

# P.C.R. POLYMERASE CHAIN REACTION ou AMPLIFICATION PAR POLYMERISATION EN CHAÎNE

P.C.R.: Méthode rapide d'amplification d'une séquence déterminée d'A.D.N. à partir d'une matrice.

Elle permet d'obtenir plusieurs millions de copies identiques de cette séquence. Elle fut inventée par Kary B. MULLIS en 1985 (Entreprise Cetus en Californie). Il travaillait sur le diagnostic d'HbS chez des nouveaux-nés. La première publication date du 20/12/85 parut dans *Science*.

## 1. L'Histoire de la P.C.R.

- La P.C.R. d'après MULLIS.

*cf. poly doc.1*

Dans un épandeur mettre: ADN + Tampon Tris NaCl MgCl<sub>2</sub> + dNTP + PCO<sub>3</sub> - PCO<sub>4</sub> à 1μM = amorces = démarrage de la polymérisation.

Chauffage à 95°C pendant 5 min: l'ADN bicaténaire donne ici 2 ADN monocaténaires.

Centrifugation : tout l'ADN se retrouve au fond du tube.

Transfert à 30°C pendant 2 min : hybridation des amorces.

Ajout de la polymérase (toujours à 30°C) = Fragment de Klenow (c'est une partie de la PAL<sub>E</sub> d'E. Coli, sans activité exonucléasique 5' - 3' ).

Ce cycle est répété 19 fois.

Ils doivent, à chaque cycle, rajouter le fragment de Klenow car sa température optimale est de 30°C.

Ce cycle théorique a permis d'amplifier 200 000 fois le fragment étudié.

Amplification =  $2^{\text{nbr de cycle}}$  (  $\sim 10^6$  fois)

Aujourd'hui en 2h30 on obtient une matrice amplifiée 35 fois.

- Hoffman LaRoche et la Licence.

Le Brevet de la P.C.R. a été établi entre 1988 et 1989. il revient à 3 millions de dollars et un droit de propriété de 20 ans. MULLIS en récupère seulement 10 000 dollars.

En 2004 la Licence a rapporté:

redevance: 89 millions d'euros (pris de la Licence dans l'achat d'un appareil),

Réactions, kit, Enzymes: 675 millions d'euros.

*cf. poly. Doc. 2*

- 1993.

MULLIS reçoit le Prix Nobel.

## 2. La P.C.R. de nos jours.

La méthode de MULLIS a été perfectionnée.

La P.C.R. Permet maintenant d'amplifier des séquences allant de 10Kpb à 50 Kpb au maximum.

- Les composants.

- La matrice ADN:

Il faut obligatoirement un ADN double-brin ou ADNc. Cette matrice doit-être propre c'est-à-dire qu'elle ne doit pas contenir de substances chimiques susceptibles d'inhiber la polymérase (phénol, acétate, éthanol, EDTA, autrement dit les réactifs habituels des extractions d'ADN). La matrice doit y être en quantité suffisante, c'est-à-dire entre 10 et 100 brins d'ADN.

- Les amorces:

Elles doivent contenir entre 18 et 30 nucléotides avec 30 à 40% de G-C. Il doit s'agir de séquences complémentaires de l'ADN à amplifier de part et d'autre de la séquence. Leur T<sub>m</sub> doit être compris entre 55 et 65°C. Il faut que le T<sub>m</sub> des deux amorces soit proche et inférieur

de 5°C.

Hybridation :  $T^{\circ}\text{C} < 5^{\circ}\text{C}$  par rapport à la température moyenne des amorces pour être sûr que les deux amorces s'hybrident. Il ne faut pas de séquences complémentaires au sien des deux amorces. Elles doivent avoir leur 3'OH libre afin de permettre le démarrage de la polymérase.

- **La polymérase:**

cf. doc. 3

La première utilisée fut le Fragment de Klenow.

Maintenant on utilise des polymérases thermorésistantes qui peuvent travailler à hautes températures. Elles sont extraites d'ArcheBactéries extremophiles. En dehors (*de Pfr, Taq clonée,*) n'ont pas d'activité « proof reader » = activité exonucléasique 3' – 5'; il y a donc un plus grand taux d'erreurs lors de la Transcription.

Les enzymes ont besoin de tampons particuliers, en général on utilise du Tris pH 8 – 8,5. Elles ont aussi besoin de CoFacteurs comme le  $\text{Mg}^{2+}$  et également de cations comme le  $\text{NH}_4^{4+}$  et le  $\text{K}^+$  qui vont stabiliser l'ADN simple brin et les amorces.

Besoin de nucléotides.

- **Le thermocycleur:**

Il s'agit d'un appareil qui permet le chauffage et refroidissement rapidement. Maintenant il possède un couvercle chauffant ( $\sim 100^{\circ}\text{C}$ ) qui permet l'évaporation des réactifs.

Auparavant, on ajoutait de l'huile sur les épendorfs.

- **La procédure.**

cf. poly. doc. 4

Il y a trois étapes qui sont répétées.

- **La dénaturation:**

On sépare les deux brins d'ADN par rupture des ponts hydrogènes grâce à un chauffage d'  $\sim 94^{\circ}\text{C}$ . La première dénaturation est généralement plus longue pour assurer une bonne séparation de la matrice ADN et éventuellement des amorces.

- **Hybridation des amorces:**

On diminue la température du mélange réactionnel. Cette température est fondamentale pour rendre la fixation spécifique.

- **Élongation:**

Température  $\sim 72^{\circ}\text{C}$ , à une vitesse d' $\sim 1\text{Kpb}/\text{min}$ .

Au bout de 30 cycles il y a 100% de séquences spécifiques dans le milieu réactionnel.

La dernière élongation est plus longue pour assurer que toute la matrice ADN est bien copiée.

- **La P.C.R. au laboratoire.**

Il est nécessaire de prendre des précautions au laboratoire car la P.C.R. est une méthode très sensible. Il faut éviter la contamination par des ADN étrangers. Donc dans beaucoup de laboratoires on organise différentes salles pour faire la P.C.R.:

1 salle pour extraire l'ADN,

1 salle pour faire le mélange réactionnel,

1 salle pour faire l'amplification.

A chaque salle est dédiée un matériel spécifique qui doit être stérile, sans oublier les gants.

Comme on travaille avec des petits volumes, il est nécessaire de bien agiter après ajout de chacun des réactifs.

Pour valider la P.C.R. et contrôler le bloc où l'on fait la manipulation, il est nécessaire de faire un contrôle négatif (tout sauf l'ADN remplacer par de l' $\text{H}_2\text{O}$ ).

### **3. La P.C.R. Et ses applications.**

Depuis 1985, beaucoup de méthodes de P.C.R. ont vu le jour.

- **Principales évolutions.**

- **RT-PCR:**

« Reverse Transcriptase PCR ». Elle permet d'amplifier indirectement des ARN. Ici la PCR est précédée d'une transcriptase inverse qui permet le passage de l'ARN vers l'ADNc grâce à une enzyme Reverse Transcriptase (enzyme virale).

- **Nested-PCR:**

Méthode mise au point pour pouvoir amplifier d'une manière plus spécifique. Il y a deux PCR

successives. La première PCR avec un couple d'amorces définies. Les amplifiats obtenus servent de matrice pour la seconde PCR qui possède alors un couple d'amorces plus internes dans la séquence.

- **PCR Quantitative:**

Ici on quantifie en temps réel la quantité de produit synthétisé et, par le biais d'un calcul, on détermine la quantité de matrice initiale.

Elle est beaucoup utilisée en Biologie de Recherche et de Diagnostic. On veut notamment savoir la quantité d'ADN produit à telle période, par exemple. Ici on mesure grâce à un fluorimètre qui mesure le taux de dNTP fluos.

- **Applications.**

*cf. doc. 6*

- **"Finger printing" = empreintes génétiques:**

Taxonomie génétique.

Diagnostic de paternité.

Police scientifique.

Utilisation d'amorces d'ADN qui vont augmenter des zones du génome très variables.

- **Détection d'agents pathogènes et maladies génétiques:**

Confirmer un diagnostic de présence de pathogènes que l'on ne peut pas cultiver.

**Document 1 :** La PCR selon Kary B. Mullis (Science vol 230 p. 1350- 1354 20 déc. 85)

*Southern blot*

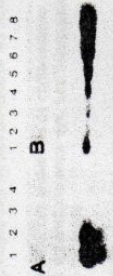
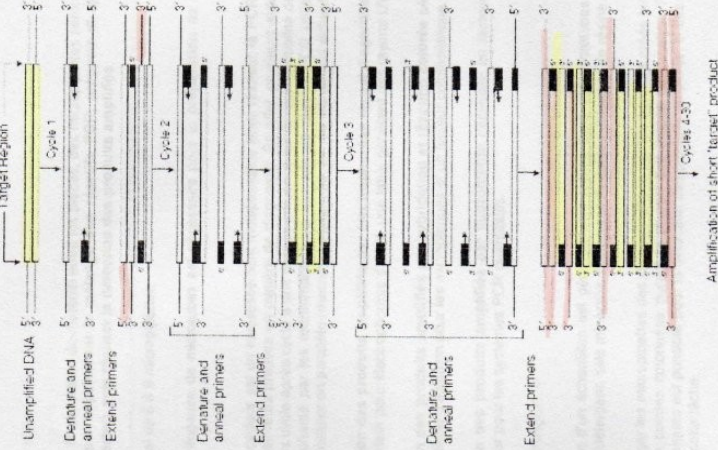


Fig. 2. Southern analysis of PCR amplified genomic DNA with the RS06 probe. (A) Samples (1 µg) of genomic DNA were dispersed in microcentrifuge tubes and adjusted to 100 µl in a buffer containing 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.5 mM deoxyneucleotide triphosphate (dNTP) each of all four was used), 1 mM PC03, and 1 mM PC04. After heating for 5 minutes at 95°C to denature the genomic DNA), the tubes were centrifuged for 10 seconds in a microcentrifuge to remove the condensation. The samples were immediately transferred to a 30°C heat block for 2 minutes to allow the PC03 and PC04 primers to anneal to their target sequences. At the end of this period, 2 µl of the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I (Boehringer, 0.5 unit/µl in 10 mM Tris, pH 7.5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) was added, and the incubation was allowed to proceed for cycle—denaturation, centrifugation, hybridization, and extension—was repeated 19 more times, except that subsequent denaturations were done for 2 instead of 5 minutes. (The final volume after 20 cycles was 140 µl.)

*matrice double brin*  
*hybridation des amorces.*  
*2 brins copies de la matrice*



**Document 4 :** Déroulement d'une PCR

La technique PCR  
Organisation du Laboratoire : équipements et contraintes (www.adiagene.fr)

Les objectifs d'une organisation rigoureuse du laboratoire pour la technique PCR  
LA QUALITE DES ANALYSES

**Eviter les résultats faussement positifs**

La gestion journalière d'un grand nombre d'échantillons et la grande sensibilité de la technique PCR peuvent en l'absence de précaution, générer des résultats faussement positifs par contamination. Il existe trois types de contamination :

- La contamination inter-échantillons pré-PCR, c'est-à-dire la contamination d'un échantillon négatif par un échantillon positif avant l'amplification PCR (lors du prélèvement, de l'échantillonnage, de l'extraction d'ADN).
- La contamination des réactifs ou des échantillons avec de l'ADN amplifié provenant d'amplifications précédentes.

**Document 2 :** Licence PCR Hoffman La Roche pour Qiagen

**Notice to Purchasers: Limited License**

A license under U.S. Patents 4,683,202, 4,683,195, and 4,965,188 or their foreign counterparts, owned by Roche Molecular Systems, Inc. and F. Hoffmann-La Roche Ltd ("Roche"), has an up-front fee component and a running-royalty component.

The purchase price of this product includes limited, nontransferable rights under the running-royalty component to use only this amount of the product to practice the Polymerase Chain Reaction ("PCR") and related processes described in said patents solely for the research and development activities of the purchaser when this product is used in conjunction with a thermal cycler whose use is covered by the up-front fee component.

Rights to the up-front fee component must be obtained by the end user in order to have a complete license.

These rights under the up-front fee component may be purchased from Applied Biosystems or obtained by purchasing an Authorized Thermal Cycler. No right to perform or offer commercial services of any kind using PCR, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is hereby granted by implication or estoppel.

Further information on purchasing licenses to practice the PCR Process may be obtained by contacting the Director of Licensing at Applied Biosystems, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94404 or the Licensing Department at Roche Molecular Systems, Inc., 1145 Atlantic Avenue, Alameda, California 94501.

**Document 3 :** ADN polymerases thermostables

Polymerase	3'→5' Exonuclease	Source and Properties
Taq	No	From <i>Thermus aquaticus</i> . Habite at 95°C is 1.6 hours.
Pfu	Yes	From <i>Picrococcus furiosus</i> . Apparent to have the lowest error rate of known thermophilic DNA polymerases.
Vent	Yes	From <i>Thermococcus litoralis</i> , also known as T1 polymerase. Habite at 95°C is approximately 7 hours.

In addition to the native polymerases listed in the table above, a number of mutants have been generated and are available, for example, a form of Vent polymerase that lacks the 3'→5' exonuclease and is thereby more similar to Taq.

**Thermus aquaticus**  
Scientific classification  
Kingdom: Bacteria  
Phylum: Thermococci  
Class: Thermococci  
Order: Thermotales  
Genus: *Thermus*  
Species: *T. aquaticus*  
Binomial name  
*Thermus aquaticus*  
Brock & Freeze, 1969

*→ Solica Thermal, Yellowstone*

- La contamination inter-échantillons post-PCR est possible lors de la détection des produits amplifiés. Un échantillon positif contient au moins 1010 molécules d'ADN par µl, il est donc important de bien faire attention lors des pipetages pour ne pas contaminer les tubes entre eux.

• Pour éviter ces problèmes de contamination, il faut veiller à la parfaite séparation des étapes de l'analyse PCR et des échantillons entre eux. Les manipulations pré-PCR et post-PCR devront donc être réalisées dans des pièces séparées.

• Un échantillon négatif devra être traité exactement comme les autres échantillons. Ce témoin permettra de détecter une contamination éventuelle des différents réactifs entrant dans la composition de l'essai PCR.

• La contamination par de l'ADN précédemment amplifié représente le principal risque.

Différentes méthodes préventives chimiques ou enzymatiques ont donc été développées (Isoporsoralen, Uracyl N-glycosylase) afin de compléter le système de cloisonnement des étapes PCR dans le laboratoire.

Eviter les résultats faussement négatifs

La PCR est un ensemble de réactions complexes relativement fragiles. Elle peut facilement être perturbée par de nombreux composés présents dans les échantillons testés (inhibition de la réaction PCR), par la détérioration d'un réactif, par le dysfonctionnement du thermocycleur ou du système de révélation. Dans ces conditions, un échantillon positif ne donnera pas de signal PCR.

• Pour éviter ces problèmes, il faudra contrôler régulièrement le matériel et les procédures d'analyses.

• Il faudra aussi utiliser des témoins positifs à chaque analyse, notamment un système de contrôle interne d'amplification permettant de valider indépendamment l'ensemble de la réaction PCR pour chaque échantillon.

#### \* OPTIMISER L'INSTALLATION EN FONCTION DU VOLUME D'ANALYSES REALISEES

L'installation réalisée dans le laboratoire pour accueillir la technologie PCR doit donc permettre d'apporter toutes les garanties pour le résultat de l'analyse. Cependant, les investissements effectués en matériel, locaux et personnel doivent être adaptés à la quantité d'analyses effectuées quotidiennement.

• Compte tenu de la vitesse de l'évolution de technologies comme la PCR, il semble préférable d'investir (machines, formations, locaux, personnel...) au fur et à mesure de l'augmentation de la demande d'analyses, afin de bénéficier des dernières avancées technologiques.

La relative simplicité des équipements nécessaires à la réalisation de la PCR devrait permettre à la majorité des laboratoires de pouvoir faire ainsi évoluer facilement leurs outils PCR.

#### III/ L'équipement du laboratoire

##### \* LES LOCAUX

L'analyse PCR peut être divisée en deux phases : les étapes précédant l'amplification (pré-PCR) et celles suivant l'amplification (post-PCR)

Pour éviter les problèmes de contamination (résultats faussement positifs), il est nécessaire d'utiliser plusieurs pièces distinctes pour effectuer l'ensemble des analyses. Les étapes pré-PCR devront, en effet, être réalisées dans un lieu n'accueillant en aucun cas des tubes contenant de l'ADN amplifié.

Les étapes pré-PCR comprennent deux parties : le mélange des réactifs, ainsi que le traitement et l'addition de l'échantillon. Si le mélange des réactifs est simple (utilisation du kit d'analyse), l'ensemble des étapes de pré-PCR pourra être réalisé dans la même pièce en leur attribuant des micropipettes spécifiques.

• Un minimum de deux pièces est donc nécessaire pour séparer les étapes de pré-PCR et post-PCR. Cependant, trois pièces différentes offrent une meilleure sécurité en séparant les étapes pré-PCR en deux parties.

L'ADN amplifié, qui est la principale source de contamination, peut être en suspension dans l'air.

• La ventilation des locaux doit être adaptée afin de ne pas recycler l'air d'une salle post-PCR vers une salle pré-PCR.

Les principaux vecteurs de contamination restent cependant les manipulateurs et le matériel.

• Par conséquent, une bonne conception et organisation des locaux, le confinement du matériel et la mise en place d'une " marche en avant " durant l'analyse PCR sont impératifs.

#### \* LE MATERIEL

Afin d'éviter la circulation du matériel entre les pièces, des micropipettes seront attribuées à chacune des étapes pour effectuer séparément le mélange des réactifs PCR, préparer et ajouter l'échantillon (présence de l'ADN à détecter), puis réaliser la détection des produits amplifiés.

• Soit un total de 6 à 9 micropipettes

• Une centrifugeuse de microtubes est nécessaire pour la préparation de l'échantillon dans la plupart des protocoles.

• Le thermocycleur est un investissement indispensable pour réaliser la PCR. Il existe quatre à cinq fabricants ayant déjà fait leurs preuves en matière de diagnostic. En effet, plusieurs auteurs ont noté que la précision des températures cycle après cycle a une grande influence sur la reproductibilité de l'analyse. Le choix du laboratoire sera aussi orienté par les recommandations des kits de réactifs PCR utilisés, ainsi que par le volume des analyses à réaliser en parallèle (machines traitant 20, 24, 48, 96 ou 384 échantillons).

• La détection des produits amplifiés par électrophorèse en gel d'agarose nécessite des cuves appropriées et un générateur pour électrophorèse d'ADN, une table générant des rayons UV et un système photo.

La détection des produits amplifiés par hybridation et réaction colorée nécessite des étuves thermostatées avec un système d'agitation pour les microplaques et un lecteur colorimétrique.

La détection des produits amplifiés par fluorométrie nécessite un lecteur spécifique, qui peut intégrer un thermocycleur pour les systèmes PCR quantitatifs.

#### \* LE CONSOMMABLE

Le traitement d'un échantillon est généralement réalisé dans des microtubes à l'aide de réactifs ou systèmes spécifiques (détergent, sels minéraux, protéinase K, petites colonnes de résine...).

• Pour protéger les micropipettes des contaminations par les aérosols créés lors de l'aspiration, il est nécessaire d'utiliser des pointes coniques durant la plupart des étapes de l'analyse PCR. Cependant, l'utilisation des pointes classiques est possible pour la détection des produits amplifiés, si des micropipettes sont exclusivement réservées à cette tâche.

• Le matériel plastique utilisé (pointes de micropipette, microtubes...) notamment pour l'extraction de l'ADN du prélevement, devra être stérilisé afin d'éliminer la présence de DNAses (enzymes dégradant l'ADN). Les tubes utilisés pour l'amplification sont spécifiques, mais maintenant standards pour la plupart des thermocycleurs.

La réaction PCR fait intervenir de nombreux réactifs comme des oligonucléotides, des dNTP, du tampon, la polymérase thermostable, des conjugués enzymatiques... La plupart de ces réactifs sont disponibles auprès de nombreux fournisseurs de produits de biologie moléculaire.

Mais ce n'est pas le cas des molécules spécifiques comme les amorces et l'ADN de contrôle interne, qui doivent être conçues par chaque laboratoire.

• Quelques kits regroupant l'ensemble des réactifs PCR pour l'analyse en médecine vétérinaire et en hygiène alimentaire commencent à être disponibles.

Selon les systèmes de détection des ADN amplifiés utilisés, différents consommables doivent être achetés par le laboratoire.

- Si l'ADN amplifié est détecté sur gel d'agarose, il faut de l'agarose qualité biologie moléculaire, du tampon de charge, du tampon d'électrophorèse, du bromure d'éthidium, de l'ADN servant de marqueur de taille et les consommables du système photo.

- Si l'ADN amplifié est détecté par hybridation et réaction colorée, la plupart des réactifs nécessaires peuvent être fournis par un kit de détection spécifique.

- Pour les nouveaux systèmes de détection par fluorescence, aucun consommable supplémentaire n'est nécessaire.

LES PERSONNES

Des techniciens formés en biologie moléculaire utiliseront facilement les kits PCR déjà disponibles. Par contre, pour développer, puis utiliser un test PCR au sein d'un laboratoire d'analyses, un biologiste moléculaire (docteur ou ingénieur), ayant une expérience en développement de diagnostic PCR, devient indispensable.

LES RESULTATS

Les résultats peuvent être présentés et archivés comme ceux des analyses habituelles. Il semble cependant important de rappeler qu'un prélèvement PCR négatif n'est pas forcément exempt de pathogènes, mais contient une quantité inférieure au seuil de détection de la PCR utilisée. Les lysats réalisés à partir des prélèvements peuvent être conservés à 20°C quelques mois, comme pour une seroèque.

Document 6. Application de la PCR à différents domaines

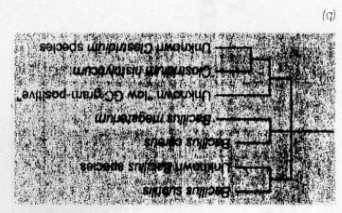
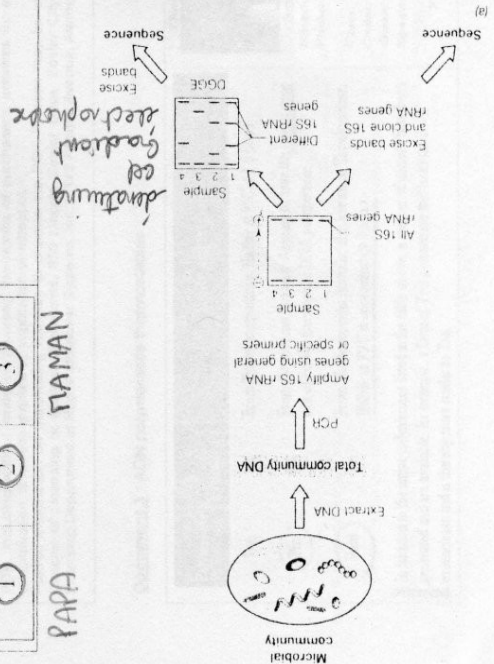
**Finger printing ou empreintes génétique**

**Recherche de maladies génétiques**

**Sex Determination PCR Kit**

**Product**  
Sex Determination PCR kit may be used for sex determination of any mammalian species. Diagnosis of white blood, CVS and other human samples by Nucleo-PCR method.

**Description**  
Genes: Diagnosis of white blood, CVS and other human samples by Nucleo-PCR method.  
Cassette's sex determination PCR kit may be used to prenatal diagnosis (PD) in medicine to determine sex of the fetus. This kit unambiguously amplifies a X-chromosomal and Y-specific DNA fragments in our PCR reaction using one pair of primers for each sex, which are specific to the X-Y homologous homologue.  
**Storage**  
Amplification genes has been described for use as a PCR sex typing test for humans. This kit is highly reproducible and reliable.  
**Note**  
Cassette's sex determination kit for sex determination for prenatal diagnosis of sex in research laboratories where such studies are being carried out. This kit may not be used for sex typing such disorders for more sex determination of the subject.



Pathogens that can be identified with nucleic acid probes including PCR methods

- |  |  |
|--|--|
| <p><b>Bacteria</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Campylobacter</i> spp.</li> <li><i>Escherichia coli</i> (enteropathogenic strains)</li> <li><i>Haemophilus influenzae</i></li> <li><i>Listeria monocytogenes</i></li> <li><i>Mycobacterium avium</i></li> <li><i>Mycobacterium tuberculosis</i></li> <li><i>Mycoplasma hominis</i></li> <li><i>Mycoplasma pneumoniae</i></li> <li><i>Neisseria meningitidis</i></li> <li><i>Neisseria gonorrhoeae</i></li> <li><i>Rickettsia</i> spp.</li> <li><i>Salmonella</i> spp.</li> <li><i>Shigella</i> spp.</li> <li><i>Staphylococcus aureus</i></li> <li><i>Streptococcus pyogenes</i></li> <li><i>Streptococcus pneumoniae</i></li> <li><i>Tetrahymena pallidum</i></li> </ul> <p><b>Fungi</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Blastomyces dermatitidis</i></li> <li><i>Candida</i> spp.</li> <li><i>Coccidioides immitis</i></li> <li><i>Histoplasma capsulatum</i></li> </ul> <p><b>Viruses</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Cytomegalovirus</li> <li>Epsilon-barr virus</li> <li>Hepatitis viruses A, B, C, D, E</li> <li>Herpes virus (types I and II)</li> <li>Human immunodeficiency virus (HIV)</li> <li>Influenza</li> <li>Poliovirus</li> <li>Rosavirus</li> </ul> <p><b>Protozoa</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Leishmania donovani</i></li> <li><i>Plasmodium</i> spp.</li> <li><i>Toxoplasma gondii</i></li> <li><i>Trypanosoma</i> spp.</li> </ul> | <p><b>Food infections</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Varicella syndrome, trachoma</li> <li>Nosocomial infections</li> <li>Gastrointestinal disease</li> <li>Infectious mononucleosis</li> <li>Parotitis</li> <li>Listeriosis</li> <li>Tuberculosis</li> </ul> <p><b>Urinary tract infection, pelvic inflammatory disease</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><i>Proteus mirabilis</i></li> <li><i>Gonorrhoea</i></li> <li><i>Chlamydia</i></li> <li>Typical hemorrhagic fever, etc</li> <li>Cholera</li> <li>Gastrointestinal disease</li> <li>Parotid discharges (boils, blisters, pus-forming skin infections)</li> <li>Scarlet fever, rheumatic fever, strep throat</li> <li>Pneumonia</li> <li>Syphilis</li> </ul> <p><b>Rickettsiosis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Campylobacter, thrush</li> <li>Coccidioidomycosis</li> <li>Histoplasmosis</li> </ul> <p><b>Congenital viral infections</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Burkitt's lymphoma, meningococci</li> <li>Epilepsy</li> <li>Cold sores, genital herpes</li> <li>Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)</li> <li>Cervical cancer, cervical cancer</li> <li>Respiratory disease</li> <li>Neurological disease</li> <li>Gastrointestinal disease</li> </ul> <p><b>Leishmaniasis</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Malaria</li> <li>Proteus</li> <li>Trichomoniasis</li> <li>Trypanosomiasis</li> </ul> |
|--|--|

