

3

Outils de dépistage et de diagnostic

Dans ce chapitre sont exposées les caractéristiques des outils biologiques de dépistage de l'infection tuberculeuse, de diagnostic de la tuberculose maladie et de traçabilité. Ces outils sont classés en outils utilisés en routine (bactériologie classique) et en outils en développement ou dont l'intérêt opérationnel est en évaluation.

Outils actuellement utilisés

L'examen microscopique et la culture sur des milieux spécifiques restent les outils biologiques sur lesquels repose le diagnostic aujourd'hui.

Examen microscopique

La probabilité de mettre en évidence des mycobactéries dépend de la qualité et de la répétition des prélèvements ainsi que de leur transport jusqu'au laboratoire de bactériologie (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995). L'examen microscopique d'un produit pathologique est l'étape initiale, et souvent la seule possibilité dans de nombreux pays en développement, pour effectuer le diagnostic bactériologique de la tuberculose. C'est pourquoi il est mis en exergue dans les textes de l'OMS.

Pour mettre en évidence les mycobactéries, on utilise leur propriété d'acido-alcoolo-résistance. Deux méthodes de coloration sont applicables en routine, la méthode de Ziehl-Neelsen et la méthode fluorescente :

- avec la méthode de Ziehl-Neelsen, les frottis sont colorés par la fuchsine phéniquée à chaud, puis, après décoloration par l'acide et l'alcool, contre-colorés par le bleu de méthylène. Au microscope optique avec un objectif à immersion ($\times 100$) les bacilles acido-alcoolo-résistants (BAAR) apparaissent comme des bâtonnets rouges sur fond bleu ;
- avec la méthode fluorescente, où la fuchsine est remplacée par l'auramine, et au microscope à fluorescence sous lumière bleue ou rayonnement UV, les BAAR apparaissent comme des bâtonnets jaunes-verts brillants sur fond sombre. Les frottis colorés par l'auramine peuvent être examinés avec un objectif à sec de faible grossissement ($\times 25$), ce qui fait que la surface de

chaque champ microscopique observé est 16 fois plus grande qu'à l'objectif $\times 100$, et que l'examen microscopique est plus rapide et plus sensible (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995).

Le résultat de l'examen microscopique est exprimé quantitativement : 1 à 9 BAAR pour 100 champs microscopiques, 10 à 99 pour 100 champs, ou plus de 100 par champ. Lorsque le nombre total de bacilles observés est inférieur à 10 après coloration à l'auramine ou à 5 après coloration à la fuchsine, il est prudent, en raison du risque de confusion entre BAAR et débris cellulaires, de considérer le résultat comme douteux.

Lorsque le risque de mycobactériose est très important (malades des pays en voie de développement ou malades séropositifs pour le VIH), la mise en évidence de BAAR à l'examen microscopique est généralement considéré comme synonyme de tuberculose. En revanche, chez les malades atteints de sida dans les pays où l'incidence de la tuberculose est faible, la mise en évidence de BAAR à l'examen microscopique peut correspondre à la tuberculose ou à une mycobactériose.

L'examen microscopique n'est pas très sensible puisqu'il faut de 5 000 à 10 000 bacilles par millilitre de produit pathologique pour que l'on puisse voir au moins un BAAR sur un frottis avec une probabilité supérieure à 95 % (Parrot et coll., 1976). La concentration des échantillons et l'examen de plusieurs échantillons, en général 3 recueillis pendant 3 jours successifs, améliorent la sensibilité de la technique (Lepeuple et coll., 1970). Lorsque les frottis sont faits dans de bonnes conditions et lus par des microscopistes expérimentés, l'examen microscopique est positif pour la moitié des malades atteints de tuberculose pulmonaire à culture positive, qu'ils soient séropositifs ou séronégatifs pour le VIH, et pour plus de 20 % des malades séropositifs pour le VIH atteints de tuberculose extra-pulmonaire à culture positive.

Malgré ses limites, l'examen microscopique est une étape essentielle du diagnostic de la tuberculose puisqu'il permet de détecter rapidement, en pratique en moins d'1 heure, les malades les plus bacillifères, donc les plus contagieux pour leur entourage (Shaw et Wynn-Williams, 1954). Pouvant être mis en œuvre dans les pays les plus démunis, c'est l'examen que recommande en priorité l'OMS pour le diagnostic de la tuberculose chez les malades symptomatiques (Enarson et coll., 1996).

Culture

La culture est beaucoup plus sensible que l'examen microscopique (Parrot et coll., 1976 ; Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995) et permet l'identification de la mycobactérie isolée ainsi que la mesure de sa sensibilité aux antibiotiques. En raison des exigences nutritives et de la croissance lente des bacilles de la tuberculose, il est nécessaire d'employer des milieux de culture enrichis et avant de les ensemer, de débarrasser les prélèvements provenant de cavités ouvertes des microorganismes commensaux dont la

croissance est rapide et qui risquent de contaminer les milieux de culture (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995).

Homogénéisation et décontamination

La décontamination des prélèvements repose sur la propriété qu'ont les mycobactéries de mieux résister à certains antiseptiques que les autres bactéries. Les produits utilisés sont la soude ou un acide dilué. On y adjoint en général un agent fluidifiant (lauryl-sulfate de sodium ou N-acétyl-L-cystéine) dont le rôle est de liquéfier le mucus et donc d'homogénéiser les prélèvements, notamment les crachats (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995).

Bien que plus résistantes aux antiseptiques que les autres bactéries, les mycobactéries n'y sont cependant pas insensibles. Le protocole de la décontamination doit donc être soigneusement respecté pour réduire les risques de contamination de la culture sans tuer trop de mycobactéries. Un juste équilibre est atteint lorsque le taux des cultures perdues par contamination est compris entre 2 à 5 % (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995). Dans ces conditions, 50 à 90 % des mycobactéries viables sont cependant tuées. C'est pourquoi il est nécessaire de prélever, manipuler et ensemercer dans des conditions de stérilité rigoureuse les prélèvements de lésions fermées, qui ne sont pas contaminés par des bactéries commensales et qui sont habituellement paucibacillaires, pour permettre d'échapper à l'étape de décontamination, ce qui augmente notablement les chances d'isolement de *M. tuberculosis*.

Milieux de culture

Le milieu solide à l'œuf de Löwenstein-Jensen est le milieu de culture le plus couramment employé dans le monde, en raison de sa grande sensibilité, de son faible prix de revient et de l'aspect typique qu'y prennent les colonies de *M. tuberculosis*. Lors de la primoculture, les colonies de *M. tuberculosis* s'y développent en moyenne en 21 à 28 jours et celles de *M. bovis* et de *M. africanum* en plus d'1 mois. Il est recommandé de toujours ensemercer plusieurs tubes de milieu de culture, de les incuber à 35-37 °C, de les examiner chaque semaine pendant au moins 2 et, si possible, 3 mois avant de les déclarer négatifs (Grosset et coll., 1990). Le milieu de Löwenstein-Jensen enrichi de 0,2 à 0,4 % de pyruvate de sodium favorise la croissance de *M. bovis* et de *M. africanum*. Les milieux de culture gélosés de Middlebrook (7H10 ou 7H11), très utilisés aux États-Unis, le sont peu ailleurs en raison de leur coût élevé et de la nécessité de les incuber en atmosphère enrichie de 5 % de CO₂. Examinés à la loupe binoculaire (30 à 60 ×), ils permettent de détecter les colonies en moyenne en 21 jours.

Dès l'apparition de colonies constituées de BAAR, ce qui doit être vérifié par examen microscopique après coloration de Ziehl-Neelsen, les cultures sont déclarées positives. Les résultats sont exprimés quantitativement en nombre

de colonies par tube (nombre exact si inférieur à 50, entre 50 et 100, 100 à 200, ou plus de 200 colonies) pour pouvoir éventuellement suivre leur évolution sous traitement.

Pour pallier la lenteur des cultures sur milieux solides, de nouvelles méthodes ont été mises au point, basées sur l'utilisation d'un milieu liquide dérivant du milieu 7H9 et d'un artifice pour détecter précocement la croissance. La respirométrie radiométrique, ou Bactec 460 TB system (Becton Dickinson), est disponible depuis près de 20 ans (Siddiqi et coll., 1984). Elle est basée sur la mesure de CO₂ marqué par le carbone 14 libéré par les mycobactéries au cours de leur croissance dans un milieu de culture liquide contenant de l'acide palmitique marqué comme source unique de carbone. Des quantités minimales de CO₂ marqué pouvant être mesurées, la présence de *M. tuberculosis* est détectée précocement, en moyenne 8 à 14 jours après mise en culture selon que les prélèvements sont positifs ou non à l'examen microscopique (Morgan et coll., 1983 ; Roberts et coll., 1983). Lorsque les prélèvements proviennent de cavités ouvertes, ils doivent être décontaminés avant d'être ensemencés dans le milieu de culture auquel il faut alors ajouter un cocktail d'antibiotiques. La sensibilité de la méthode est au moins égale sinon meilleure que celle des méthodes utilisant les milieux de culture solides (Nolte et Metchock, 1995). Toutefois, l'impossibilité d'observer la morphologie des colonies, la difficulté de détection des cultures mixtes de mycobactéries, la fréquence des contaminations, le coût élevé, et surtout les difficultés liées à l'élimination des déchets radioactifs ainsi que le risque de piqûres accidentelles résultant de l'ensemencement des flacons de culture à l'aiguille, limitent l'emploi du système Bactec 460 TB (Nolte et Metchock, 1995).

De nouveaux milieux liquides, non radioactifs, et qui permettent donc de pallier les inconvénients majeurs du système Bactec 460 TB, ont été mis au point. Les plus connus sont le *Mycobacterial growth indicator tube*, ou MGIT, le système Bactec 960 (Becton Dickinson), le système MB/BacT (Organon Teknika), l'ESP culture system II (ESPIL, Difco) et le système MB Redox (Biotest).

Le signal de la croissance bactérienne est :

- l'apparition d'une fluorescence sous l'effet de la réduction de la tension d'oxygène avec les systèmes MGIT et Bactec 960 ;
- la modification de couleur d'une membrane sous l'effet du dégagement de CO₂ avec le système MB/BacT ;
- la variation de pression avec l'ESP culture system II ;
- l'apparition de grains colorés sous l'effet de la variation du potentiel redox avec le tube MB Redox.

Les résultats obtenus avec ces différents systèmes non radiométriques sont intéressants (Casal et coll., 1997 ; Pfyffer et coll., 1997 ; Rohner et coll., 1997 ; Woods et coll., 1997 ; Brunello et coll., 1999 ; Cambau et coll., 1999 ; Hanna et coll., 1999 ; Roggenkamp et coll., 1999 ; Somoskovi et Magyar, 1999 ; Tortoli et coll., 1999). Leur sensibilité est légèrement inférieure à celle

du système Bactec 460 TB mais toujours au moins égale à celle des milieux solides. La présence de *M. tuberculosis* est détectée, comme avec le système Bactec 460 TB, en moyenne en une semaine (7 à 10 jours) ou 2-3 semaines (16 à 20 jours) selon que les prélèvements sont positifs ou négatifs à l'examen microscopique. Les systèmes Bactec 960, MB/BacT et ESPII sont des systèmes totalement automatisés tandis que les tubes MGIT et MB Redox sont à utiliser manuellement. Le tube MB Redox, qui contient déjà le complexe vitaminique et le complexe antibiotique, est le seul qui soit prêt à l'emploi. Le MB Check system, milieu diphasique contenant du bouillon 7H9 modifié et une lame gélosée de milieu 7H11 (Roche Diagnostics Systems) réunit les avantages de rapidité des milieux de culture liquides et de robustesse des milieux de culture solides (Piersimoni et coll., 1992).

Identification

L'identification des mycobactéries obtenues en culture pure sur milieu solide repose classiquement sur l'étude des caractères cultureux (temps de croissance, morphologie et pigmentation des colonies) et biochimiques. Trois épreuves biochimiques simples (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995) permettent de faire la distinction entre bacilles du complexe *tuberculosis* et mycobactéries non tuberculeuses : la recherche de l'activité catalasique après chauffage pendant 20 min à 68 °C, le niacine-test et l'étude de la sensibilité à l'acide para-aminosalicylique (ou PAS).

L'espèce *M. tuberculosis*, principale responsable de la tuberculose humaine (Shinnick et Good, 1994 ; Portaels, 1995 ; Starke et Heifets, 1997), est aérobic strict et donne en 21 à 28 jours, sur milieu de Löwenstein-Jensen, de grosses colonies en « chou-fleur », de teinte crème-beige, à surface sèche et rugueuse. Naturellement sensible à l'isoniazide, elle a une activité catalasique thermolabile (après chauffage pendant 20 min à 68 °C) et une activité nitrate réductase. Elle est naturellement résistante à l'hydrazide de l'acide thiophène carboxylique – ou TCH – et naturellement sensible à l'acide para-aminosalicylique (Grosset et coll., 1990). En cas de résistance à haut niveau à l'isoniazide, l'activité catalasique est réduite voire même absente. Dans tous les cas, *M. tuberculosis* accumule l'acide nicotinique, ou niacine, qui peut être révélé par l'épreuve de Konno ou niacine-test (Konno, 1956).

L'espèce *M. bovis* est micro-aérophile et donne sur milieu de Löwenstein-Jensen de petites colonies non pigmentées, lisses et brillantes qui ne dépassent pas la taille d'une tête d'épingle, sauf si le milieu de culture est enrichi de pyruvate de sodium (Grosset et coll., 1990). Elles n'apparaissent jamais avant 1 mois à l'isolement mais, après repiquage, la croissance peut être plus rapide et les colonies peuvent devenir rugueuses, bien développées et simuler celles de *M. tuberculosis*. *M. bovis* est sensible au TCH, ne possède pas de nitrate-réductase et n'accumule pas suffisamment de niacine pour donner un niacine-test positif. *M. africanum* donne des colonies dysgoniques, plates avec un

bourgeon central, rugueuses et de teinte mate, qui se développent plus rapidement et en plus grande quantité en présence de pyruvate de sodium. L'aspect des colonies et les caractères biochimiques de *M. africanum* diffèrent selon l'origine géographique de la souche isolée (Grosset et coll., 1990).

On remplace maintenant, lorsque l'on en a les moyens, les épreuves biochimiques par l'hybridation avec des sondes génomiques complémentaires de séquences d'ARN ribosomique, spécifiques de certaines mycobactéries, notamment de celles du complexe *tuberculosis*. Les sondes Accuprobe (Gen Probe), couplées à un marqueur non radioactif, l'ester d'acridinium, permettent d'identifier en moins de 2 heures les bacilles du complexe *tuberculosis* obtenus en culture pure sur milieu solide ou en milieu liquide. Leur sensibilité et leur spécificité, proches de 100 %, en font des outils fiables d'identification (Goto et coll., 1991 ; Lebrun et coll., 1992). Elles ne permettent pas de différencier les quatre espèces d'intérêt clinique du complexe *tuberculosis* : *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG et *M. africanum*. Pour y parvenir, il faut étudier les caractères culturels, biochimiques et de sensibilité au TCH et à la cyclosérine, voire l'absence de pouvoir pathogène pour le cobaye de *M. bovis* BCG (Grosset et coll., 1990 ; Nolte et Metchock, 1995). Une méthode génétique, basée sur la mise en évidence de différences dans le gène *gyrB* entre les espèces du complexe *tuberculosis*, a été très récemment commercialisée.

Test de sensibilité aux antibiotiques ou antibiogramme

La méthode de référence, la plus couramment employée, pour mesurer la sensibilité aux antibiotiques est la méthode des proportions, qui permet de déterminer la proportion de bacilles résistants à chaque antibiotique dans une population bacillaire donnée (Canetti et coll., 1963). Les souches de *M. tuberculosis* qui n'ont jamais été en contact avec des antibiotiques antituberculeux contiennent spontanément une faible proportion de bacilles résistants ou mutants résistants à chacun des antibiotiques (environ 1 bacille résistant pour 10^5 à 10^7 bacilles sensibles selon l'antibiotique). En raison de l'indépendance des mutations, les mutants résistants à un antibiotique restent sensibles aux autres antibiotiques. C'est pour éviter de sélectionner ces mutants que le traitement de la tuberculose repose sur une association de plusieurs antibiotiques, chacun d'entre eux agissant sur les mutants résistants aux autres.

Méthode des proportions sur milieu solide

La méthode des proportions est habituellement effectuée sur milieu de culture solide, le plus souvent sur le milieu de Löwenstein-Jensen (Grosset et coll., 1990) mais aussi sur les milieux gélosés 7H10 ou 7H11 (Inderlied et Salfinger, 1995). L'ensemencement de plusieurs dilutions de la suspension bacillaire à étudier sur des milieux de culture avec antibiotique et des milieux sans antibiotique (témoins) permet de déterminer le nombre de bacilles ensemencés et la proportion d'entre eux qui sont résistants aux antibiotiques.

La souche de *M. tuberculosis* est déclarée résistante lorsque la proportion des bacilles résistants est égale ou supérieure à 1 % pour l'isoniazide, la rifampicine, la streptomycine, le PAS et l'éthambutol et lorsqu'elle est supérieure à 10 % pour les autres antibiotiques antituberculeux. La méthode des proportions donne de bons résultats avec la majorité des antibiotiques à l'exception du pyrazinamide (Grosset et coll., 1990 ; Cutler et coll., 1997). En effet, cet antibiotique n'étant actif qu'à pH 5,5 et la croissance de *M. tuberculosis* à ce pH étant faible et irrégulière (1 à 10 % seulement des colonies poussent à pH 5,5), l'interprétation des résultats de l'antibiogramme au pyrazinamide est toujours délicate.

Les résultats de l'antibiogramme sont obtenus après 3 à 6 semaines d'incubation, délai nécessaire au développement des colonies de bacilles de la tuberculose. Lorsque l'antibiogramme est effectué à partir des colonies de la primoculture (antibiogramme « indirect »), les résultats sont donc obtenus 2 à 3 mois après la mise en culture du prélèvement. Lorsque l'examen microscopique du prélèvement révèle une quantité suffisante de bacilles (au moins 1 par champ), on peut faire un antibiogramme « direct » (Grosset et coll., 1990 ; Inderlied et Salfinger, 1995). Pour cela, le prélèvement est homogénéisé, décontaminé et des dilutions sont ensemencées directement sur des tubes de milieu de culture avec et sans antibiotique. Les résultats de l'antibiogramme sont alors disponibles en même temps que ceux de la primoculture, c'est-à-dire en 3 à 6 semaines.

L'antibiogramme est particulièrement important pour mener à bien le traitement lorsque les malades rechutent ou lorsque les cultures sont encore positives après 4 mois de traitement (échec thérapeutique). Dans ce cas, en plus de la sensibilité aux antituberculeux de 1^{re} ligne, il faut aussi éprouver la sensibilité aux antituberculeux de 2^e ligne, ce qui est très difficile depuis que le matériel prêt à l'emploi n'est plus commercialisé en France. Seules des équipes très spécialisées sont à même de préparer les milieux adéquats et interpréter les résultats.

Antibiogramme en milieu liquide

Il est possible d'apprécier la proportion de mutants résistants en utilisant le système Bactec 460 TB, en mesurant la quantité de CO₂ marqué produite dans des flacons de milieu 12B additionné d'antibiotique et dans des flacons sans antibiotique (témoins) qui ont été ensemencés avec 100 fois moins de bactéries que les flacons avec antibiotique (Nolte et Metchock, 1995). Si la production de CO₂ marqué dans les flacons avec antibiotique est au moins égale à celle de CO₂ marqué dans les flacons témoins ensemencés avec 100 fois moins de bacilles, c'est qu'au moins 1 % des bacilles sont résistants à l'antibiotique considéré. Cette méthode permet de déterminer avec fiabilité la sensibilité à l'isoniazide, à la rifampicine, à la streptomycine et à l'éthambutol en 5 à 10 jours après la primoculture (Inderlied et Salfinger, 1995). Elle permet aussi de déterminer la sensibilité au pyrazinamide (Pfyffer et coll.,

1999a). Il est possible de procéder avec le système Bactec 460, comme sur milieu solide, à un antibiogramme direct si le produit pathologique est suffisamment riche en bacilles mais, malgré l'addition du cocktail d'antibiotiques, le risque de contamination des tubes est élevé.

Le milieu MGIT, le Bactec 960 system, le MB/BacT system et l'ESPII system ont été proposés pour faire l'antibiogramme de *M. tuberculosis*. Ils sont en cours d'évaluation (Walters et Hanna, 1996 ; Bergmann et Woods, 1997 ; Almeida et coll., 1999 ; Ebrahimzadeh et coll., 1999 ; Heifets et Cangelosi, 1999 ; Middleton et coll., 1999 ; Palomino et coll., 1999). Les résultats sont disponibles 5 à 10 jours après la primoculture et, de manière générale, de bonne qualité pour l'isoniazide et la rifampicine.

Nouveaux moyens de diagnostic de la maladie

De nouveaux moyens diagnostiques sont développés, mais ils restent d'utilisation délicate.

Détection de l'acide tuberculo-stéarique

L'acide tuberculo-stéarique est un acide gras saturé à longue chaîne qui constitue la paroi des bactéries de la famille des Actinomycétales. Il peut être détecté en quantité femtomolaire (10^{-15} M) dans un produit pathologique par chromatographie gazeuse-spectrophotométrie de masse en quelques heures (Brooks et coll., 1987 ; French et coll., 1987 ; Larsson et coll., 1987a et b). Comme *M. tuberculosis* est la seule espèce bactérienne responsable de méningite qui peut libérer de l'acide tuberculo-stéarique, la mise en évidence d'acide tuberculo-stéarique dans le liquide céphalorachidien est fortement évocatrice d'infection tuberculeuse. Lorsque celui-ci est présent dans un prélèvement d'origine respiratoire, sa valeur prédictive nécessite encore d'être évaluée. En effet, *M. tuberculosis* n'est pas le seul Actinomycétale pouvant être présent dans l'arbre respiratoire. Bien que cette technique apparaisse plus sensible que l'examen microscopique et aussi sensible que la culture pour le diagnostic de la méningite tuberculeuse, l'équipement nécessaire à sa réalisation est très coûteux et ne permet pas à ce jour son utilisation en routine.

Méthodes immunologiques

Depuis très longtemps, on tente d'utiliser la sérologie pour le diagnostic de la tuberculose en alternative de l'examen microscopique. Beaucoup des antigènes utilisés, aussi purifiés soient-ils, contiennent des déterminants antigéniques qui entraînent des réactions croisées entre *M. tuberculosis* et les autres mycobactéries (Daniel et Debanne, 1987). Même en améliorant la

spécificité du sérodiagnostic grâce à des épitopes spécifiques de *M. tuberculosis*, celle-ci reste inférieure à 90 % et la sensibilité ne dépasse guère 70 à 80 % (Chan et coll., 1990 ; Bothamley, 1995). Les résultats sont plutôt moins bons pour les malades VIH⁺ (Mathur et coll., 1999 ; Somi et coll., 1999).

De nouveaux antigènes protéiques spécifiquement excrétés par *M. tuberculosis* se sont révélés décevants : antigène 45/47 kDa (complexe APA) (Chanteau et coll., 2000), antigènes du complexe 85 – même si l'usage combiné de deux antigènes a amélioré la sensibilité (77 % au lieu de 60 % pour chacun des antigènes pris séparément) mais au prix d'une baisse de la spécificité (80 % au lieu de 85-95 %) – (Landowski et coll., 2001), test immunochromatographique sur carte (ICT, Amrad Corporation) utilisant 5 antigènes purifiés de *M. tuberculosis* (Gounder et coll., 2002).

L'utilisation combinée de plusieurs antigènes augmente la sensibilité (Amicosante et coll., 1999). L'utilisation combinée de 3 antigènes glycolipidiques, LOS (lipo-oligosaccharides), DAT (diacétyltréhalose), PGTLb1 (phtiocérol dimycosérate) dans un test Elisa, a permis d'obtenir des résultats significativement meilleurs qu'avec le test basé sur l'antigène protéique A60 (Simonney et coll., 1996 et 1997) : sensibilité d'environ 85 %, spécificité globale de 94 %, spécificité de 62 ou 82 % chez des patients VIH⁺ avec ou sans mycobactériose, respectivement.

Amplification génique

Les tests d'amplification génique (TAG), appliqués au diagnostic de la tuberculose, consistent à amplifier et détecter une séquence nucléique spécifique du complexe *M. tuberculosis*. Ce sont des tests puissants dont le seuil théorique de sensibilité est d'une molécule d'ADN (ou d'ARN). Ce sont des tests rapides car ils s'affranchissent du temps de multiplication des bacilles et ne reposent que sur des réactions enzymatiques. Les TAG ont la potentialité d'identifier spécifiquement les bacilles de la tuberculose directement dans les prélèvements à visée diagnostique.

La technique d'amplification initialement employée, une réaction artisanale de polymérisation en chaîne (PCR) (Brisson-Noël et coll., 1991), a été remplacée par des méthodes standardisées utilisant des réactifs prêts à l'emploi. Les méthodes sont :

- soit l'amplification par PCR au sens strict d'une séquence d'ADN codant pour des ARN 16 S des mycobactéries (test Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis*) ;
- soit la réaction de ligation en chaîne (*ligase chain reaction*) d'une séquence d'ADN codant pour la protéine spécifique « Antigène B » (LCx, Abbott ou LCR) ;
- soit l'amplification d'une séquence d'ARN ribosomal via un intermédiaire ADN par une technique isothermique basée sur la transcriptase reverse ou TMA (test Amplified *M. tuberculosis* direct, ou AMTDT, Gen-Probe) ;

- soit enfin l'amplification par déplacement de brin (BD Probe Tec, Becton Dickinson).

Les TAG requièrent du personnel très qualifié, des locaux adaptés (organisation en plusieurs zones distinctes) et la mise en place de contrôles de qualité interne.

Avec ces méthodes, les résultats sont obtenus rapidement (potentiellement dans les 24 heures si elles sont mises en œuvre tous les jours) mais ils sont malheureusement moins brillants que ce que la théorie laissait espérer (Noordhoek et coll., 1996). Les TAG appliqués à la détection de *M. tuberculosis* dans les prélèvements respiratoires sont moins performants que la culture prise comme méthode de référence (*gold standard*) (Clarridge et coll., 1993 ; Forbes et Hicks, 1993 ; Jonas et coll., 1993 ; Nolte et coll., 1993 ; Bodmer et coll., 1994 ; Pfyffer et coll., 1994 ; Chin et coll., 1995 ; D'Amato et coll., 1995 ; Vuorinen et coll., 1995 ; Wobeser et coll., 1996 ; Ausina et coll., 1997 ; Ichiyama et coll., 1997 ; Jouveshomme et coll., 1998 ; Pfyffer et coll., 1999b). La sensibilité des TAG diffère beaucoup selon que les prélèvements sont positifs ou négatifs à l'examen microscopique : 95 à 100 % pour les prélèvements à examen microscopique positif (riches en bacilles) et 50-70 % pour les prélèvements à examen microscopique négatif (pauvres en bacilles). La sensibilité a été trouvée nettement inférieure en moyenne lorsque les TAG ont été menés en aveugle ou de manière prospective (Sarmiento et coll., 2003). La spécificité des TAG est, en routine, de l'ordre de 97 %.

Sur la base de ces sensibilité et spécificité, la valeur prédictive positive (VPP) dépend bien évidemment de la prévalence de l'infection chez les patients soumis aux TAG : près de 100 % en cas d'examen microscopique positif de l'expectoration, de 25 à 40 % en cas d'examen microscopique négatif de l'expectoration (2 à 5 % de cultures positives parmi les expectorations à examen microscopique négatif) et < 10 % en cas d'examen microscopique négatif d'un liquide de séreuse comme le liquide céphalorachidien (< 1 % de culture positive parmi les liquides céphalorachidiens adressés aux laboratoires).

Les TAG peuvent utilement servir à identifier rapidement les bacilles de la tuberculose dans les prélèvements à examen microscopique positif, ce qui est particulièrement utile pour les patients à sérologie VIH positive, en particulier au stade sida, et pour les patients atteints d'affections respiratoires chroniques chez lesquels les mycobactérioses (infections à mycobactéries atypiques) peuvent survenir. C'est d'ailleurs la seule indication de diagnostic positif par PCR retenue à ce jour par la *Food and drug administration* (FDA) des États-Unis (Barnes, 1997 ; Cantanzaro et Davidson, 1997).

Aujourd'hui, les TAG ne sont pas recommandés pour le diagnostic positif de tuberculose en cas d'examen microscopique négatif car :

- 50
- un résultat négatif ne permet pas d'exclure le diagnostic de tuberculose ;

- la valeur prédictive positive (VPP) est trop faible, en particulier pour les formes extra-respiratoires.

En clair, appliquer les TAG à un liquide céphalorachidien pour faire le diagnostic de méningite tuberculeuse expose :

- à ne pas diagnostiquer la moitié des vrais cas (manque de sensibilité) ;
- à ce qu'un résultat positif n'ait qu'une chance sur 10 d'être un vrai positif.

On ne peut pas prendre de décision thérapeutique fiable sur la base de tels chiffres.

Perspectives des TAG

En identifiant les prélèvements provenant de patients à examen microscopique négatif mais à « forte probabilité de tuberculose », il devrait être possible d'augmenter de manière significative la prévalence des prélèvements contenant *M. tuberculosis*, et donc la VPP des TAG. Une étude a effectivement montré que lorsque les tests d'amplification génique étaient ciblés sur de tels patients, la VPP augmentait considérablement (Jouveshomme et coll., 1998). La question est de définir ce qu'est une « forte probabilité de tuberculose ». L'objectif visé est d'atteindre une prévalence (« probabilité pré-test ») de la tuberculose d'au moins 10 % parmi les malades à examen microscopique négatif auxquels on applique les tests d'amplification génique, ce qui permet d'obtenir une VPP d'au moins 70 % et ceci de manière régulière. Un score composite basé sur des critères cliniques (signes généraux et respiratoires), radiologiques (lésions pulmonaires) et épidémiologiques (risque en fonction du groupe de population auquel appartient le patient) pourrait remplir cet office. Un tel score reste à construire et à évaluer. C'est la seule voie réaliste pour donner un réel intérêt décisionnel aux tests d'amplification génique dans les suspicions de tuberculose à examen microscopique négatif. C'est une voie de recherche clinico-biologique d'un grand intérêt pratique.

Tests de résistance aux antibiotiques par biologie moléculaire

Les gènes codant pour la cible des principaux antibiotiques ainsi que la plupart des mutations responsables de la résistance ont été identifiés chez *M. tuberculosis* (Ramaswany et Musser, 1998). Lorsque les mutations en cause sont localisées sur de courtes séquences nucléotidiques de ces gènes, elles peuvent être détectées après amplification de ces séquences. La détection de la mutation peut alors être faite par séquençage de la séquence amplifiée, ce qui en pratique est réservé à des laboratoires spécialisés. On s'est donc efforcé de mettre au point des techniques à la fois plus simples et plus rapides. La technique LIPA (pour « *Line probe assay* ») consiste à amplifier la séquence nucléotidique susceptible d'être mutée puis à l'hybrider, d'une part avec des sondes spécifiques de sa conformation normale (témoins « sensibles »), et d'autre part avec des sondes spécifiques des principales mutations ponctuelles connues. Les sondes sont fixées sur une bandelette. La révélation des hybrides

est enzymatique et se traduit par une réaction colorée. Les résultats sont obtenus en 24 heures (De Beenhouwer et coll., 1995). La technique est commercialisée sous la forme d'un coffret prêt à l'emploi pour la détection de la résistance à la rifampicine (InnoLipaRifTB, InnoGenetics) qui résulte de mutations groupées dans une région bien délimitée du gène *rpoβ*. Ses résultats sont fiables (De Beenhouwer et coll., 1995 ; Cooksey et coll., 1997), d'autant plus qu'il est possible de l'appliquer directement aux prélèvements riches en bacilles. Onéreuse et délicate, la technique LIPA est employée par des laboratoires entraînés où elle est habituellement réservée aux malades suspects de multirésistance.

Lorsque les mutations impliquées dans la résistance sont localisées sur de longues séquences nucléotidiques, voire sur plusieurs gènes, elles ne peuvent être détectées par simple amplification et hybridation. C'est le cas pour la résistance à l'isoniazide et à un moindre degré pour la résistance au pyrazinamide (Ramaswamy et Musser, 1998). Le développement récent de biopuces à ADN permettant l'hybridation de l'ADN amplifié avec des milliers de sondes greffées sur une petite surface pourrait constituer dans un proche avenir un outil intéressant de détection rapide de la résistance de *M. tuberculosis* (Troesch et coll., 1999 ; Sougakoff et coll., 2004).

Nouveaux moyens de dépistage de l'infection

Mise au point dans l'espoir de remplacer le test cutané à la tuberculine connu pour son manque de spécificité (il ne distingue pas infection et immunisation par le BCG), la mesure de la production d'interféron gamma après stimulation *in vitro* des lymphocytes sanguins, comparée avec les résultats des tests cutanés à la tuberculine, donne de médiocres résultats lorsque la stimulation est effectuée avec de la tuberculine PPD (test QuantiFERON[®]-TB). Le test ne permet pas d'identifier correctement les malades et les infectés, ni de différencier les malades des vaccinés (Brock et coll., 2001 ; Bellete et coll., 2002). La stimulation effectuée par des antigènes spécifiques de *M. tuberculosis* (ESAT-6, CFP-10...) pourrait permettre de différencier les personnes infectées de celles immunisées par le BCG, mais les résultats sont encore très limités (Lalvani et coll., 2001 ; Ewer et coll., 2003).

Outils de traçabilité

La traçabilité des cas de tuberculose a longtemps été basée sur la description des cas, l'appréciation de leur contagiosité (positivité de l'examen microscopique), le dépistage de l'infection dans l'entourage des cas, en particulier par des tests tuberculiniques, en tenant compte de l'histoire naturelle de la maladie (délais entre contagion, positivation des tests tuberculiniques et

maladie). L'emploi de marqueurs phénotypiques tels que le lysotype et le profil de résistance aux antituberculeux a pu être utile dans certaines situations pour repérer des souches de comportement similaire évoquant un lien épidémiologique. Le faible pouvoir discriminant de ces marqueurs phénotypiques a motivé la mise au point de plusieurs techniques génotypiques pour *M. tuberculosis*. Ces techniques ont pour but de comparer des souches sur la base de leur génome (empreinte digitale génomique), et non plus de leurs caractères phénotypiques, pour en évaluer la similitude. Le but est de contribuer à l'étude de la transmission de la tuberculose dans les institutions (hôpitaux, prisons, foyers pour personnes sans domicile fixe...), et dans la communauté, en complément des méthodes épidémiologiques traditionnelles (recherche de contacts entre les malades) qui restent indispensables.

Méthodes

L'analyse des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (RFLP, pour *restriction fragment length polymorphism*) est la méthode la plus utilisée. Elle consiste à déterminer le nombre et la taille des fragments de restriction obtenus à partir de l'ADN chromosomique qui sont porteurs de séquences d'insertion répétées IS6110 spécifiques du complexe *M. tuberculosis* (Hermans et coll., 1990 ; Otal et coll., 1991 ; Cave et coll., 1994). En effet, les séquences d'insertion répétées IS6110 sont en nombre et localisation variables selon les souches. L'analyse par RFLP est une méthode longue et délicate en raison des multiples étapes qu'elle implique : extraction de l'ADN, digestion, électrophorèse, transfert sur membrane, hybridation et révélation. Certaines souches ont un nombre limité de séquences IS6110 et, par conséquent, ne peuvent être analysées par RFLP (Yuen et coll., 1993 ; Das et coll., 1995). Néanmoins, l'analyse RFLP à l'aide des séquences d'insertion IS6110 reste à ce jour la méthode de référence dans les études épidémiologiques de la tuberculose. La standardisation de cette méthode a permis de constituer des banques internationales de profils d'hybridation, ce qui permet de repérer la diffusion de certains clones dans la population.

Des méthodes plus rapides, basées sur l'amplification par *polymerase chain reaction* (PCR) de régions de l'ADN du génome de *M. tuberculosis*, ont été proposées. Les plus connues sont basées sur l'amplification de régions connues de l'ADN (Haas et coll., 1993 ; Palittapongarnpim et coll., 1993 ; Linton et coll., 1994) :

- régions *direct repeat*, ou DR, dans lesquelles il y a un nombre variable (maximum 49) de fragments d'ADN intercalés (« *spacer* ») entre des séquences répétées (*spoligotyping*, pour *spacer oligonucleotide typing*) (Bonora et coll., 1999) ;
- douze régions dans lesquelles il y a un nombre variable de fragments répétés de 52 à 77 nucléotides (MIRU-VNTR pour *variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units*) (Ross et coll., 1992 ; Van Soolingen et coll., 1993 ; Friedman et coll., 1995 ; Sahadevan et coll., 1995 ;

Mazars et coll., 2001). L'inconvénient de ces méthodes d'amplification est le risque de contamination de l'ADN de *M. tuberculosis* par de l'ADN étranger, ce qui peut gêner considérablement l'interprétation des profils. De plus, ces méthodes, sauf peut-être le MIRU-VNRT, sont globalement moins discriminantes que l'analyse RFLP.

La technique RFLP a été largement utilisée lors d'épidémies de tuberculose nosocomiale (Beck-Sague et coll., 1992 ; Pearson et coll., 1992 ; Coronado et coll., 1993), pour établir la distribution géographique de souches de *M. tuberculosis* (Hermans et coll., 1995 ; Van Soolingen et coll., 1995 et 1999 ; Mazars et coll., 2001), pour dépister ou confirmer des cas de transmission communautaire de tuberculose (Tabet et coll., 1994 ; Kline et coll., 1995), et pour distinguer une réactivation endogène (reprise d'une ancienne infection) d'une réinfection exogène (récidive avec une nouvelle souche) chez une personne faisant des épisodes successifs de tuberculose (Small et coll., 1993 ; Godfrey-Faussett et coll., 1994).

Applications

L'analyse RFLP offre plusieurs applications intéressantes.

Étude d'une contamination croisée au laboratoire

L'analyse RFLP est utile pour prouver les contaminations croisées au laboratoire, qui sont en général la conséquence de manipulations successives d'un prélèvement très riche en bacilles, par exemple d'une expectoration très positive à l'examen microscopique, puis de prélèvements négatifs (Wurtz et coll., 1996). Ces contaminations sont suspectées lorsque la positivité de la culture d'un prélèvement n'est pas en adéquation avec l'histoire du malade après confrontation microbio-clinique, confrontation qui doit être la règle pour tout diagnostic microbiologique positif de tuberculose.

Étude des souches de bacilles tuberculeux successivement isolées chez un même malade faisant plusieurs épisodes de tuberculose

Par l'analyse RFLP, il est possible de distinguer une réactivation endogène (reprise d'une ancienne infection avec une souche identique à celle du premier épisode) d'une réinfection exogène (récidive avec une nouvelle souche), ce qui peut être utile lorsque les souches ne sont pas manifestement différentes sur la base de critères évidents (profil de résistance par exemple) (Small et coll., 1993 ; Lemaitre et coll., 1996a ; Van Rie, 1999 ; Fitzpatrick et coll., 2002 ; Kruuner et coll., 2002). À partir des études publiées, on peut schématiquement opposer deux types de situations. Dans les situations où l'incidence de la tuberculose est faible, les réinfections sont très rares chez les sujets immunocompétents, mais peuvent survenir chez les immunodéprimés (VIH⁺). En revanche, dans les situations où l'incidence de l'infection est élevée, les réinfections ne sont pas rares.

Étude de la transmission de la tuberculose dans des communautés fermées

L'analyse RFLP a été très largement utilisée lors des épidémies nosocomiales de tuberculose multirésistante décrites aux États-Unis et en France (Beck-Sague et coll., 1992 ; Pearson et coll., 1992 ; Bouvet et coll., 1993 ; Coronado et coll., 1993 ; Lemaitre et coll., 1996b). Au cours de ces épidémies, l'analyse RFLP a été utilisée pour confirmer le lien entre des cas déjà reliés sur des arguments épidémiologiques ou sur des caractères remarquables, comme un phénotype inhabituel de résistance aux antituberculeux. L'analyse RFLP a également permis de démontrer la transmission de la tuberculose dans les foyers de personnes sans domicile fixe (Dwyer et coll., 1993 ; Lemaitre et coll., 1998), de personnes VIH⁺ (Daley et coll., 1992) et dans les prisons (CDC, 1992).

Étude de la transmission de la tuberculose dans la population générale

Des enquêtes systématiques utilisant l'analyse RFLP ont été réalisées pour rechercher de manière systématique dans une population urbaine des souches de bacilles tuberculeux génétiquement reliées, c'est-à-dire ayant les mêmes empreintes digitales génomiques (Alland et coll., 1994 ; Small et coll., 1994 ; Mazars et coll., 2001). Dans ces enquêtes, l'analyse RFLP trouve souvent une proportion de malades « bactériologiquement liés » bien supérieure à celle des malades que l'enquête épidémiologique classique permet de suspecter comme « épidémiologiquement liés ». Cette différence s'explique par le fait que pour des cas bactériologiquement liés, le lien épidémiologique peut être :

- direct (contaminant/contaminé) mais non trouvé par une enquête épidémiologique insuffisante ;
- indirect, à travers un ou plusieurs autres cas qui sont des « chaînons manquants » de la chaîne de transmission.

Plus l'enquête systématique sur des souches est restreinte dans le temps ou l'espace, plus la probabilité de ne pas mettre en évidence de lien épidémiologique (contact) pour des cas dont les souches paraissent identiques est élevée.

Les études systématiques en population « entière » (ex. : quartiers, villes, départements, voire pays) permettent aussi de déterminer la proportion des cas de tuberculose qui sont regroupés en grappes (ou *clusters*) pour lesquelles les souches ont des empreintes digitales génomiques identiques. Cette proportion est réputée être plutôt le reflet de transmissions récentes même si, comme il a été dit plus haut, le lien épidémiologique entre les cas groupés n'est pas, loin de là, toujours mis en évidence si l'on mène une enquête épidémiologique classique. Les autres cas, dont chacun correspond à une souche d'empreinte digitale génomique distincte, sont eux réputés être plutôt le résultat de réactivations d'infections anciennes (Alland et coll., 1994 ; Small et coll., 1994).

Il faut remarquer que si l'on veut être rigoureux, la proportion de cas retenus comme probablement de transmission récente doit être calculée en retranchant un cas de chacune des grappes, puisque le cas supposé être le cas index

peut être considéré comme une réactivation (Small et coll., 1994). Par exemple, si l'on a 20 grappes de 2 cas chacune, cela fait 10 cas supposés de transmission récente et 10 cas index de réactivation.

En utilisant cette base de calcul, la proportion de cas de transmission récente a été de 31 % à San Francisco en 1991-1992 (Small et coll., 1994), de 27 % dans le Bronx à New York en 1991-1992 (Alland et coll., 1994), de 15 % en Gironde sur 221 cas en 1997-1998 (Texier-Maugein et Bebear, 2000) et de 13 % dans le Val-de-Marne sur 358 cas en 1997-1999 (Boucher et coll., 2000). Dans les deux études américaines, une enquête témoin a permis de trouver plusieurs facteurs indépendants associés au caractère groupé : malades plus jeunes, VIH⁺, naissance aux États-Unis, groupe hispanique ou noir, revenu médian de la famille moins élevé.

Dans une étude récente (Geng et coll., 2002) menée entre 1990 et 1999 dans un quartier nord de New York, où s'installent de nombreux émigrants récents (29 000 nouveaux résidents entre 1990 et 1994, dont 82 % venant de République Dominicaine), 261 des 546 cas inclus étaient répartis en 51 grappes (moyenne 5 cas par grappe). Les facteurs indépendants associés au caractère groupé étaient : malades plus jeunes, naissance aux États-Unis, diagnostic fait avant 1993 et malades sans domicile fixe, VIH⁺ pour les malades nés à l'étranger. Fait intéressant, la proportion de cas groupés a diminué de 63 % en 1993 à 31 % en 1999 dans ce quartier, alors que le nombre total de cas de tuberculose à New York était divisé par 3, par suite du programme associant traitement standardisé et supervisé, et organisation de la lutte antituberculeuse.

En conclusion, en pratique, les outils biologiques essentiels sur lesquels reposent le diagnostic de la tuberculose maladie et les prises de décision thérapeutiques restent les outils de bactériologie classique, microscopie et culture. Les outils moléculaires permettent d'accélérer efficacement l'identification des mycobactéries vues à l'examen microscopique ou isolées en culture, et de comparer les empreintes digitales génomiques des souches de bacilles tuberculeux, ce qui est d'un grand intérêt épidémiologique.

En revanche, les outils moléculaires ne sont pas, à ce jour, pertinents pour diagnostiquer les cas de tuberculose à examen microscopique négatif et a fortiori à culture négative.

BIBLIOGRAPHIE

ALLAND D, KALKUT GE, MOSS AR, MCADAM RA, HAHN JA et coll. Transmission of tuberculosis in New York City. An analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. *N Engl J Med* 1994, **330** : 1710-1716

ALMEIDA A, BRAGA R, MALHEIRO O, PAZ JG. Evaluation of an automated system MB/BacT (Organon Teknika) for susceptibility of Mycobacterium tuberculosis Abstract P110. 20th annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Lucerne-Switzerland 1999

AMICOSANTE M, HOUDE M, GUARALDI G, SALTIMI S. Sensitivity and specificity of a multi antigen Elisa test for the serological diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, **3** : 736-740

AUSINA V, GAMBOA F, GAZAPO E, MANTEROLA JM, LONCA J et coll. Evaluation of the semiautomated Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 1996-2002

BARNES PF. Rapid diagnostic test for tuberculosis. Progress but not gold standard. *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155** : 1497-1498

BECK-SAGUE C, DOOLEY SW, HUTTON MD, OTTEN J, BREEDEN A et coll. Hospital outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections. *JAMA* 1992, **268** : 1280-1286

BELLETE B, COBERLY J, BARNES GL, KO C, CHAISSON RE et coll. Evaluation of a whole-blood interferon-gamma release assay for the detection of Mycobacterium tuberculosis infection in 2 study populations. *Clin Infect Dis* 2002, **34** : 1449-1456

BERGMANN JS, WOODS GL. Reliability of Mycobacteria Growth Indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to ethambutol and streptomycin. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 3325-3327

BODMER T, GURTNER A, SCHOPFER K, MATTER L. Screening of respiratory tract specimens for the presence of Mycobacterium tuberculosis by using the Gen-Probe amplified Mycobacterium tuberculosis direct test. *J Clin Microbiol* 1994, **32** : 1483-1487

BONORA S, DI PERRI G, VINCENT V, GUTIERREZ MC, CONCIA E. Use of spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1999, **28** : 939-940

BOTHAMLEY GH. Serological diagnosis of tuberculosis. *Eur Respir J* 1995, **8** : 676-688

BOUCHER J, DEFORGES L, FEUR E, BOUALLEGUE O, LASCOLS C et coll. A one year prospective study using molecular strain typing for the evaluation of tuberculosis transmission in a Paris suburb. 20^e réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris 2000

BOUVET E, CASALINO E, MENDOZA-SASSI G, LARIVEN S, VALLEE E et coll. A nosocomial outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium bovis among HIV-infected patients. A case-control study. *AIDS* 1993, **7** : 1453-1460

BRISSON-NOËL A, AZNAR C, CHUREAU C, NGUYEN S, PIERRE C et coll. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991, **338** : 364-366

BROCK I, MUNK ME, KOK-JENSEN A, ANDERSEN P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001, **5** : 462-467

BROOKS J, DANESHVAR M, FAST DM, GOOD RC. Selective procedures for detecting femtomole quantities of tuberculostearic acid in serum and cerebrospinal fluid by frequency-pulsed electron capture gas-liquid chromatography. *J Clin Microbiol* 1987, **35** : 1201-1206

BRUNELLO F, FAVARI F, FONTANA R. Comparison of the MB/BacT and Bactec 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 1206-1209

CAMBAU E, WICHLACZ C, TRUFFOT-PERNOT C, JARLIER V. Evaluation of the New MB Redox System for detection of growth of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 2013-2015

CANETTI G, RIST N, GROSSET J. Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. *Rev Tuberc Pneum* 1963, **27** : 217-272

CANTANZARO A, DAVIDSON BL. Rapid diagnostic test for tuberculosis. What is the appropriate use ? *Am J Respir Crit Care Med* 1997, **155** : 1804-1814

CASAL M, GUTIERREZ J, VAQUERON M. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Löwenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from specimens. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997, **1** : 81-84

CAVE MD, EISENACH KD, TEMPLETON G, SALFINGER M, MAZUREK G et coll. Stability of DNA fingerprints pattern produced with IS6110 in strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1994, **32** : 262-266

CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC). Transmission of multiple-drug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system--New York, 1991. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992, **41** : 507-509

CHAN S, REGGIARDO Z, DANIEL TM, GIRLING DJ, MITCHISON DA. Serodiagnosis of tuberculosis using an ELISA with antigen 5 and a hemagglutination assay with glycolipid antigens. *Am Rev Respir Dis* 1990, **142** : 385-390

CHANTEAU S, RASOLOFO V, RASOLONAVALONA T, RAMAROKOTO H, HORN C et coll. 45/47 kilodalton (APA) antigen capture and antibody detection assays for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000, **4** : 377-383

CHIN DP, YASKO DM, SANDERS CA, NASSOS PS, MADEJ JJ et coll. Clinical utility of a commercial test based on the polymerase chain reaction for detecting *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Am J Respir Crit Care Med* 1995, **151** : 1872-1877

CLARRIDGE JE, SHAWAR RM, SHINNICK TM, PLIKAYTIS BB. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of mycobacterium tuberculosis in a routine mycobacteriology laboratory. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 2049-2056

COOKSEY RC, MORLOCK GP, GLICKMAN S, CRAWFORD J. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of rpoB mutations in rifampicin resistant *Mycobacterium tuberculosis* from New York City. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 1281-1283

CORONADO VG, BECK-SAGUE CM, HUTTON MD, DAVIS BJ, NICHOLAS P et coll. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* among persons with human immunodeficiency virus infection in an urban hospital : epidemiologic and restriction fragment length polymorphism analysis. *J Infect Dis* 1993, **168** : 1052-1055

CUTLER RR, WILSON P, VILLARROEL J, CLARKE FV. Evaluating current methods for determination of the susceptibility of mycobacteria to pyrazinamide, conventional, radiometric Bactec and two methods of pyrazinamidase testing. *Lett Appl Microbiol* 1997, **24** : 127-132

DALEY CL, SMALL PM, SCHECTER GF, SCHOOLNIK GK, MCADAM RA et coll. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. *N Engl J Med* 1992, **326** : 231-235

D'AMATO RF, WALLMAN AA, HOCHSTEIN LH, COLANINNO PM, SCARDAMAGLIA M et coll. Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995, **33** : 1832-1834

DANIEL TM, DEBANNE SM. The serodiagnosis of tuberculosis and other mycobacterial diseases by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Respir Dis* 1987, **135** : 1137-1151

DAS S, PARAMASIVAN CN, LOWRIE DB, PRABHAKAR R, NARAYANAN PR. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. *Tuber Lung Dis* 1995, **76** : 550-554

DE BEENHOUWER H, LHIANG Z, JANNES G, MIJS W, MACHTELINCKX L et coll. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. *Tuberc Lung Dis* 1995, **76** : 425-430

DWYER B, JACKSON K, RAIOS K, SIEVERS A, WILSHIRE E et coll. DNA restriction fragment analysis to define an extended cluster of tuberculosis in homeless men and their associates. *J Infect Dis* 1993, **167** : 490-494

EBRAHIMZADEH E, HANNA BA, HEIFETS LB, JAHN EIM, PALICOVA F et coll. Multicenter evaluation of the Bactec 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to front line drugs. Abstract OC35. 20th annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Lucerne-Switzerland 1999

ENARSON DA, REIDER HL, ARNADOTTIR T, TREBUCQ A. Tuberculosis guide for low income countries. 4th ed. IUATLD, Paris 1996

EWER K, DEEKS J, ALVAREZ L, BRYANT G, WALLER S et coll. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003, **361** : 1168-1173

FITZPATRICK LK, OKWERA A, MUGERWA R, RIDZON R, ELLNER J, ONORATO I. An investigation of suspected exogenous reinfection in tuberculosis patients in Kampala, Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002, **6** : 550-551

FORBES BA, HICKS KE. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in a clinical laboratory by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 1688-1694

FRENCH GL, CHAN CY, CHEUNG SW, OO KT. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of tuberculostearic acid in sputum by using gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring. *J Infect Dis* 1987, **156** : 356-362

FRIEDMAN CR, STOECKLE MY, JOHNSON WD Jr, RILEY LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995, **33** : 1383-1384

GENG E, KREISWIRTH B, DRIVER C, LI J, BURZYNSKI J, DELLALATTA P et coll. Changes in the transmission of tuberculosis in New York city from 1990 to 1999. *N Engl J Med* 2002, **346** : 1453-1458

GODFREY-FAUSSETT P, GITHUI W, BATCHELOR B, BRINDLE R, PAUL J et coll. Recurrence of HIV-related tuberculosis in an endemic area may be due to relapse or reinfection. *Tuberc Lung Dis* 1994, **75** : 199-202

GOTO M., OKA S, OKUZUMI K, KIMURA S, SHIMADA K. Evaluation of acridinium-ester-labeled DNA probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 1991, **29** : 2473-2476

GOUNDER C, DE QUEIROZ MELLO FC, CONDE MB, BISHAI WR, KRITSKI AL et coll. Field evaluation of a rapid immunochromatographic test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2002, **40** : 1989-1993

GROSSET J, BOISVERT H, TRUFFOT-PERNOT C. Mycobactéries. In : Bactériologie médicale. LE MINOR L, VERON M eds, Flammarion, Paris 1990 : 965-1017

HANNA BA, EBRAHIMZADEH A, ELLIOTT LB, MORGAN MA, NOVAK SM et coll. A. Multicenter evaluation of the MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 748-752

HAAS WH, BUTLER WR, WOODLEY CL, CRAWFORD JT. Mixed-linker polymerase chain reaction : a new method for rapid fingerprinting of isolated of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 1293-1298

HEIFETS LB, CANGELOSI GA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* : a neglected problem at the turn of the century. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, **3** : 564-581

HERMANS PW, VAN SOOLINGEN D, DALE JW, SCHUIITEMA AR, MCADAM RA et coll. Insertion element IS986 from *Mycobacterium tuberculosis* : a useful tool for diagnosis and epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1990, **28** : 2051-2058

HERMANS PW, MESSADI F, GUEBREXABHER H, VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PEW et coll. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and The Netherlands : usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995, **171** : 1504-1513

ICHIYAMA S, ITO Y, SUGIURA F, IINUMA Y, YAMORI S et coll. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 3082-3085

INDERLIED CB, SALFINGER M. Antimicrobial agents and susceptibility tests : mycobacteria. In : Manual of clinical microbiology. 6th ed. chapter 119. MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH eds, American Society for Microbiology, Washington DC 1995 : 1385-1404

JONAS V, ALDEN MJ, CURRY JI, KAMISANGO K, KNOTT CA et coll. Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis directly from sputum specimens by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 2410-2416

JOUVESHOMME S, CAMBAU E, TRYSTRAM D, SZPYTMA M, SOUGAKOFF W et coll. Clinical utility of an amplification test based on ligase chain reaction in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998, **158** : 1096-1101

KLINE SE, HEDEMARK LL, DAVIES SF. Outbreak of tuberculosis among regular patrons of a neighborhood bar. *N Engl J Med* 1995, **333** : 222-227

KONNO K. New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science* 1956, **124** : 985

KRUUNER A, PEHME L, GHEBREMICHAEL S, KOIVULA T, HOFFNER SE, MIKELSAAR M. Use of molecular techniques to distinguish between treatment failure and exogenous reinfection with Mycobacterium tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2002, **35** : 146-154

LALVANI A, PATHAN AA, DURKAN H, WILKINSON KA, WHELAN A et coll. Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Lancet* 2001, **357** : 2017-2021

LANDOWSKI CP, GODFREY HP, BENTLEY-HIBBERT SI, LIU X, HUANG Z et coll. Combinatorial use of antibodies to secreted mycobacterial proteins in a host immune system-independent test for tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2001, **39** : 2418-2424

LARSSON L, ODHAM G, WESTERDAHL G, OLSSON B. Diagnosis of pulmonary tuberculosis by selected-ion monitoring : improved analysis of tuberculostearate in sputum using negative-ion mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 1987a, **25** : 893-896

LARSSON L, SONESSON A, JIMENEZ J. Ultrasensitive analysis of microbial fatty acids using gas chromatography with electron capture detection. *Eur J Clin Microbiol* 1987b, **6** : 729-731

LEBRUN L, ESPINASSE F, POVEDA JD, VINCENT-LEVY-FREBAULT V. Evaluation of nonradioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992, **30** : 2476-2478

LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, TRUFFOT C, GROSSET J, JARLIER V. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) de souches de Mycobacterium tuberculosis isolées de malades ayant fait plusieurs épisodes de tuberculose. *Pathol Biol* 1996a, **44** : 452-455

LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, COETMEUR D, VAUCEL J, JARLIER V, GROSSET J. Nosocomial transmission of tuberculosis among mentally-handicapped patient in long-term facility. *Tuber Lung Dis* 1996b, **77** : 531-536

LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, TRUFFOT-PERNOT C, CAMBAU E, DERENNE JPH et coll. Use of DNA fingerprinting for primary surveillance of nosocomial tuberculosis in a large urban hospital : detection of outbreaks in homeless people and migrant workers. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998, **2** : 390-396

LEPEUPLE A, VIVIEN JN, THIBIER R. Recherches bactériologiques initiales dans un traitement ambulatoire correct. *Rev Tub Pneumol* 1970, **34** : 664-665

LINTON CJ, JALAL H, LEEMING JP, MILAR MR. Rapid discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* strains by Random Amplified Polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1994, **32** : 2169-2174

MATHUR ML, LOBUE PA, CATANZARO A. Evaluation of a serologic test for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, **3** : 732-735

MAZARS E, LESJEAN S, BANULS A, GILBERT M, VINCENT V et coll. High resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98** : 1901-1906

MIDDLETON AM, CHADWICK MV, GAYA H. Comparison of MB/BacT and Bactec 460 TB for the susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. Abstract P108. 20th annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, Lucerne-Switzerland 1999

MORGAN MA, HORSTMEIER CD, DE YOUNG DR, ROBERTS GD. Comparison of a radio-metric method (Bactec) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983, **18** : 384-388

NOLTE FS, METCHOCK B, MCGOWAN JE Jr, EDWARDS A, OKWUMABUA O et coll. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 1777-1782

NOLTE FS, METCHOCK B. *Mycobacterium*. In : Manual of clinical microbiology, 6th ed., chapter 34. MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH eds, American Society for microbiology, Washington DC 1995 : 400-437

NOORDHOEK GT, VAN EMBDEN JD, KOLK AH. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis* : an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol* 1996, **34** : 2522-2525

OTAL I, MARTIN C, VINCENT-LEVY-FREBAULT V, THIERRY D, GICQUEL B. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1991, **29** : 1252-1254

PALITTAPONGARNPIM P, CHOMYC S, FANNING A, KUNIMOTO D. DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1993, **167** : 975-978

PALOMINO JC, TRAORE H, FISSETTE K, PORTAELS F. Evaluation of *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, **3** : 344-348

PARROT R, GROSSET J, AUGIER J, MEYER L. Le rôle et la place des informations bactériologiques dans l'identification des sources de contagion. *Rev Fr Mal Resp* 1976, **4** : 289-304

PEARSON ML, JEREB JA, FRIEDEN TR, CRAWFORD JT, DAVIS BJ et coll. Nosocomial transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. A risk to patients and health care workers. *Ann Intern Med* 1992, **117** : 191-196

- PFYFFER GE, KISSLING P, WIRTH R, WEBER R. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis Complex in respiratory specimens by a target-amplified test system. *J Clin Microbiol* 1994, **32** : 918-923
- PFYFFER GE, WELSCHER HM, KISSLING P, CIESLAK C, CASAL MJ et coll. Comparison of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 364-368
- PFYFFER GE, BONATO DA, EBRAHIMZADEH A, GROSS W, HOTALING J et coll. Multi-center laboratory validation of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis against classical second line and newer antimicrobial drugs by using the Radiometric 460 technique and the proportion method with solid media. *J Clin Microbiol* 1999a, **37** : 3179-3186
- PFYFFER GE, FUNKE-KISSLING P, RUNDLER E, WEBER R. Performance characteristics of the BD Probe Tec System for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1999b, **37** : 137-140
- PIERSIMONI C, MORBIDUCCI V, DE SIO G, SCALISE G. Comparative evaluation of the MB-check system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992, **11** : 1174-1177
- PORTAELS F. Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatol* 1995, **13** : 207-222
- RAMASWANY S, MUSSER JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in Mycobacterium tuberculosis : 1998 update. *Tubercle Lung Dis* 1998, **79** : 3-29
- ROBERTS GD, GOODMAN NL, HEIFETS L, LARSH HW, LINDER TH et coll. Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis from acid-fast smear-positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983, **18** : 689-696
- ROGGENKAMP A, HORNER MW, MASCH A, AIGNER B, AUTENRIETH IB, LESEMANN J. Comparison of MB/BacT and Bactec 460TB systems for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 3711-3712
- ROHNER P, NINET B, METRAL C, EMLER S, AUCKENTHALER R. Evaluation of the MB/BacT System and comparison to the Bactec 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 3127-3131
- ROSS BC, RAIOS K, JACKSON K, DWYER B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from Mycobacterium tuberculosis and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992, **30** : 942-946
- SAHADEVAN R, NARAYANAN S, PARAMASIVAN CN, PRABHAKAR R, NARAYANAN PR. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of Direct-repeat probe. *J Clin Microbiol* 1995, **33** : 3037-3039
- SARMIENTO O, WEIGLE K, ALEXANDER J, WEBER D, MILLER W. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnostic of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003, **41** : 3233-3240
- SHAW JB, WYNN-WILLIAMS N. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. *Am Rev Tuberc* 1954, **69** : 724-732

SHINNICK TM, GOOD RC. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994, **13** : 884-901

SIDDIQI SH, HWANGBO CC, SILCOX V, GOOD RC, SNIDER DE Jr, MIDDLEBROOK G. Rapid radiometric methods to detect and differentiate *Mycobacterium tuberculosis*/M. bovis from other mycobacterial species. *Am Rev Respir Dis* 1984, **130** : 634-640

SIMONNEY N, MOLINA JM, MOLIMARD M, OKSENHENDLER E, LAGRANGE PH. Comparison of A60 and three glycolipid antigens in an ELISA test for tuberculosis. *Clin Microbiol Infect* 1996, **2** : 214-222

SIMONNEY N, MOLINA JM, MOLIMARD M, OKSENHENDLER E, LAGRANGE PH. Circulating immune complexes in human tuberculosis sera : demonstration of specific antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* glycolipid (DAT, PGLTb1, LOS) antigens in isolated circulating immune complexes. *Eur J Clin Invest* 1997, **27** : 128-134

SMALL PM, SHAFER RW, HOPEWELL PC, SINGH SP, MURPHY MJ et coll. Exogenous reinfection with multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993, **328** : 1137-1144

SMALL PM, HOPEWELL PC, SINGH SP, PAZ A, PARSONNET J et coll. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med* 1994, **330** : 1703-1709

SOMI GR, O'BRIEN RJ, MFINANGA GS ET IPUGE YA. Evaluation of the Mycodot test in patients with suspected tuberculosis in a field setting in Tanzania. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999, **3** : 231-238

SOMOSKOVI A, MAGYAR P. Comparison of the mycobacteria growth indicator tube with MB redox, Löwenstein-Jensen and Middlebrook 7H11 media for recovery of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 1366-1369

SOUGAKOFF W, RODRIGUE M, TRUFFOT-PERNOT C, RENARD M, DURIN N et coll. Use of a high-density DNA probe array for detecting mutations involved in rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2004, **10** : 289-294

STARKE JR, HEIFETS LD. Navigating through laboratory reports : expectations, dreams and realities. *Semin Respir Crit Care Med*, 1997, **18** : 509-522

TABET SR, GOLDBAUM GM, HOOTON TM, EISENACH KD, CAVE MD et coll. Restriction fragment length polymorphism analysis detecting a community-based tuberculosis outbreak among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1994, **169** : 189-192

TEXIER-MAUGEIN J, BEBEAR C. La transmission de la tuberculose : nouvelle approche par le RFLP. Colloque La tuberculose en France en l'an 2000

TORTOLI E, CICHERO P, PIERSIMONI C, SIMONETTI MT, GESU G, NISTA D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens : multicenter study. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 3578-3582

TROESCH A, NGUYEN H, MIYADA CG, DESVARENNE S, GINGERAS TR et coll. Mycobacterium species identification and rifampicin resistance testing with high density DNA probe assays. *J Clin Microbiol* 1999, **37** : 49-55

VAN RIE A., WARREN R, RICHARDSON M, VICTOR TC, GIE RP et coll. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999, **341** : 1174-1179

VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PEW, HERMANS PWM, GROENEN PMA, VAN EMBDEN JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 1987-1995

VAN SOOLINGEN D, QIAN L, DE HAAS PEW, DOUGLAS JT, TRAORE H et coll. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol* 1995, **33** : 3234-3238

VAN SOOLINGEN D, BORGDORFF MW, DE HAAS PE, SEBEK MM, VEEN J et coll. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands : a nation wide study from 1993 to 1997. *J Infect Dis* 1999, **180** : 726-736

VUORINEN P, MIETTINEN A, VUENTO R, HALLSTRÖM O. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens by Gen Probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* Direct test and Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test. *J Clin Microbiol* 1995, **33** : 1856-1859

WALTERS SB, HANNA BA. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by *Mycobacterium* growth indicator tube method. *J Clin Microbiol* 1996, **34** : 1565-1567

WOBESER WL, KRAJDEN M, CONLY J, SIMPSON H, YIM B et coll. Evaluation of Roche Amplicor PCR Assay for *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1996, **34** : 134-139

WOODS GL, FISH G, PLAUNT M, MURPHY T. Clinical evaluation of Difco ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1997, **35** : 121-124

WURTZ R, DEMARAIS P, TRAINOR W, MCAULEY J, KOCKA F et coll. Specimen contamination in mycobacteriology laboratory detected by pseudo-outbreak of multidrug-resistant tuberculosis : analysis by routine epidemiology and confirmation by molecular technique. *J Clin Microbiol* 1996, **34** : 1017-1019

YUEN LKW, ROSS BC, JACKSON KM, DWYER B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J Clin Microbiol* 1993, **31** : 1615-1618