

PLACE DES OUTILS MOLÉCULAIRES DANS LE DIAGNOSTIC, LE TRAITEMENT ET L'ÉPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À MYCOBACTÉRIES

N. VEZIRIS, A. AUBRY, W. SOUGAKOFF, C. TRUFFOT-PERNOT, V. JARLIER

Med Trop 2004; 64 : 243-250

OUTILS POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT

Identification

L'identification des mycobactéries obtenues en culture pure repose classiquement sur l'étude des caractères culturels (temps de croissance, morphologie et pigmentation des colonies) et biochimiques. Trois épreuves biochimiques simples (Grosset *et Coll*, 1990 ; Nolte et Metchok, 1995) permettent de faire la distinction entre bacilles du complexe tuberculosis et mycobactéries non tuberculeuses (MNT) dites « atypiques » : 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-amino-salicylique (PAS).

L'espèce *M. tuberculosis*, principale responsable de la TB maladie humaine (Starke et Heifets, 1997 ; Shinnick et Good, 1994 ; Portaels, 1995) 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, le bacille tuberculeux (BT) a une activité catalasique thermolabile (après chauffage pendant 20 min à 68°C) et une activité nitrate réductase. Il est naturellement résistant à l'hydrazide de l'acide thiophène carboxylique (TCH) et naturellement sensible au PAS (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 (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 un 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 mâte, 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, 1990).

Au sein des MNT, l'identification de l'espèce par moyens traditionnels est longue et fastidieuse (vitesse de croissance, pigmentation, caractères biochimiques...).

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 un outil fiable 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* var. BCG (Grosset *et Coll*, 1990 ; Nolte et Metchok, 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. Depuis peu, trois nouvelles trousse pour l'identification moléculaire des mycobactéries ont été commercialisées. Toutes trois sont basées sur l'amplification de l'ADN et l'hybridation avec des sondes spécifiques fixées sur bandelette, révélée par colorimétrie :

- INNO-LIPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics), dont la cible est l'espace 16s-23s de l'ARN, et qui permet d'identifier 16 espèces ;

- GENOTYPE MYCOBACTERIUM (Hain Lifescience), dont la cible est l'ARNr 23s, et qui permet d'identifier 13 espèces ;

- GENOTYPE MTBC (Hain Lifescience), basé sur une PCR multiplex dont les cibles sont le gène ARNr 23s (Mtb complex), la région RD1 (*M. bovis*) et le gène *gyrB*

• Travail du Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière (N.V., A.A., W.S., C.T.P., V.J., MD), Paris, France.

• Correspondance : V. JARLIER, Laboratoire de Bactériologie et Hygiène, Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France • Fax : +33 (0) 1 42 16 20 72

• E-mail : bacterio.hyg@psl.ap-hop-paris.fr •

(autres espèces du complexe Mtb : *M. tuberculosis*, *M. afri-canum*, *M. Canetti*). Ces outils moléculaires dont le coût est élevé, sont complémentaires du système Accuprobe cité ci-dessus, et seront précieux pour les laboratoires qui ont une forte activité de mycobactériologie.

Test de sensibilité aux antibiotiques ou antibiogrammes

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 une faible proportion de bacilles spontanément résistants ou mutants résistants (environ 1 bacille résistant pour 10^5 à 10^7 bacilles sensibles selon l'antibiotique) à chacun des antibiotiques. 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 tuberculeux. Lorsque l'antibiogramme est effectué à partir des colonies de la primo culture (antibiogramme « indirect »), ils 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 direc-

tement sur des tubes de milieu de culture avec et sans antibiotiques. Les résultats de l'antibiogramme sont alors disponibles en même temps que ceux de la primo culture, 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^e 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 d'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 additionnés d'antibiotiques et dans des flacons sans antibiotique (témoins) qui ont été ensemencés avec 100 fois moins de bactéries que les flacons avec antibiotiques (Nolte et Metchnik, 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 primo culture (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'ESP II System ont été proposés pour faire l'antibiogramme de *M. tuberculosis*. Ils sont en cours d'évaluation (Heifets et Cagelosi, 1999 ; Walters et Hanna, 1996 ; Palomino *et Coll*, 1999 ; Bergmann et Woods, 1997 ; Almeida *et Coll*, 1999 ; Middleton *et Coll*, 1999 ; Ebrahimzadeh *et Coll*, 1999). Les résultats sont disponibles 5 à 10 jours après la primo culture et, de manière générale, de bonne qualité pour l'isoniazide et la rifampicine.

Tests de résistance aux antibiotiques par biologie moléculaire

Les gènes codant la cible des principaux antibiotiques ainsi que la plupart des mutations responsables de la résistance ont été identifiés chez *M. tuberculosis* (Ramakrishna *et Coll*, 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 (« 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 (InnoLipa RifTB, InnoGenetics) qui résulte de mutations groupées dans une région bien délimitée du gène *rpoB*. Les 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 effectuée par des laboratoires entraînés où elle est habituellement réservée aux malades suspects de multi-résistance.

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).

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 des ARN 16S des mycobactéries (Roche Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* test) ;
- soit la réaction de ligation en chaîne (ligase chain reaction) d'une séquence d'ADN codant 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 (Amplified *M. tuberculosis* direct test 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 oeuvre tous les jours) mais ils sont malheureusement moins brillants que ce que la théorie laissait espérer. 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) (Nolte *et Coll*, 1993 ; Claridge *et Coll*, 1993 ; Forbes et Hicks, 1993 ; D'Amato *et Coll*, 1995 ; Ausina *et Coll*, 1997 ; Jonas *et Coll*, 1993 ; Vuorinen *et Coll*, 1995 ; Wobeser *et Coll*, 1996 ; Bodmer *et Coll*, 1994 ; Pfyffer *et Coll*, 1994 et 1999b ; Jouveshomme *et Coll*, 1998 ; Ichihama *et Coll*, 1997).

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 %.

La valeur prédictive positive (VPP) sur la base de cette sensibilité et spécificité, dépend bien évidemment de la prévalence de la TB maladie 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 LCR adressés aux laboratoires).

Les TAG peuvent utilement servir à identifier rapidement les bacilles tuberculeux 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 peuvent survenir. C'est d'ailleurs la seule indication d'un diagnostic par PCR retenue à ce jour par la Food and Drug Administration (FDA) des Etats-Unis (Barnes, 1997 ; Cantanzaro et Davidson, 1997).

Dans l'état actuel des choses, les TAG ne sont pas recommandés pour le diagnostic positif de la TB maladie en cas d'examen microscopique négatif car :

- un résultat négatif ne permet pas d'exclure le diagnostic de TB maladie ;
 - 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 « forte probabilité de TB maladie », 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 géniques 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 TB maladie ». L'objectif visé est d'atteindre une prévalence (« probabilité pré-test ») de la TB maladie d'au moins 10 % parmi les malades 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, radiologiques et épidémiologiques 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 dans les suspicions de TB maladie à examen microscopique négatif.

Il n'y a pas à ce jour d'outil moléculaire fiable et prêt à l'emploi pour le diagnostic des infections à MNT. Des évaluations sont en cours pour l'identification de *M. leprae* et *M. ulcerans* dans des lésions où l'on voit des bacilles à l'examen microscopique.

OUTILS POUR L'ÉPIDÉMIOLOGIE

La traçabilité des cas de TB maladie a longtemps été basée sur la description des cas, l'appréciation de leur contagiosité (positivité de l'examen microscopique), le dépistage des individus présentant une TB maladie ou une TB infection dans l'entourage des cas, en particulier par des tests tuberculiques, en tenant compte de l'histoire naturelle de la maladie (délais entre contagion, virage des tests tuberculiques et maladie). L'utilisation de marqueurs phénotypiques tels 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 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 établir la similitude. Le but est de contribuer à l'étude de la transmission de la TB maladie 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 par Restriction Length Fragment Polymorphism (RFLP) 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*. En effet, les séquences d'insertion répétées IS6110 sont en nombre et localisation variables selon les souches. Cette analyse 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, les résultats ne peuvent être interprétés (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 TB maladie. Grâce à la standardisation de cette méthode se sont constituées 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 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 :

- 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) ;

- 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) (Mazars *et Coll*, 2001 ; Van Soolingen *et Coll*, 1993 ; Ross *et Coll*, 1992 ; Sahadevan *et Coll*, 1995 ; Friedman *et Coll*, 1995). 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-VNTR, sont globalement moins discriminantes que la RFLP.

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

Applications

• Étude d'une contamination croisée au laboratoire

L'analyse par 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 (Wu *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 TB maladie.

• *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 TB maladie 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). A partir des études publiées on peut schématiquement opposer deux types de situations. Dans les situations où l'incidence de la TB maladie 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 la TB maladie est élevée, les réinfections ne sont pas rares.

• *Étude de la transmission de la tuberculose dans des communautés fermées*

L'analyse par RFLP a été très largement utilisée lors des épidémies nosocomiales de TB maladie multirésistante décrites aux États-Unis et en France (Coronado *et Coll*, 1993 ; Pearson *et Coll*, 1992 ; Beck-Sague *et Coll*, 1992, Lemaitre *et Coll*, 1996b ; Bouvet *et Coll*, 1993). Au cours de ces épidémies, cette analyse 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. Elle a également permis de démontrer la transmission de la tuberculose dans les foyers de personnes sans domicile fixe (Lemaitre *et Coll*, 1998 ; Dwyer *et Coll*, 1993), 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 par 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 (Mazars *et Coll*, 2001 ; Small *et Coll*, 1994 ; Alland *et Coll*, 1994). Dans ces enquêtes, l'analyse par RFLP trouve souvent une proportion bien supérieure de malades « bactériologiquement liés » 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 est élevée de ne pas mettre en évidence de lien épidémiologique (contact) pour des cas dont les souches paraissent identiques.

Les études systématiques en population « entière » (ex. : quartiers, villes, départements, voire pays) permettent aussi de déterminer la proportion des cas de TB maladie 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 de TB infections anciennes (Small *et Coll*, 1994 ; Alland *et Coll*, 1994).

Il faut remarquer que si l'on veut être rigoureux, la proportion de cas retenus de probable de transmission récente doit être calculé en retranchant un cas de chacune des grappes ou clusters 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 TB maladie à New York était divisé par 3, par suite du programme associant traitement standardisé et supervisé, et organisation de la lutte antituberculeuse.

Des outils ont aussi été développés pour comparer entre elles des souches de mycobactéries atypiques (ex : élec-

trophorèse en champ pulsé pour *M. avium*), mais l'expertise en est bien moindre que pour *M. tuberculosis*, car :

- les mycobactérioses sont beaucoup plus rares que la tuberculose (10 fois plus rares en France) ;

- il n'y a pas de transmission interhumaine des mycobactérioses, et, en conséquence, les empreintes digitales génomiques ne sont utiles que pour aider à identifier un éventuel réservoir extérieur.

En conclusion, en pratique, les outils biologiques essentiels sur lesquels repose le diagnostic de la TB maladie et les prises de décision thérapeutiques restent les outils de bactériologie classique, microscopie et culture. Les outils moléculaires permettent efficacement d'accélérer 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 TB maladie à examen microscopique négatif et a fortiori à culture négative.

RÉFÉRENCES

- ALLAND D, KALKUT GE, MOSS AR *et Coll* - Transmission of tuberculosis in New-York city. *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.
- AUSINA, V., GAMBOA F., GAZAPO E. *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.
- 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.
- BOUCHER J - A one year prospective study using molecular strain typing for the evaluation of tuberculosis transmission in a Paris suburb. 20e réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-infectieuse (RICAI), Paris, 2000.
- BOUVET E, CASALINO E, MENDOZA-SASSI G *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 *et Coll* - Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation. *Lancet* 1991; **338** : 364-366.
- 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.
- CENTER OF DISEASE CONTROL (CDC) - Transmission of multiple-drug-resistant tuberculosis among immunocompromised persons in a correctional system - New-York. *MMWR* 1992; **28** : 507-509.
- 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 *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. *Letters in Applied Microbiology* 1997; **24** : 127-132.
- DALEY CL, SMALL PM, SCHECTER GF *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 *et Coll* - Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by Using Roche AmpliCor *Mycobacterium tuberculosis* PCR test. *J Clin Microbiol* 1995; **33** : 1832-1834.
- DAS S, PARAMASIVAN CN, LOWRIE DB *et Coll* - restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. *Tuberc Lung Dis* 1995; **76** : 550-554.
- DE BEENHOUWER H, LHIANG Z, JANNES G *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 *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 *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.
- FITZPATRICK LK, OKWERA A, MUGERWA R *et Coll* - 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.
- FRIEDMAN CR, STOECKLE MY, JOHNSON WD, RILEY LW - Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1995; **33** : 1883-1884.
- GENG E, KREISWIRTH B, DRIVER C *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 *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, OKUZUMIK K *et Coll* - Evaluation of acridinium ester labeled DNA probes for identification of *M. tuberculosis* and *M. avium-intracellulare* complex in culture. *J Clin Microbiol* 1991; **29** : 2473-2476.
- GROSSET J, BOISVERT H, TRUFFOT-PERNOT C - Mycobactéries. In «LE MINOR, VERON M - Bactériologie Médicale». Flammarion ed, Paris, 1990, pp 965-1017..
- HANNA BA, EBRAHIMZADEH A, ELLIOTT LB *et Coll* - A multicenter evaluation of the MGIT960 system for recovery of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1999; **37** : 748-752.
- 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, MESSADI F, GUEBREXABHER H *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 *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 « MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA *et Coll* - Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. chapter 119. American Society for Microbiology ed, Washington DC, 1995, pp 1385-1404.
 - JONAS V, ALDEN MJ, CURRY JI *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 *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 neighbourhood bar. *N Engl J Med* 1995; **27** : 222-227.
 - KONNO K - New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science* 1956; **124** : 985.
 - KRUNER 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 Inf Dis* 2002; **35** : 146-154.
 - LEBRUN L, ESPINASSE F, POVEDA JD *et Coll* - Evaluation of non radioactive DNA probes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; **30** : 2476-2478.
 - LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, TRUFFOT C *et Coll* - 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* 1996; **44** : 452-455.
 - LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, COETMEUR D *et Coll* - Nosocomial transmission of tuberculosis among mentally-handicapped patient in long-term facility. *Tuber Lung Dis* 1996; **77** : 531-536.
 - LEMAITRE N, SOUGAKOFF W, TRUFFOT-PERNOT C *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.
 - MAZARS E, LESJEAN S, BANULS A *et Coll* - High resolution minisatellite-based typing as a portable approach to global analysis of *Mycobacterium tuberculosis* molecular epidemiology. *PNAS* 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.
 - NOLTE FS, METCHOCK B, MCGOWAN JR JE *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 «MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA *et Coll* - Manual of Clinical Microbiology, 6th., Chapter 34». . American Society for microbiology ed, Washington DC, 1995, pp 400-437.
 - 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, 344-348.
 - PEARSON ML, JEREB JA, FRIEDEN TR *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, BONATO DA, EBRAHIMZADEH A *et Coll* - Multicenter 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* 1999; **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* 1999; **37** : 137-140.
 - PFYFFER GE, WELSCHER HM, KISSLING P *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.
 - 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.
 - 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 *et Coll* - 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 *et Coll* - Assessment by meta-analysis of PCR for diagnostic of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003; **41** : 3233-3240.
 - SHINNICK TM, GOOD RC - Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13** : 884-901.
 - SMALL PM, SHAFER RW, HOPEWELL PC *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 *et Coll* - The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. *N Engl J Med* 1994; **330** : 1703-1709.
 - SOUGAKOFF W, RODRIGUE M, TRUFFOT-PERNOT C *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. *Seminars in respiratory and critical care medicine* 1997; **18** : 509-522.
 - TABEL SR, GOLDBAUM GM, HOOTON TM *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.
 - TROESCH A, NGUYEN H, MIYADA CG *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 *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.
 - 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, KRAJEN 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.
 - WURTZ R, DEMARAI P, TRAINOR W, MCCAULEY J, KOCKA F *et Coll* - Specimen contamination in mycobacteriology laboratory detected