième génération utilisant une méthode d'amplification en une seule étape suivie d'une révélation par hybridation avec des sondes spécifiques (automatisable en microplaque), au lieu d'une PCR nichée. Une étude multicentrique est en cours pour préciser les qualités et potentiels de cette méthode. Des kits sont commercialisés depuis plusieurs années pour le diagnostic des mycobactéries et plus particulièrement du complexe *Mycobacterium tuberculosis*. L'intérêt que représente le diagnostic des « pneumopathies atypiques » d'origine bactérienne devrait entraîner rapidement la commercialisation de kits spécifiques.

Remerciements

Les auteurs remercient Nathalie Dorchain, Philippe Leroy et Corinne Rothlisberger pour leur aide technique sans lequel ce travail n'aurait pas été possible. Cette étude a fait l'objet d'un financement par la Mission pour le développement de l'innovation participative (DGA, ministère de la Défense, dossier 96030S).

Notes

La PCR multiplex décrite ci-dessus est protégée par le brevet 98 01998 déposé le 19 février 1998 par Daniel Garin, Nathalie Dorchain et Philippe Leroy au nom de l'État français représenté par le délégué général pour l'Armement. Le nom de Chlamylege multiplex® a été enregistré comme marque de fabrique à l'INPI de Grenoble le 20 janvier 1999 par Daniel Garin, Nathalie Dorchain et Philippe Leroy sous le N° 99/771157.

Le distributeur de Chlamylege multiplex® est la société Argene-Biosoft (site Web argenbiosoft.com).

Références

- [1] Abele-Horn M., Busch U., Nitschko H. et al., Molecular approaches to diagnosis of pulmonary diseases due to *M. pneumoniae*, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 548-551.
- [2] de Barbeyrac B., Bernet-Poggi C., Fébrer F. et al., Detection of *M. pneumoniae* and *M. genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction, *Clin. Infect. Dis.* 17 (1993) S83-9.
- [3] Bernet C., de Barbeyrac B., Bebear C. et al., Detection of human *M. pneumoniae* by using the polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.* 27 (1989) 2492-2496.
- [4] Campbell L.A., Perez Melgosa M., Hamilton D.J. et al., Detection of *C. pneumoniae* by polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 434-439.
- [5] Clyde W.A., Clinical overview of typical *M. pneumoniae* infections, *Clin. Infect. Dis.* 17 suppl. (1993) S32-37.
- [6] Davidson M., Kuo C.C., Middaugh J.P. et al., Confirmed previous infection with *C. pneumoniae* (TWAR) and its presence in early coronary atherosclerosis, *Circulation* (1998) 628-633.
- [7] Dorigo-Zetsma J.W., Zaat S.A.J., Wertheim van Dillen P.M.E. et al., Comparaison of PCR, culture, and serological tests for diagnoses of *M. pneumoniae* respiratory tract infection in children, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 14-17.
- [8] Engleberg N.C., Carter C., Weber D.R. et al., DNA sequence of MIP, a *L. pneumophila* gene associated with macrophage infectivity, *Infect. Immun.* 57 (1989) 1263-1470.
- [9] Gaydos C.A., Palmer L., Quinn T.C., Eiden J.J., Identification of *C. pneumoniae* by DNA amplification of the 16S rRNA gene, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 796-800.
- [10] Grayston J.T., Kuo C.C., Wang S.P., Altman J., A new *C. psittaci* strain, TWAR, isolated in acute respiratory tract infections, *N. Eng. J. Med.* 315 (1986) 161-168.
- [11] Grayston J.T., Diwan V.K., Cooney M., Wang S.P., Community and hospital acquired pneumonia associated with *Chlamydia* TWAR infection demonstrated serologically, *Arch. Intern. Med.* 149 (1989) 139-173.
- [12] Grayston J.T., *C. pneumoniae* (TWAR) infections in children, *Pediatr. Infect. Dis. J* 13 (1994) 375-684.
- [13] Gröndahl B., Fuppe W., Hoppe A. et al., Rapid identification of nine micro-organisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study, *J. Clin. Microbiol.* 37 (1999) 1-7.
- [14] Hendolin P.H., Markkanen A., Ylikoski J., Wahlfors J.J., Use of multiplex PCR for simultaneous detection of four bacterial species in middle ear effusions, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 2854-2858.
- [15] Hyman C.L., Roblin P.M., Gaydos C.A. et al., Prevalence of asymptomatic nasopharyngeal carriage of *C. pneumoniae* in subjectively healthy adults: assessment by polymerase chain reaction, enzyme immunoassay and culture, *Clin. Infect. Dis.* 20 (1995) 1174-1178.
- [16] Jacobs E., Serological diagnosis of *M. pneumoniae* infections: a critical review of current procedures, *Clin. Infect. Dis.* 17 suppl. (1993) S79-82.

- [17] Jaulhac B., Nowicki M., Bornstein N. et al., Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification, *J. Clin. Microbiol.* 30 (1992) 920-924.
- [18] Jaulhac B., Reyrolle M., Sodahlon Y.K. et al., Comparison of sample preparation methods for detection of *L. pneumophila* in culture-positive bronchoalveolar lavage fluids by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 2120-2122.
- [19] Kessler H.H., Dodge D.E., Pierer K. et al., Rapid detection of *M. pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridisation in a non-radioactive microwell plate format, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 1592-1594.
- [20] Kloemola M., Saikku P., Visakorpi R. et al., Epidemics of pneumonia caused by TWAR, a new *Chlamydia* organism, in military trainees in Finland, *J. Infect. Dis.* 157 (1988) 230-236.
- [21] Koide M., Saito A., Kusano N., Higa F., Detection of *Legionella* spp. in cooling tower water by the polymerase chain reaction method, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 1943-1946.
- [22] Koide M., Saito A., Diagnosis of *L. pneumophila* infection by polymerase chain reaction, *Clin. Infect. Dis.* 21 (1995) 199-201.
- [23] MacDonell M.T., Colwell R.R., The nucleotide sequence of 5S RNA from *L. pneumophila*, *Nucl. Acids Res.* 15 (1987) 1335.
- [24] OMS, Maladie des légionnaires en Europe, 1997, *Wkly Epidem. Rec.* 73 (1998) 257-261.
- [25] Osiowy C., Direct detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and adenovirus in clinical respiratory specimens by a multiplex reverse transcription-PCR assay, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 3149-3154.
- [26] Pachon J., Prados M.D., Capote F. et al., Severe community-acquired pneumonia. Etiology, prognosis and treatment, *Am. Rev. Respir. Dis.* 142 (1990) 369-373.
- [27] Ramirez J.A., Ahkee S., Tolentino A. et al., Diagnosis of *L. pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* or *L. pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single swab specimen, *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 24 (1996) 7-14.
- [28] Saikku P., Atypical respiratory pathogens, *Clin. Microbiol. Infect.* 3 (6) (1997) 599-604.
- [29] Tong C.Y.W., Sillis M., *C. psittaci* in sputum samples by PCR, *J. Clin. Pathol.* 46 (1993) 313-317.
- [30] Troy C.J., Peeling R.W., Ellis A.G. et al., *C. pneumoniae* as a new source of infectious outbreaks in nursing homes, *JAMA* 277 (1997) 1214-1218.
- [31] Verkooyen R.P., Willemsse D., Hiep S.C.A.M. et al., Evaluation of PCR, culture and serology for diagnosis of *C. pneumoniae* respiratory infections, *J. Clin. Microbiol.* 36 (1998) 2301-2307.
- [32] Visco Comandini U., Maggi P., Santopadre P. et al., *C. pneumoniae* respiratory infectious among patients infected with the human immunodeficiency virus, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16 (1997) 720-726.
- [33] Yoshida H., Kishi Y., Shiga S., Hagiwara T., Differentiation of *Chlamydia* species by combined use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Microbiol. Immunol.* 42 (1998) 411-414.