

Diagnostic biologique de la tuberculose dans les pays à faibles ressources : perspectives nouvelles

Dubrous P¹, Alaoui H², N'Dounga Mikolo B³, Koeck JL¹

1. Hôpital d'instruction des Armées (HIA) Robert Picqué, Service de Biologie Clinique, Bordeaux, France.

2. HIA Mohammed V, Laboratoire de recherche et de biosécurité, Hay Riad, Rabat, Maroc.

3. HIA Omar Bongo Ondimba, Service de Biologie Clinique, Libreville, Gabon.

Med Trop 2009; **69** : 618-628

RÉSUMÉ • La tuberculose continue à représenter un problème de santé publique majeur dans le monde malgré la stratégie DOTS qui a pour ambition de détecter 70 % des nouveaux cas annuels et de traiter avec succès au moins 85 % de ceux-ci. Une des raisons de cet échec relatif tient à la difficulté d'obtenir un diagnostic suffisamment fiable et sensible de la tuberculose en particulier chez les sujets VIH+. L'avènement de nouveaux tests de diagnostic est une priorité de l'OMS pour son plan global de lutte contre la tuberculose 2006-2015. Les axes de recherche sont nombreux et variés : développement de tests immunologiques de détections d'antigènes ou d'anticorps, tests cutanés, tests respiratoires, améliorations des techniques de cultures en milieu solide ou liquide, alternatives à la culture, techniques de biologie moléculaire... Certaines de ces techniques sont marquées par une perspective assez lointaine et ne seront certainement jamais utilisées en routine. D'autres par contre, mériteraient d'être rapidement généralisées en particulier l'optimisation de l'examen direct au moyen des nouveaux microscopes à fluorescence. De solides espoirs reposent également sur l'apparition de techniques de détection immunoenzymatique à partir des urines. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de ces nouveaux tests pour le diagnostic de la tuberculose ne pourra se faire qu'après des essais cliniques conduits et contrôlés dans les pays où ils seront le plus utiles à savoir les pays à ressources limitées et de forte endémie, dans les conditions réelles de leur utilisation.

MOTS-CLÉS • Tuberculose. Techniques de diagnostic. Résistance aux antituberculeux.

DIAGNOSIS OF TUBERCULOSIS IN DEVELOPING COUNTRIES: NEW PERSPECTIVES

ABSTRACT • Tuberculosis (TB) is still a major public health problem in the world despite the ambitious goals of the DOTS strategy, i.e., detection of 70% of new cases and successful treatment of at least 85% of those cases. One of the main reasons for this relative failure is lack of a sensitive method for reliable diagnosis particularly in HIV-positive patients. Development of new diagnostic tools is a top priority in the WHO's "Global plan to stop TB, 2006-2015". Numerous avenues of research have been proposed including development of immunological tests to detect antigens and antibodies, cutaneous tests, respiratory tests, improved solid or liquid culture techniques, alternatives to culture techniques, molecular biology techniques, etc. Some of these techniques will require long-term development and others will probably never be suitable for routine diagnosis. However a few innovations such as optimization of direct microscopic examination using new lower-priced fluorescence microscopes are ready for rapid deployment. Another promising area of research involves immunoenzymatic testing on urine samples. In any event clinical trials will be necessary to demonstrate the efficacy of these new diagnostic tools. These trials must be conducted and controlled under field conditions in the geographical zones where they will be used, i.e. in low-income countries with high incidences of TB.

KEY WORDS • Tuberculosis. Diagnostic techniques. Drug resistance.

Àu début des années 1990, l'OMS s'est fixé pour objectif de détecter, à l'horizon 2005, 70 % des nouveaux cas annuels de tuberculose contagieuse et de traiter avec succès au moins 85 % de ceux-ci (1). Force est de constater que ces objectifs n'ont pas été atteints. La tuberculose continue à représenter un problème majeur de santé publique dans les pays en développement (PED) puisque l'on estime entre 8 et 9 millions le nombre de sujets qui développent une tuberculose maladie chaque année, laquelle est responsable de près de 2 millions de morts (2). Une des principales raisons de cet échec relatif tient à la difficulté d'obtenir un diagnostic bactériologique fiable et sensible de la tuberculose. Or un diagnostic sûr et précoce au moyen d'outils performants est essentiel à la fois sur le plan individuel (prise en charge correcte du patient) et sur le plan collectif (interruption de la transmission).

Moyens actuels pour le diagnostic de la tuberculose

La stratégie de lutte contre la tuberculose adoptée par l'OMS repose sur la stratégie DOTS (Directly Observed Treatment Short Course). Elle consiste à détecter les cas par un examen microscopique direct (EMD) des frottis de crachats des patients symptomatiques, et à traiter de façon standardisée (en 6 à 8 mois) au moins tous les malades dont l'examen direct est positif. La priorité est donc donnée au diagnostic de la tuberculose pulmonaire, car il s'agit de la seule forme contagieuse de la maladie. Le diagnostic de cette tuberculose pulmonaire repose d'abord sur un faisceau d'arguments anamnestiques, cliniques et radiologiques mais ceux-ci sont peu spécifiques, particulièrement chez les sujets VIH+. On recherche donc en règle générale une tuberculose chez un sujet symptomatique qui tousse depuis au moins 2 ou 3 semaines.

• Correspondance : phdubr@gmail.com

• Article reçu le 24/10/2008, définitivement accepté le 25/06/2009.

L'examen microscopique direct

L'EMD permet d'observer au microscope, après coloration du frottis, les bacilles acido-alcoolo résistants (BAAR). Il est réalisé sur trois crachats profonds consécutifs : « sur place », « du matin » et « sur place », les frottis étant réalisés sans concentration préalable de l'échantillon. La méthode de référence est la coloration de Ziehl-Nielsen. La coloration à froid de Kinyoun-Gabett, insuffisamment sensible, n'est pas recommandée. La coloration à l'auramine, nécessitant un microscope à fluorescence, n'est en pratique qu'exceptionnellement réalisée. Considéré généralement comme un examen de laboratoire simple, l'EMD n'est pas dénué d'inconvénients : son rendement est largement tributaire de l'expérience et du savoir faire de l'examineur, il nécessite des examens itératifs et sa mise en œuvre est longue. Le niveau de formation des personnels chargés de réaliser cet examen et la mise en place de normes de qualité varient considérablement d'un centre à l'autre, et d'un pays à l'autre. Un technicien entraîné ne peut pas préparer et lire plus de 25 lames par jour. Un nombre non négligeable de sujets bacillifères ne sont pas traités car ils ont quitté le centre avant même d'avoir pris connaissance de leurs résultats (3). Surtout, la sensibilité de cet examen est faible. Ceci est principalement du au seuil de détection de la technique, évalué entre 5 000 et 10 000 bacilles par millilitre d'échantillon biologique, une concentration bacillaire supérieure à ce seuil s'accompagnant d'un risque de transmission de la maladie beaucoup plus élevé. En 2005, l'EMD des expectorations n'a permis de dépister que 40 à 60 % des cas de tuberculose contagieuse (Tableau 1), ce qui est inférieur aux résultats attendus (65 à 80 %) (2, 4). Cela a pour conséquence un retard diagnostique et donc thérapeutique, augmentant le risque d'une progression des lésions tuberculeuses jusqu'à l'apparition d'une forme bacillifère contagieuse, pouvant elle-même être à l'origine de nouveaux cas d'infection tuberculeuse dans l'entourage. Une tuberculose pauci bacillaire un jour, et donc non identifiée par l'EMD, peut produire de nombreux bacilles de Koch (BK) dans les jours ou les semaines suivantes. Or un patient ayant l'expérience d'un résultat négatif antérieur, surtout s'il se trouve éloigné d'un centre de dépistage, risque de ne pas consulter avant longtemps. Le diagnostic n'est donc fait qu'à des stades très tardifs, ce qui explique que près de 20 % des sujets pour lesquels un traitement est alors initié décèdent dans l'année (5). Ce défaut de sensibilité est accentué par le nombre croissant de tuberculoses pulmonaires non bacillifères et de tuberculoses extra-pulmonaires, observées principalement chez les sujets infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH+). En effet, près d'un nouveau cas de tuberculose sur trois en Afrique est VIH+. La sensibilité insuffisante de l'EMD, ajoutée à la difficulté d'accès aux soins, font que seulement 20 à 35 % des cas de tuberculose sont diagnostiqués dans les régions de forte endémie VIH (6). Même si la transmission de ces formes non bacillifères est moindre, elles contribuent de façon importante à la morbidité et à la mortalité globale de la tuberculose. On estime chaque année à

trois millions le nombre d'individus suspects de tuberculose pour lesquels le diagnostic n'est pas fait, leur maladie n'étant pas objectivée par la microscopie (7). Outre les sujets VIH+, l'EMD peut aussi être insuffisamment sensible chez les enfants, car il leur est plus difficile de produire des expectorations profondes que l'adulte.

La spécificité de l'EMD est élevée dans les régions où la tuberculose est endémique. Mais il faut néanmoins souligner que les BAAR ne sont pas toujours des bacilles de Koch. Ils peuvent parfois témoigner de l'existence d'autres mycobactéries, dites « atypiques » ou « non tuberculeuses ».

La culture

Lorsque l'EMD est négatif, la méthode de référence permettant de confirmer le diagnostic de tuberculose est la mise en culture de *M. tuberculosis*. Cette méthode permet également de déterminer la sensibilité aux antituberculeux. La multirésistance des bacilles tuberculeux, définie par une résistance aux deux antituberculeux majeurs, isoniazide (INH) et rifampicine (RIF), peut compromettre l'efficacité thérapeutique. L'ultrarésistance, définie par une résistance associée à des antituberculeux de deuxième ligne, est associée à une très forte létalité (8).

La culture des mycobactéries est longue, fastidieuse et sujette à contaminations. Il s'agit d'une technique difficile à mettre en œuvre dans les régions démunies car elle nécessite des matériels spécifiques d'entretien délicat, un personnel entraîné et la mise en place de mesures contraignantes de sécurité et d'une assurance de la qualité. Elle ne peut être réalisée que dans des laboratoires bien équipés, rares dans les pays de forte endémie tuberculeuse à l'exception du Brésil, de la Russie et de l'Afrique du Sud. A titre d'exemple, parmi les 22 pays les plus atteints par la tuberculose, moins de la moitié possèdent plus de trois centres aptes à réaliser des antibiogrammes sur l'ensemble de leur territoire national (9).

La première contrainte inhérente à la culture est la nécessité d'une étape préalable de fluidification-décontamination de l'échantillon biologique, qui consiste à éliminer les bactéries commensales pouvant empêcher ou gêner l'observation des colonies de BK. Cette étape repose sur l'action de certains produits (soude caustique, N-acétyl-cystéine) ; elle nécessite une centrifugeuse, matériel coûteux et nécessitant un entretien minutieux. La centrifugation permet de concentrer les BK dans un culot qui, outre la culture, servira également à réaliser un EMD d'une sensibilité plus élevée que celui réalisé directement à partir de l'échantillon biologique. Le milieu de culture le plus communément utilisé est la gélose en pente de Löwenstein-Jensen (LJ), qui peut être préparée au laboratoire. La présence d'œufs dans sa composition rend nécessaire l'utilisation d'un coagulateur à trou, d'une étuve ou d'un autoclave à 85 °C. Le milieu solide 7H11 peut aussi être utilisé. Sa fabrication est plus aisée mais il est plus coûteux. Le délai d'apparition des colonies est généralement long (3 à 8 semaines pour le milieu LJ, 17 à 21 jours pour le milieu 7H11).

La détermination de la sensibilité aux antituberculeux repose sur la méthode des proportions et demande 4 à 6 semaines supplémentaires. Ce délai considérable fait que les patients atteints de tuberculose multi-résistante ou ultra-résistante peuvent décéder ou contaminer leur entourage avant que le diagnostic ne soit posé.

Tableau 1. Détection des cas de tuberculose contagieuse en 2005 (45).

Région OMS	% de nouveaux cas de tuberculose pulmonaire à ED +
Afrique	60
Méditerranée orientale	54
Sud-Est asiatique	59
Asie Pacifique	60
Amériques	69
Europe	39
Total mondial	59

Des alternatives nécessaires

L'insuffisance et les limites des techniques classiques de diagnostic de la tuberculose dans les pays défavorisés (examen direct et culture) sont soulignées avec force par l'ensemble des acteurs impliqués dans la lutte anti-tuberculeuse à l'échelle mondiale. Ceux-ci appellent de leurs vœux le développement de nouveaux tests diagnostiques simples, rapides, fiables, sensibles, robustes, peu onéreux et permettant en outre de dépister plus aisément les tuberculoses chez les sujets VIH+ et les résistances du BK aux antituberculeux. La tâche n'est pas facile mais l'OMS, par le biais du partenariat «STOP TB», a fait du développement de ces nouveaux tests diagnostiques une des priorités pour son plan global de lutte contre la tuberculose 2006 - 2015 (10). Le partenariat «STOP TB» est un mouvement mondial destiné à accélérer l'action politique et sociale de lutte contre la tuberculose dans tous les pays. Plus de 300 institutions sont membres de ce partenariat : ONG, gouvernements, entreprises privées... Parmi elles, la Fondation pour des outils diagnostiques nouveaux et novateurs (FIND) occupe une place de choix. Supporté par la fondation de Bill et Melinda Gates, qui y ont investi 30 millions de dollars sur 5 ans, FIND est un organisme indépendant à but non lucratif créé pour assurer une interface entre l'industrie et la recherche afin de développer, d'évaluer et de promouvoir de nouvelles méthodes diagnostiques (11). Mais ce n'est pas la seule organisation à financer des projets de développement. Les voies de recherche pour améliorer le diagnostic biologique de la tuberculose sont très nombreuses, très variées, allant des puces à ADN aux rats renifleurs (12, 13). Nous nous proposons de nous faire l'écho de ces nouvelles méthodes de diagnostic, soit déjà utilisées, soit en cours de développement, et d'envisager la place qu'elles pourraient revêtir dans la stratégie de lutte anti-tuberculeuse

Nouveaux outils diagnostiques

Optimisation de l'examen microscopique direct

Un test de diagnostic de la tuberculose rapide et accessible, doué d'une sensibilité supérieure à 85 % et d'une spécificité de 97 % pourrait sauver approximativement 400 000 vies par an (14). En attendant l'utilisation en routine de tests répondant à ces critères, encore au stade de recherche et développement, le microscope risque de rester incontournable pendant les prochaines années. Les pistes permettant d'optimiser la microscopie doivent être explorées. C'est l'un des projets du Programme spécial de recherche et de formation de l'OMS concernant les maladies tropicales (WHO / TDR) (15). Ce projet présente l'avantage de pouvoir s'appuyer sur l'organisation actuelle (cf. discussion) et se décline en trois volets :

- le traitement des crachats ;
- le microscope à fluorescence ;
- les prélèvements sériés.

Le traitement préalable des crachats par la soude ou l'eau de javel, suivi d'une centrifugation ou d'une sédimentation, augmente la sensibilité de l'EMD de près de 20 % sans en modifier la spécificité (16).

Plusieurs études montrent que l'utilisation d'un microscope à fluorescence apporte un gain de sensibilité de 10 % en moyenne par rapport à la microscopie conventionnelle, pour une spécificité identique (17). Ce gain en sensibilité est surtout marqué chez les sujets VIH+ ou il peut aller jusqu'à 50 % (18). Par ailleurs, le temps d'observation est plus court en immunofluorescence qu'en micro-

scopie optique. L'utilisation de la fluorescence est limitée par le coût des traditionnels microscopes à vapeur de mercure. Récemment sont apparus de nouveaux microscopes à diodes (Light emitting diodes, LEDs) à longue durée de vie (> 50 000 heures), pouvant fonctionner sur batteries, aussi performants que les microscopes traditionnels et d'un prix de vente inférieur à 1 000 euros (19). Néanmoins, se pose encore la question de la stabilité de la fluorescence dans les conditions de terrain et de l'acceptabilité de la microscopie à fluorescence par les techniciens de laboratoire en zone tropicale.

Si les recommandations internationales pour le diagnostic de la tuberculose pulmonaire font état de la nécessité de recueillir trois échantillons successifs, une revue récente de la littérature montre que le gain de sensibilité du troisième prélèvement est très faible (2 à 5 %) (20). La question de supprimer ce troisième examen dans les zones où la microscopie reste le seul moyen de diagnostic est légitime. Cela permettrait d'alléger la charge de travail des laboratoires de première ligne, de mieux examiner les deux lames restantes et de consacrer davantage de temps aux autres analyses biologiques (15).

Alternatives à l'examen microscopique direct

Les insuffisances de l'EMD ont conduit à la recherche de techniques directes alternatives possédant les qualités requises pour une utilisation sur le terrain, au niveau des services de santé primaires ou au plus près des malades. Dans ce contexte, une place importante est accordée à la simplicité d'utilisation, à la facilité de lecture, au coût, à la conservation et à la durée de péremption, sans pour autant faire des compromis sur les performances intrinsèques (sensibilité et spécificité) de ces tests. L'accent est mis actuellement sur les méthodes immuno-enzymatiques, réalisables à partir d'échantillons respiratoires mais aussi urinaires ou sanguins. Mais d'autres voies sont explorées : tests cutanés, tests respiratoires...

• Les tests immunologiques de détection d'antigènes

* Le LAM urine Test® (Chemogen, USA)

Il permet de rechercher le lipoarabinomannane (LAM), constituant glycolipidique de la paroi bactérienne, dans les urines des sujets tuberculeux. Les urines représentent un échantillon de choix car elles sont plus faciles à collecter que les prélèvements pulmonaires (surtout chez les enfants), moins variables en qualité et plus sûres à manipuler. Elles revêtent aussi un intérêt tout particulier chez les sujets VIH+ présentant des formes pulmonaires pauci-bacillaires ou des formes extra-pulmonaires. Le test se présente actuellement sous deux formes : en ELISA microplaque et en tubes. La technique en tube ne nécessite pas de chaîne du froid, mais elle est longue (> 3 heures), demande plusieurs manipulations et exige un certain degré d'entraînement. L'utilisation d'eau distillée est nécessaire ; la société Chemogen recommande l'ébullition et la centrifugation des urines, ce qui limite l'accès au test dans les zones très défavorisées. Ses performances semblent très prometteuses. En 2003, une étude conduite en Tanzanie à partir d'urines non traitées recueillies chez 231 patients suspectés de tuberculose et chez 103 volontaires sains a montré une sensibilité globale de 80,3 % par rapport à la culture, et de 76 % chez les sujets avec EMD négatif et culture positive. Pour 13 sujets présentant des images radiologiques très évocatrices de tuberculose (sur 17), le LAM urine Test® était positif en dépit d'un EMD et d'une culture négatives. Chez les volontaires sains, la spécificité du test a été évaluée à 99 %. Deux données complémentaires semblent également intéressantes :

- Il existe une corrélation entre le nombre de bacilles observés à l'EMD et la concentration en LAM dans les urines, ce qui peut avoir un intérêt pour le suivi du traitement et le dépistage des rechutes ;

- La très forte prévalence de sujets VIH+ (69 %) parmi les sujets suspects de tuberculose n'a pas eu un impact négatif sur la sensibilité du test (21).

Pour pouvoir être généralisée dans les régions les plus défavorisées, la recherche du LAM urinaire devrait s'affranchir des contraintes liées à la technique ELISA. Plusieurs équipes travaillent sur la mise au point d'un test immuno-chromatographique sur membrane qui pourrait être accessible à l'horizon 2010 (22). Il existe déjà un test immuno-enzymatique sur membrane (Capilia TB Test® de Tauns Co Ltd) qui permet d'identifier en 15 minutes *M. tuberculosis*, mais uniquement à partir de colonies obtenues sur milieu solide ou en milieu liquide. La cible antigénique est la protéine MPB-64 et les sensibilité et spécificité de ce test sont évaluées à 92,4 et 100 %, respectivement. Il n'est pour l'instant disponible qu'au Japon (23) mais un autre test basé sur le même principe, est depuis peu distribué en France par la société Eurobio (test SD TB Ag MPT64 Rapid®).

*Le Test Patho-TB® (Anda Biologicals, France)

Il s'agit d'un test utilisant des anticorps polyclonaux permettant le diagnostic antigénique rapide de la tuberculose par une technique de filtration. Il comprend plusieurs étapes : décontamination des prélèvements, dissolution et ébullition du culot, préfiltration sur cassette pour éliminer les grosses particules et filtration proprement dite avec réaction immuno-chromatographique par utilisation d'une solution d'anticorps monoclonaux et d'un conjugué marqué à l'or colloïdal. La lecture est semi quantitative et une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose. On considère qu'une réaction positive notée 1+ équivaut à la présence de 1 à 9 bacilles pour 100 champs. Ce test a fait l'objet de plusieurs évaluations sur le terrain (Sénégal, Biélorussie, Maroc et Iran) ; sa sensibilité semblerait meilleure que celle de l'EMD (données non encore publiées).

* Le Test de détection d'antigènes (Proteome Systems, Australie)

Le gouvernement australien a alloué en 2005 la somme de deux millions de dollars australiens à la société Proteome systems pour qu'elle développe un nouveau test de diagnostic rapide fondé sur la recherche de protéines spécifiques de la tuberculose évolutive. Peu d'informations sont disponibles quant à l'avancée des travaux (24).

• Les tests immunologiques de détection d'anticorps

L'infection par *M. tuberculosis* induit une réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale. Le diagnostic sérologique de la tuberculose a fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières décennies. Il existe actuellement une vingtaine de tests sérologiques commercialisés ; l'antigène utilisé est connu pour seulement six d'entre eux, mais aucun n'a jamais vraiment fait la preuve de son efficacité. Une évaluation de ces tests sérologiques réalisée en 2005 a montré que ceux-ci souffraient d'un défaut de spécificité et de sensibilité (cette dernière étant parfois inférieure à 40 %) et qu'ils n'étaient pas aptes à remplacer l'EMD (25). Plusieurs raisons peuvent expliquer ces piètres performances : sujets vaccinés par le BCG, exposés aux mycobactéries non tuberculeuses ou coinfectés par le VIH. Une des raisons majeures de l'inefficacité des tests séro-

logiques tient aux multiples avatars antigéniques que peut revêtir *M. tuberculosis* au cours d'une infection. *M. tuberculosis* est en effet capable d'exprimer différents gènes, variables selon le stade de la maladie : primo-infection, latence, tuberculose maladie, cavitaire ou non. Par exemple, *M. tuberculosis* est capable d'augmenter la production de certains antigènes (TB9.7 et 81/88 kDa) en cas d'infection associée au VIH (26). Les premières générations de tests sérologiques utilisant des antigènes entiers présentaient une spécificité très faible. L'utilisation de protéines recombinantes a permis d'améliorer cette spécificité ; la protéine de 38 kDa est actuellement la plus utilisée mais elle ne permet pas, à elle seule, de mettre en évidence une réponse immune à tous les stades de l'infection. Ainsi, les tests immuno-enzymatiques sur membrane actuels incorporent-ils plusieurs antigènes protéiques purifiés. Par exemple, le test ICT *tuberculosis*® utilise cinq antigènes, incluant la protéine de 38 kDa. Mais la sensibilité de ces techniques reste faible et très variable, de 20 à 70 % selon les séries. D'autres antigènes cibles ont fait l'objet d'évaluations peu concluantes : les glycolipides de surface (TBGL's), le LAM, l'antigène 60 (A60)... (20). La piste privilégiée actuellement consiste à élaborer un « panel antigénique » de protéines exprimées ou non selon le stade de l'infection, qui pourrait être assimilé à un code-barre. La présence ou l'absence d'une réponse immune vis-à-vis d'un antigène donné pourrait alors donner une indication sur le stade de l'infection par *M. tuberculosis* (27). Si elle est séduisante sur le plan théorique, cette approche n'a pas encore été expérimentée en clinique.

• Les tests immunologiques explorant l'immunité à médiation cellulaire (tests de production d'interféron)

Le sang total ou les cellules mononuclées recueillis chez le patient sont incubés en présence d'antigènes spécifiques codés par la région RD1 de *M. tuberculosis*. Le test mesure, par une technique immunoenzymatique, la quantité d'interféron γ produite par les lymphocytes T ainsi stimulés. Deux tests d'immunodiagnostic reposant sur ce principe sont disponibles : le test Quantiféron®, commercialisé par Cellestis (Australie/USA) et le test TB Elispot®, commercialisé par Immunotec (Royaume Uni). Ces techniques ont pour vocation à remplacer le test intradermique à la tuberculine. Ils présentent moins de réactions croisées vis-à-vis du BCG et des mycobactéries atypiques, ne nécessitent pas d'injection et leur lecture n'est pas subjective. Ils s'appliquent plutôt au diagnostic des tuberculoses latentes car ils témoignent d'un contact entre le BK et son hôte, sans préjuger de la nature de l'infection. La place de ces tests dans le diagnostic de la tuberculose évolutive, particulièrement dans les pays de forte endémie, n'est pas définie. De même, l'intérêt qu'ils pourraient revêtir chez les sujets VIH+, qui présentent un risque élevé de réactivation tuberculeuse, doit encore être évalué. Il s'agit enfin d'une technique chère et difficile à mettre en œuvre dans les pays les plus démunis (manipulations complexes, nécessité de chaîne du froid) (28).

• Les tests cutanés

Une alternative séduisante a été initiée par Nakamura *et al.* Un antigène spécifique du complexe *M. tuberculosis* (MPB-64) est délivré au patient au moyen d'un patch cutané. La lecture s'effectue 48 à 72 heures après l'application. Des études réalisées aux Philippines et au Japon ont montré que ce test présentait une bonne sensibilité (88 %) et une excellente spécificité (100 %) pour le diagnostic de tuberculose maladie (29), tout en restant négatif en cas de tuberculose infection. La société Sequella Inc (USA) développe un test basé sur ce principe et utilisant la protéine recombinante

rMPT64 (30). Les avantages de ce procédé en seraient la simplicité d'utilisation et son caractère non invasif, puisqu'il ne nécessiterait ni laboratoire ni personnel hautement qualifié; ses performances n'ont toutefois pas encore été évaluées dans les pays de forte endémie tuberculeuse, particulièrement chez les sujets VIH+ et sur peau noire.

• *Les tests respiratoires (breath detection method)*

Les tests respiratoires constituent une piste de recherche, suivant l'exemple du diagnostic de l'infection à *Helicobacter pylori*. Ils pourraient permettre de détecter certains composants organiques volatiles dans l'air expiré des patients tuberculeux (31, 32). Un « nez électronique », déjà utilisé en bactériologie alimentaire, pourrait aussi identifier le BK à partir des crachats ou des cultures (33). Séduisantes d'un point de vue théorique car non invasives, ces techniques n'en sont qu'à leurs premiers balbutiements. Fend *et al.* ont toutefois réussi à différencier *M. tuberculosis* de *M. avium* à partir de crachats, avec un seuil de sensibilité analytique de 104 UFC/ml (34). La fondation Johnson and Johnson et le NIH ont financé une approche originale, faisant appel à l'odorat très développé du rat de Gambie (*Cricetomys gambianus*) pour détecter *M. tuberculosis* dans les crachats des sujets tuberculeux. L'étude est conduite au centre de recherche Apopo, spécialisé dans la production de rats renifleurs de mines (35).

Techniques d'optimisation de la culture

Un des principaux inconvénients des milieux classiques étant la lenteur du délai de croissance, des efforts ont été entrepris pour raccourcir celui-ci en utilisant des milieux de cultures liquides. Ceux-ci doivent permettre la confirmation du diagnostic de tuberculose, et si possible la détermination de la sensibilité de la souche isolée aux antituberculeux. La culture en milieu liquide peut être manuelle ou automatisée.

• *Techniques manuelles utilisant des milieux liquides*

Les techniques manuelles en milieu liquide, dont certaines sont commercialisées, peuvent être utilisées dans les laboratoires de PED, à condition qu'ils soient pourvus au minimum d'une centrifugeuse et d'un poste de sécurité microbiologique.

* Le test MGITTM manuel

Le test MGITTM (Mycobacterium Growth Indicator Tube) est commercialisé par la société Becton Dickinson. Il utilise un milieu de Middlebrook 7H9 contenu dans un tube dont le fond est recouvert de sel de ruthénium, un fluorochrome dont la fluorescence est inhibée par l'oxygène. La croissance bactérienne s'accompagne d'une consommation de l'oxygène moléculaire, qui est remplacé par du CO₂. La diminution de la pression partielle d'oxygène libère la fluorescence, dont l'intensité est proportionnelle au niveau de réduction du milieu. Avant d'êtreensemencé, le milieu est enrichi en acide oxalique, albumine, dextrose et catalase (mélange OADC) et additionné d'antibiotiques. Le test MGITTM est dit « manuel » lorsque la lecture de la fluorescence se fait à l'œil nu par le technicien, au moyen d'une lampe à UV ou d'un mini lecteur commercialisé (MicroMGITTM Fluorescence Reader). Le délai moyen d'apparition d'une culture est de sept jours lorsque l'EMD est positif. Il est possible de déterminer la sensibilité du BK aux antituberculeux en cinq à dix jours. En outre, les tubes sont incassables, d'un encombrement réduit (10 cm de hauteur) et faciles à inoculer, ce qui augmente la sécurité des manipulations et diminue

le volume des déchets. Le milieu MGITTM peut trouver sa place dans les laboratoires des PED (36) malgré un prix élevé d'environ quatre euros. Des négociations sont en cours pour le rendre plus accessible dans ces pays.

* La technique « Microscopic observation drug-susceptibility » (Mods)

L'échantillon est ensemencé dans un milieu de culture Middlebrook 7H9 (+ OADC et antibiotiques) contenu dans des plaques à puits. La lecture s'effectue au microscope inversé, quotidiennement jusqu'au quinzième jour puis tous les deux jours. *M. tuberculosis* est identifié par son aspect caractéristique en cordes. Une étude de grande ampleur réalisée au Pérou, comportant l'analyse de 3 760 échantillons pulmonaires, a montré une excellente sensibilité de cet examen pour le diagnostic de la tuberculose (97,8 %), supérieure à celle de la culture sur LJ (84 %) ou en milieu liquide automatisé (89 %). La spécificité était de 99,6 %. Le délai moyen de positivité était de sept jours (13 jours pour la culture automatisée et 26 jours pour la culture sur LJ). Chez les sujets VIH+, la sensibilité et la spécificité du Mods étaient supérieures à celles de la culture automatisée, et la répétition du test sur un troisième prélèvement n'apportait qu'un gain très faible de sensibilité (37). Cette technique permet aussi d'évaluer la sensibilité des BK aux anti-tuberculeux. La concordance avec les méthodes de référence (méthode des proportions et technique automatisée) était de 100 % pour la rifampicine et de 97 % pour l'isoniazide. D'autres études réalisées au Brésil et en Éthiopie ont montré des performances similaires (38, 39). Le coût de la détermination de la sensibilité aux anti-tuberculeux par le Mods est faible : deux US \$ par échantillon pour tester quatre antibiotiques, au lieu de six US \$ pour la méthode des proportions en milieu solide et 52 US \$ pour la technique automatisée en milieu liquide (37). Cependant la technique Mods présente certains inconvénients. L'absence de test au format « kit » demande en effet un personnel expérimenté, entraîné et un niveau élevé de biosécurité. En effet, le risque de contamination tuberculeuse des personnels ou des milieux de culture par des bactéries de l'environnement semble plus élevé qu'avec les méthodes de culture conventionnelles. Il s'agit d'une méthode expérimentale dont la diffusion est encore limitée.

* Les méthodes colorimétriques

D'autres méthodes sont utilisables pour rechercher à un moindre coût la résistance de *M. tuberculosis* aux antituberculeux. Elles reposent sur la capacité qu'ont les bactéries vivantes à faire virer un indicateur coloré lorsqu'il est rajouté dans un milieu de culture liquide additionné d'antibiotique. Ces méthodes colorimétriques permettent de déterminer la sensibilité de la souche aux antibiotiques de première et de deuxième ligne, mais il est nécessaire de bien définir à l'échelon international les seuils de résistance des mycobactéries pour chaque antibiotique.

Plusieurs types d'indicateurs redox peuvent être utilisés :

- le diméthylthiazoldiphényltétrazolium (MTT), qui vire du jaune au violet quand il est réduit (formation d'un précipité de formazan). Ce virage de l'indicateur indique la croissance de souches résistantes à l'antibiotique testé;

- la résazurine (virage du bleu au rose);

- le bleu d'alar (virage du bleu au rose).

Il s'agit de techniques assez simples, ne nécessitant pas d'équipement sophistiqué et réalisées en microplaques sous de faibles volumes. Une méta-analyse récente a montré que la sensibilité et la spécificité des tests colorimétriques étaient comprises entre

89 et 100 % pour la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide (40). La technique colorimétrique utilisant le MTT a été utilisée avec succès directement à partir d'échantillons cliniques. Par comparaison avec la méthode des proportions en milieu solide, 98,5 % des résultats étaient interprétables dans un délai inférieur à deux semaines (41). Certaines de ces techniques colorimétriques sont à la base de réactifs commercialisés. Par exemple, le MB redox[®] (société Biotest, Allemagne) est un milieu liquide dans lequel a été incorporé un sel invisible de tétrazolium prenant une couleur rouge-violet lorsqu'il est réduit par la croissance des mycobactéries. Ses performances sont légèrement inférieures à celles des techniques automatisées, que ce soit en termes de sensibilité ou de délai de culture. Son utilisation en complément de la culture en milieu LJ permet d'obtenir une sensibilité supérieure à 90 % (42).

Les techniques colorimétriques en microplaques sont simples et ne nécessitent pas de matériel sophistiqué ni de personnel hautement entraîné. Leurs performances pour la détection de la résistance à la rifampicine et à l'isoniazide sont acceptables par rapport aux techniques de référence. La méthode des proportions et les méthodes redox (MTT et bleu d'alar, réalisées en parallèle, ont montré des résultats concordants. Les techniques redox ont l'avantage de déterminer la CMI en moins de sept jours pour un coût évalué à trois dollars par souche testée (réazurine) (43). Mais, comme toutes les méthodes en milieu liquide ouvert, elles posent un problème de biosécurité. Enfin, les tests colorimétriques ont été principalement évalués à partir d'isolats bactériens ; peu d'études ont été réalisées à partir d'échantillons cliniques.

* Le test à la nitrate réductase

M. tuberculosis est capable de réduire les nitrates en nitrites grâce à une nitrate réductase. Cette propriété, qui permet de détecter facilement sa croissance sur milieu solide ou en milieu liquide, est utilisée pour déterminer la résistance du BK aux antituberculeux de première ligne. Il s'agit d'une méthode simple et ne nécessitant pas d'équipement particulier, réalisable à partir d'une culture ou d'un échantillon clinique (44). Les résultats sont obtenus en 10 jours environ et sont concordants avec les techniques de référence (45). Musa *et al.* ont évalué cette technique directement à partir d'échantillons pulmonaires positifs (au moins 10 BAAR par champ). Les résultats ont été pour la plupart communiqués en moins de deux semaines. Par rapport à la méthode des proportions, la sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 93 % et 100 % pour l'isoniazide, et de 100 % pour la rifampicine. Toutefois, les performances étaient inférieures pour la streptomycine et l'éthambutol (46).

• Cultures en milieu liquide automatisées

Les milieux liquides se prêtent bien à l'automatisation, permettant ainsi de diminuer les manipulations et d'améliorer les conditions de sécurité. Les automates commercialisés permettent à la fois de détecter la croissance des mycobactéries et de déterminer leur sensibilité aux antituberculeux. L'appareil BD BACTEC[™] MGIT[™] 960 automatise l'incubation et la lecture des tubes MGIT[™]. L'automate Bactec[™] 460-TB (Becton Dickinson) mesure la quantité de carbone 14 radioactif utilisé par la bactérie. L'automate MB/BacT[®] (bioMérieux) détecte le CO₂ produit lors de la croissance des mycobactéries. L'automate VersaTREK[®] (Trek Diagnostics Systems) mesure la consommation d'oxygène dans l'espace de tête du flacon. Très utilisés dans les pays industrialisés, ces automates sont chers, sophistiqués et difficiles à entretenir.

• Techniques manuelles utilisant des milieux solides

* Le TK MEDIUM[®]

Un nouveau milieu de culture solide des mycobactéries, le TK Medium[®], est en cours de développement par la société Salubris (USA). Il s'agit d'un milieu chromogène initialement rouge, qui devient jaune s'il y a croissance de mycobactéries, et vert en cas de contamination (levures, bactéries...). Le virage de l'indicateur se produit avant même l'apparition des colonies, ce qui a pour effet de raccourcir le délai du diagnostic (deux semaines vs trois à quatre semaines pour le LJ). Le TK medium[®] permettrait également de différencier *M. tuberculosis* des autres mycobactéries non tuberculeuses et de déterminer leur sensibilité aux antibiotiques (47). Ce milieu, simple d'utilisation et rendu sélectif par l'ajout d'antibiotiques, possède une sensibilité équivalente à celle du LJ tout en réduisant de moitié le nombre de contaminations. Son évaluation reste toutefois insuffisante (48-50).

* La Détection des microcolonies (Thin Layer Agar)

Cette technique constitue en quelque sorte l'équivalent en milieu solide de la technique Mods. Une plaque recouverte d'une fine couche de milieu de culture Middlebrook 7H11 est incubée et observée tous les deux jours au microscope. Les microcolonies de *M. tuberculosis* sont caractéristiques et peuvent être détectées en 5 à 10 jours (51). Cette technique est simple, robuste et d'un faible coût. Une enquête multicentrique réalisée en Amérique du Sud, portant sur 1 118 échantillons cliniques, a évalué la sensibilité de cette technique à 92,6 % (84,7 % pour le LJ), avec toutefois une proportion de contaminations légèrement supérieure (5,1 % vs 3 %). Le délai moyen de positivité était de 11,5 jours (52). Comparée à la technique d'observation microscopique en milieu liquide, elle semble offrir de moins bons résultats (53).

Alternatives à la culture

Se passer de la culture des mycobactéries est difficilement envisageable à l'heure actuelle. Deux approches permettraient, directement à partir de l'échantillon clinique, de poser le diagnostic d'infection à *M. tuberculosis* et de déterminer la sensibilité de la souche aux antituberculeux. Ce sont les techniques utilisant des phages et les techniques de biologie moléculaire.

• Tests utilisant des phages

Les bactériophages sont des virus capables d'infecter les bactéries vivantes après y avoir pénétré par des récepteurs spécifiques. Le principe des tests phagiques repose donc sur la capacité de certains bactériophages, comme le mycobactériophage D29, à ne se multiplier que dans les souches de *M. tuberculosis* « vivantes ». Une suspension de bactériophages est mise en contact avec une culture bactérienne ou un échantillon clinique. Si des cellules de *M. tuberculosis* sont présentes et viables, elles seront infectées par les phages qui vont y commencer leur processus d'amplification. Les phages en excès dans le milieu sont détruits par l'adjonction d'une solution virulicide. Au terme de la réplication et après lyse de la cellule cible, la présence de phages néo-formés sera mise en évidence par la formation de plages de lyse sur une culture confluyente d'une mycobactérie réceptive non pathogène : *M. smegmatis*.

Des tests reposant sur ce principe sont déjà commercialisés comme le FASTPlaque TB test[™] (Biotec Laboratories Ltd, GB). Ils montrent une très bonne spécificité (83 à 100 %) mais une sensibilité modeste et variable (21 à 88 %). Pour l'instant donc, leurs

performances ne sont pas vraiment meilleures que celles de l'EMD (54). La méthode des phages a aussi une moins bonne sensibilité que le Mods ou la technique des microcolonies, même si le délai d'obtention des résultats est beaucoup plus court (2 vs 11 jours) (55). La société Biotec Laboratories tente actuellement de mettre au point une version plus sensible de cette méthode. D'autres tests sont en cours développement, notamment ceux utilisant des phages dans le génome desquels a été inséré le gène de la luciférase (luciferase gene reporter, LRP). La révélation de l'amplification phagique, et donc la présence de BK viable dans l'échantillon, se fait par détection de lumière (Bronx box[®], Sequella Inc, USA).

Les mycobactériophages ont aussi été utilisés pour détecter la résistance de *M. tuberculosis* à la rifampicine. Des suspensions bactériennes sont mises en présence de concentrations croissantes de l'antibiotique à étudier ; le caractère résistant de la souche se traduit par l'apparition d' « unité formant plages » sur le système de révélation (*M. smegmatis*). Il existe d'ores et déjà des tests permettant une détection de cette résistance à partir des colonies de *M. tuberculosis* (FastPlaque TB-MDRi[™]) et des tests permettant la détection des résistances directement à partir des échantillons cliniques positifs à l'EMD (FastPlaque TB-Response[™]).

Pour la détection de la résistance à la rifampicine, les sensibilités et spécificités sont généralement très bonnes (≥ 95%) lorsque cette recherche est faite à partir des cultures (56). Les études portant sur la recherche de la résistance directement à partir des échantillons sont encore peu nombreuses et présentent des résultats discordants, avec des sensibilités et spécificités respectivement de 44% et 92% en Zambie, et de 100% et 96,5% en Ouganda (57, 58). D'autres études visant à évaluer l'efficacité et la praticabilité du test FastPlaque TB-Response[™] sont en cours, notamment en Afrique du Sud. Les résultats devraient être présentés cette année au comité scientifique de l'OMS, qui pourra alors émettre des recommandations sur son utilisation éventuelle. Parmi les avantages des tests phagiques, on note en premier lieu leur rapidité, puisqu'un diagnostic de tuberculose peut être porté en 48 heures. La résistance à la rifampicine, à condition qu'elle puisse être détectée directement à partir de l'échantillon, serait réalisable dans le même laps de temps. Le coût du test serait d'environ 1,3 US \$, comparable à celui des cultures sur milieux commercialisés. La technique des phages peut ainsi être considérée comme une technique d'amplification alternative à la biologie moléculaire, mais d'un prix de revient nettement inférieur. Il s'agit toutefois d'une technique assez complexe à mettre en œuvre, nécessitant un appareillage et ne dispensant pas des mesures de biosécurité nécessaires à la culture des mycobactéries. Enfin, les contaminations ou les résultats indéterminés ne sont pas rares.

• Techniques de biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic de la tuberculose sont maintenant entrées dans la routine des laboratoires des pays industrialisés, où elles viennent en complément de l'EMD et de la culture.

* Les techniques classiques d'amplification génique

Elles permettent d'identifier le complexe *M. tuberculosis* directement à partir des échantillons cliniques. Il existe plusieurs tests commercialisés : Amplicor[®] MTB test (Roche Diagnostics), Amplified[™] *Mycobacterium tuberculosis* Direct Test[®] (Gen-Probe), BD ProbeTec[™] ET assay (Becton Dickinson). Ces tests commerciaux sont standardisés et offrent plus de garanties que les tests « maison » qui donnent des résultats très variables. Les performances

de ces tests d'amplification génique ont été abondamment étudiées et leur valeur est maintenant bien établie (59). Outre leur rapidité, la majorité des études souligne leur forte spécificité et leur bonne valeur prédictive positive. Un test positif chez un sujet suspect de tuberculose, a fortiori si l'EMD est positif, permet généralement de retenir le diagnostic. A contrario, leur sensibilité est moindre et variable. Elle peut même s'avérer faible dans les formes pulmonaires pauci-bacillaires et les tuberculoses extra-pulmonaires, qui sont fréquentes chez les sujets VIH+. En cas de suspicion clinique, leur valeur prédictive négative est insuffisante pour éliminer le diagnostic de tuberculose devant un test négatif. Outre ce défaut de sensibilité chez l'immunodéprimé, ces techniques de biologie moléculaire possèdent d'autres inconvénients :

- il s'agit de techniques complexes et délicates, difficiles à mettre en œuvre dans les pays les plus défavorisés car elles nécessitent un équipement lourd, coûteux et des techniciens bien formés ;
- elles ne permettent pas de distinguer clairement les bactéries viables des bactéries non viables. Elles doivent donc être utilisées avec prudence chez les patients ayant bénéficié d'un traitement ;
- elles ne renseignent pas non plus sur le degré de contagiosité du patient, ni sur la résistance de la souche aux antituberculeux.

La Fondation pour des outils diagnostiques nouveaux et novateurs (FIND) a développé plusieurs partenariats pour tenter de pallier les insuffisances de ces techniques de biologie moléculaire. Nous en citerons trois :

- la technologie LAMP qui a pour objectif de simplifier la technique d'amplification génique en vue son implantation dans les zones défavorisées ;
- les tests d'amplification d'acides nucléiques urinaires, visant à augmenter la sensibilité de la détection du BK chez les sujets VIH+ ;
- les balises moléculaires (« molecular beacons » des anglosaxons), destinées à détecter la résistance aux antituberculeux.

* La technologie LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

Il s'agit d'une technologie développée par la société japonaise Eiken Chemical. Les performances des tests de première génération devraient être soumises au comité scientifique de l'OMS à l'horizon 2010. Les avantages de la LAMP semblent être sa rapidité, sa facilité d'utilisation (système fermé) et son coût, puisqu'elle ne nécessite pas de thermocycleur ni de système coûteux de révélation des produits amplifiés. La réaction se fait à température constante et utilise quatre amorces permettant d'amplifier six portions de gène spécifiques. La révélation peut être visuelle, par détection de fluorescence, ou par mesure de turbidité (60). Les résultats préliminaires laissent suggérer de très bonnes sensibilité et spécificité (61). Cette méthode peut s'appliquer aux échantillons pulmonaires, et dans un futur proche aux échantillons urinaires et sanguins.

* Les tests d'amplification d'acides nucléiques urinaires

Les cellules en apoptose excrètent dans les urines de courts fragments d'ADN (de 150 à 200 pb) à des concentrations détectables. Ceci est à l'origine de nouvelles méthodes de diagnostic de maladies liées au cancer, aux greffes ou à la grossesse (Xenomics Inc, USA). Le passage à travers le filtre rénal d'ADN de *M. tuberculosis* a été objectivé par amplification génique chez 20 patients tuberculeux, alors qu'un signal négatif était obtenu chez les sujets

contrôles. Deux mois après l'instauration du traitement chez les sujets malades, l'ADN était devenu indétectable dans les urines (62). Cette méthode sera évaluée à l'horizon 2011. Si elle est validée, elle pourrait améliorer le diagnostic des formes extrapulmonaires ou paucibacillaires de la tuberculose, notamment chez les sujets VIH+.

* Les balises moléculaires

Ce sont des sondes d'hybridation nucléotidique de structure en tige et en boucle. En l'absence de séquence cible, le fluorophore et le quencher sont juxtaposés et il n'y a pas de fluorescence. Si la séquence cible est présente, l'hybridation de la sonde entraîne la dissociation fluorophore-quencher et une émission de fluorescence. Ces balises moléculaires sont utilisées, au moyen d'une technique de PCR en temps réel, pour identifier *M. tuberculosis* et pour détecter les mutations conférant la résistance aux antituberculeux. Si la mutation est présente (une seule substitution nucléotidique suffit), il n'y a pas d'hybridation et donc pas de fluorescence. Plusieurs études ont montré une très bonne sensibilité (89 à 98 %) et une excellente spécificité (99 à 100 %) de cette technique pour détecter les résistances à la rifampicine. Pour l'isoniazide, les résultats sont un peu moins bons, certainement en raison de la multiplicité des mutations pouvant induire une résistance à cet antibiotique (63, 64). Cette technique, pour prometteuse qu'elle soit, est chère et nécessite un équipement sophistiqué. FIND, en collaboration avec l'Université du New Jersey et la société Cepheid système GeneXpert®, contribue à la mise au point d'un automate permettant à la fois de traiter l'échantillon clinique, d'extraire l'ADN et de détecter par PCR en temps réel *M. tuberculosis* et la résistance à la rifampicine en moins de deux heures. Les premiers essais cliniques devaient commencer en 2007.

• Les autres techniques de biologie moléculaire

Les tests d'hybridation inverse (Line Probe assay) permettent d'établir simultanément un diagnostic de tuberculose et de d'identifier les principales mutations conférant une résistance aux antituberculeux. Deux tests sont actuellement commercialisés : INNO-LiPA® Rif. TB Kit (Innogenetics, Belgique) et GenoType® MTBDR assay (Hain Lifescience, Allemagne). Ces tests peuvent être effectués à partir des cultures ou directement à partir de l'échantillon si celui-ci est positif à l'EMD (65). Après extraction de l'ADN bactérien, le produit d'amplification du gène *rpoB* marqué à la biotine est hybridé sur des sondes immobilisées sur une bandelette de nitrocellulose. L'utilisation d'un conjugué avidine-peroxydase permet de révéler la présence d'hybrides par une réaction colorimétrique. Le test INNO-LiPA® utilise par exemple un système de 10 sondes oligonucléotidiques dont l'une est spécifique du complexe *M. tuberculosis* et quatre sont spécifiques des mutations des souches résistantes. Le test INNO-LiPA est doué de très bonnes sensibilité et spécificité ($\geq 95\%$ et 100%) pour la détection de la résistance à la rifampicine lorsqu'il est réalisé à partir des cultures et, à un degré moindre, à partir des échantillons cliniques. Des évaluations complémentaires sont nécessaires dans ce dernier cas, surtout dans les populations de patients où une résistance est fortement suspectée (66). Dans leur présentation actuelle, ces tests nécessitent un équipement sophistiqué et sont très chers (40 euros approximativement le test).

Le principe des puces à ADN repose sur la miniaturisation de l'hybridation de l'ADN obtenu à partir des échantillons cliniques sur des oligonucléotides immobilisés sur un support solide. Elles sont utilisées pour la détection de la résistance à la rifampicine mais restent encore du domaine des centres de recherche (67). Cette tech-

nologie est très chère et complexe. Une évolution majeure de son format est nécessaire pour qu'elle puisse être envisagée dans les PED.

Les techniques de biologie moléculaire peuvent être utilisées pour détecter la résistance du BK à d'autres antituberculeux. Les mécanismes moléculaires supports n'étant pas tous élucidés, elles risquent néanmoins de ne pas identifier les souches résistantes pour lesquelles les mutations associées n'ont pas été identifiées à ce jour (68).

Discussion

Un diagnostic sûr est un préalable indispensable à toute mise en route d'un traitement antituberculeux. Cette règle pourtant simple est encore trop souvent négligée par les professionnels de santé. L'absence de distinction claire entre personnes atteintes et personnes non atteintes de tuberculose compromet l'efficacité de la lutte antituberculeuse. Si une proportion importante de sujets indemnes de tuberculose reçoit un traitement antituberculeux, la confiance dans l'efficacité de celui-ci diminuera, de même que l'observance thérapeutique chez les vrais malades. De plus, un faux diagnostic de tuberculose contribue à la méconnaissance de maladies nécessitant un autre traitement, telles que les cancers pulmonaires, la sarcoïdose ou des infections respiratoires causées par d'autres microorganismes. Si le diagnostic est peu performant, les médecins n'auront plus confiance dans le laboratoire et ne feront appel qu'à leur intuition. A contrario, le sens clinique des médecins se développe grâce à la confrontation avec des résultats biologiques de qualité.

L'OMS, dans son document « Halte à la tuberculose », ambitionne de diagnostiquer 70 % des nouveaux cas de tuberculose à EMD positif et de traiter correctement au moins 85 % d'entre eux. L'absence de prise en compte des tuberculoses à EMD négatif pose problème pour plusieurs raisons. Tout d'abord, elles peuvent concerner des sujets immunodéprimés atteints de formes graves nécessitant un traitement dans les meilleurs délais. Ensuite, la contagiosité de ces cas n'est pas nulle et, surtout, ils peuvent évoluer vers des formes contagieuses méconnues. En effet certains patients, se pensant indemnes de tuberculose en raison de la négativité des examens initiaux, risquent de ne plus consulter ou de le faire trop tardivement.

Actuellement, la stratégie de lutte contre la tuberculose dans les PED est organisée en programmes nationaux sous l'égide de l'OMS. Ces programmes sont articulés autour de centres de diagnostic et de traitement (CDT), dont les missions sont centrées sur la réalisation des EMD et la délivrance des antituberculeux. Il existe en principe un CDT par district sanitaire, correspondant à une population de 50 000 à 150 000 personnes. L'équipement des CDT est souvent pauvre et peut se limiter à une pièce unique, parfois sans eau et sans électricité. Ils sont épaulés par un laboratoire national de référence et dans certains pays par des structures intermédiaires, les laboratoires régionaux, qui eux sont aptes à réaliser les cultures et l'antibiogramme des mycobactéries. Le maillage des CDT est insuffisant, notamment dans les zones rurales enclavées et en périphérie des grandes villes. Près de 60 % des sujets demandeurs de soins n'y ont pas accès et consultent des services de santé de base n'ayant pas intégré les activités de lutte antituberculeuse (6). A l'opposé, la capacité d'accueil des centres des grandes villes est débordée par une trop forte demande. En Afrique de l'Ouest ou Centrale par exemple, plus de 40 % des cas de tuberculose sont diagnostiqués dans la ville principale (69).

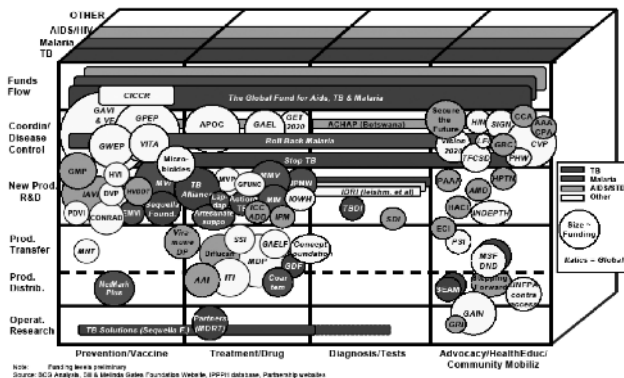


Figure 1. Un diagnostic délaissé par les acteurs (tiré de FIND).

Cette stratégie actuelle de diagnostic de la tuberculose dans les PED, basée sur l'EMD, montre aujourd'hui ses limites, particulièrement dans les cas de co-infection VIH-tuberculose ou de tuberculose multi-résistante. Or un diagnostic fiable et précoce de ces formes cliniques au moyen d'outils performants est essentiel à la fois sur le plan individuel (prise en charge correcte du patient) et sur le plan collectif (interruption de la transmission).

Le développement de nouveaux tests diagnostiques est longtemps resté le parent pauvre de la lutte anti-tuberculeuse et les sommes investies dans ce secteur étaient faibles par rapport à celles consacrées à la prévention (vaccination), au traitement (antibiotiques) ou à l'éducation sanitaire (Fig. 1). Les choses sont en train de changer. L'accroissement du financement mondial de la lutte contre la tuberculose, le développement de partenariats public-privé pour soutenir le développement de nouveaux produits et la prise de conscience de la taille et de la nature du marché potentiel du diagnostic de la tuberculose ont conduit de nombreux laboratoires à investir dans la recherche et le développement de ces nouveaux tests. En effet, le marché mondial du diagnostic de la tuberculose est considérable et représente deux fois celui des médicaments utilisés pour traiter la maladie (9) : dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, où sont effectués les trois quarts des tests de dépistage, près de 326 millions de dollars sont dépensés chaque année en outils de diagnostic.

La mise en place de nouveaux tests diagnostiques doit se faire en plusieurs phases, selon le processus en vigueur pour les médicaments et les vaccins :

Phase 1 : développement préclinique du test ;

Phase 2 : établissement de la preuve de principe du test sur des populations de malades facilement accessibles (capacité à différencier un échantillon positif d'un échantillon négatif) ;

Phase 3 : évaluation des performances du test dans la population cible ;

Phase 4 : détermination du rapport coût/efficacité et intérêt du nouveau test par rapport aux techniques existantes (70). L'impact de ce nouveau test sur la prise en charge de la maladie et sur son poids épidémiologique devra être évalué.

Les tests colorimétriques, par exemple, semblent avoir franchi avec succès les deux premières phases. L'implantation de nouvelles méthodes diagnostiques n'est en effet possible qu'après leur évaluation au cours d'essais cliniques conduits et contrôlés dans les pays où ils seront le plus utiles, c'est-à-dire dans le cas présent, les pays de faibles ressources et de haut niveau d'endémie pour la tuberculose. Plusieurs exemples montrent que des tests paraissant dotés des meilleures qualités en phase de développement peuvent s'avé-

rer décevants lorsqu'ils sont appliqués à la population cible, dans les conditions réelles d'utilisation (71).

Pour l'instant, l'utilisation d'un test doit être adaptée au niveau de la structure de santé existante :

- Centre de santé de base : tests immuno-enzymatiques (antigènes, anticorps) sous forme de dipstick, de tests cutanés ou respiratoires.

- CDT : optimisation de la microscopie par utilisation de la fluorescence, technologie LAMP, nez électronique, rats renifleurs.

- Laboratoire intermédiaire : cultures automatisées en milieux liquides, MGITTM manuel, milieu TK Medium[®], Mods, micro-colonies, méthodes colorimétriques et nitrate réductase, méthode des phages, balises moléculaires (automate complet), ADN urinaire, test d'identification immunoenzymatique sur colonies, tests de production d'interféron.

- Centre de référence : techniques d'amplification génique, sondes ou hybridation inverse.

Les tests qui s'imposeront dans l'avenir en raison de leurs qualités devront peut-être amener les autorités sanitaires à réorganiser la lutte antituberculeuse. Par exemple, la mise à disposition d'un test immunoenzymatique urinaire praticable, performant et peu coûteux pourrait justifier un report de l'investissement dans les CDT vers les centres de santé primaires.

Cependant, la plupart de ces nouvelles techniques ne seront pas suivies d'une utilisation en routine. Certaines d'entre elles pourraient être généralisées assez rapidement (optimisation de l'EMD, détection des micro-colonies...), d'autres ne pourront pas être utilisables avant longtemps.

Conclusion

Le panorama des tests en cours de développement laisse espérer des améliorations tangibles en ce qui concerne l'amélioration du diagnostic bactériologique de la tuberculose dans un futur assez proche. Pour la détermination de la sensibilité de la bactérie aux antituberculeux, les choses semblent plus compliquées. Les tests de sensibilités médicamenteuses, s'ils existent dans les pays riches, ne sont pas encore vraiment disponibles dans les PED et les alternatives à la culture ne sont pas pour demain.

Une meilleure capacité à détecter les résistances passe donc par le développement du réseau des laboratoires aptes à effectuer les cultures, comme cela est prévu dans la stratégie « DOTS-Plus » pour la prise en charge de la tuberculose à bacilles multirésistants (72).

L'extension de ce réseau passe par :

- un abaissement des coûts des matériels (qui sont souvent beaucoup plus chers en Afrique qu'en Europe par exemple) et des réactifs ;

- une maintenance des appareillages simplifiée à l'extrême ;

- une meilleure formation des personnels. Plusieurs initiatives sont développées en ce sens. Nous citerons l'exemple de l'Université Numérique Francophone Mondiale ;

- une meilleure facilité pour envoyer les échantillons dans un but de coopération trans nationale (73).

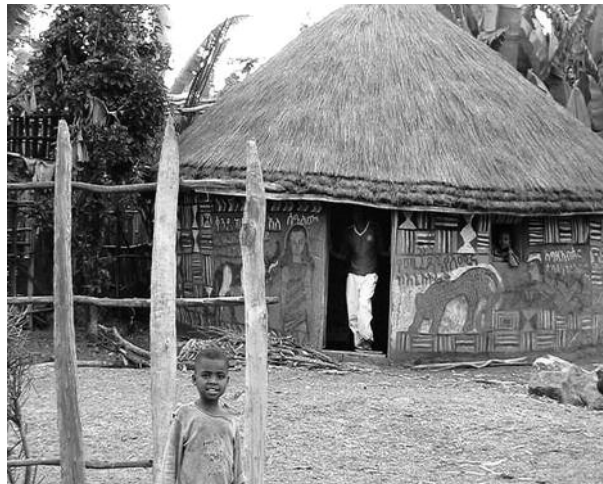
Enfin, il est important aussi de ne pas se focaliser uniquement sur la recherche et le développement mais aussi d'encourager et de soutenir d'autres actions notamment dans le domaine de la recherche fondamentale. En effet, un des freins majeurs à l'élaboration des nouveaux tests diagnostiques est la méconnaissance que l'on a encore de la physiopathologie de la tuberculose : com-

ment *M. tuberculosis* se soustrait-il au système immunitaire, quelle est la nature de la relation infection - maladie, quel est le type de la réponse anticorps, quelle est la charge bactérienne dans les différents fluides biologiques...

Références

- World Health Organization. 44th World Health Assembly : resolutions and decisions WHA 44.8. WHA44/1991/REC/1. WHO ed, Geneva, 1991.
- World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. WHO Report. WHO/HTM/TB/2007.376. Geneva 1-270.
- Squire SB, Belaye AK, Kashoti A, Salaniponi FM, Mundy CJ, Theobald S *et al.* «Lost» smear-positive pulmonary tuberculosis cases: where are they and why did we lose them? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005; 9 : 25-31.
- Dye C, Watt CJ, Bleed DM, Hosseini SM, Raviglione MC. Evolution of tuberculosis control and prospects for reducing tuberculosis: incidence, prevalence and deaths globally. *JAMA* 2005; 293 : 2767-75.
- Harries AD, Hargreaves NJ, Gausi F, Kwanjana JH, Salaniponi FM. High early death rate in tuberculosis patients in Malawi. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5 : 1000-5.
- Perkins MD, Roscigno G, Zumla A. Progress towards improved tuberculosis diagnostics for developing countries. *Lancet* 2006; 367 : 942-3.
- Onyebujoh P, Rodriguez W, Mwaba P. Priorities in tuberculosis research. *Lancet* 2006; 367 : 940-2.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs - worldwide, 2000-2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2006; 55 : 301-5.
- Cunningham J, Perkins M. Diagnostics for tuberculosis: global demand and market potential. WHO/TDR Tuberculosis Diagnostics Economic Working Group 2006, Geneva.
- Stop TB partnership. The global Plan to Stop TB, 2006-2015. www.stoptb.org/globalplan/assets/documents/stopTB_GlobalPlan_FR_web.pdf
- <http://www.finddiagnostics.org>
- Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *J Infect Dis* 2007; 196 : S15-27.
- Guillerm M, Usdin M, Arkin J. *Tuberculosis* diagnosis and drug sensitivity testing: an overview of the current diagnostic pipeline. Médecins sans frontières, 2006.
- Keeler E, Perkins MD, Small P, Hanson C, Reed S, Cunningham J *et al.* Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature* 2006; 444 : 49-57.
- Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Optimizing sputum smear microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; 5 : 327-31.
- Steingart KR, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Ramsay A., Cunningham J *et al.* Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6 : 664-74.
- Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J *et al.* Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006; 6 : 570-81.
- Kivihya-Ndugga LE, van Cleeff MR, Githui WA, Nganga LW, Kibuga DK, Odhiambo JA *et al.* A comprehensive comparison of Ziehl-Neelsen and fluorescence microscopy for the diagnosis of tuberculosis in a resource-poor urban setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003; 7 : 1163-71.
- Hung NV, Sy DN, Anthony RM, Cobelens FG, van Soolingen D. Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7 : 238-9.
- Mase SR, Ramsay A, Ng V, Henry M, Hopewell PC, Cunningham J *et al.* Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11 : 485-95.
- Boehme C, Molokova E, Minja F, Geis S, Loscher T, Maboko L *et al.* Detection of mycobacterial lipoarabinomannan with an antigen-capture ELISA in unprocessed urine of Tanzanian patients with suspected tuberculosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2005; 99 : 893-900.
- Svenson SB, Hamasur B, Pawlowski A. Towards development of new point of patient care tuberculosis diagnostics. 37th Union World Conference on Lung Health 2006, Paris, abstract PS-61862-02.
- Hillemann D, Rüscher-Gerdes S, Richter E. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9 : 1409-11.
- <http://www.proteomesystems.com/Discovery/ResearchPrograms/tuberculosis.aspx>
- Steingart KR, Henry M, Laal S, Hopewell PC, Ramsay A, Menzies D *et al.* Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Plos Med* 2007; 4 : e202
- Weldingh K, Rosenkrands J, Okkels LM, Doherty TM, Andersen P. Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens. *J Clin Microbiol* 2005; 43 : 57-65.
- Davidow A, Kanaujia GV, Shi L, Kaviar J, Guo X, Sung N *et al.* Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. *Infect Immun* 2005; 73 : 6846-51.
- Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis: Part I. Latent tuberculosis. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6 : 413-22.
- Nakamura RM, Einck L, Velmonte MA, Kawajiri K, Ang CF, Delasilaga CE *et al.* Detection of active tuberculosis by an MPB-64 transdermal patch: a field study. *Scand J Infect Dis* 2001; 33 : 405-7.
- Geisbrecht BV, Nikonenko B, Samala R, Nakamura R, Nacy CA, Sacksteder KA. Design and optimization of a recombinant system for large-scale production of the MPB64 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr Purif* 2006; 46 : 64-72.
- Phillips M, Cataneo RN, Condos R, Ring Erikson GA, Greenberg J, La Bombardi V *et al.* Volatile biomarkers of pulmonary tuberculosis in the breath. *Tuberculosis* 2007; 87 : 44-52.
- Tobias HJ, Shafer MP, Pitesky M, Ferguson DP, Horn J, Franck M *et al.* Bioaerosol mass spectrometry for rapid detection of individual airborne *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra particles. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 : 6086-95.
- Deisingh AK, Stone DC, Thompson M. Applications of electronic noses and tongues in food analysis. *Int J Food Sci Technol* 2004; 39 : 587-604.
- Fend R, Kolk AH, Bessant C, Buijtel P, Klatser PR, Woodman AC. Prospects for clinical application of electronic-nose technology to early detection of *Mycobacterium tuberculosis* in culture and sputum. *J Clin Microbiol* 2006; 44 : 2039-45.
- <http://www.apopo.org/technology/tuberculose.html>
- Macondo EA, Ba F, Toure-Kane NC, Kaire O, Gueye-Ndiaye A, Gaye-Diallo A *et al.* Amélioration du diagnostic de la tuberculose par le Mycobacteria Growth Indicator tube (MGIT) dans un laboratoire de pays en développement. *Bull Soc Pathol Exot* 2000; 93 : 97-100.
- Moore DA, Evans CA, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Vivar A *et al.* Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006; 355 : 1539-50.
- Arias M, Mello FC, Pavón A, Marsico AG, Alvarado-Gálvez C, Rosales S *et al.* Clinical evaluation of the microscopic-observation drug-susceptibility assay for detection of tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2007; 44 : 674-80.
- Shiferaw G, Woldeamanuel Y, Gebeyehu M, Girmachew F, Demessie D, Lemma E. Evaluation of microscopic observation drug susceptibility assay for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45 : 1093-7.
- Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59 : 175-83.
- Abate G, Aseffa A, Selassie A, Goshu S, Fekade B, WoldeMeskal D *et al.* Direct colorimetric assay for rapid detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42 : 871-3.
- Piersimoni C, Scarparo C, Cichero P, De Pezzo M, Covelli I., Gesu G *et al.* Multicenter evaluation of the MB-Redox medium compared with radiometric BACTEC system, mycobacteria growth indicator tube (MGIT), and Löwenstein-Jensen medium for detection and recovery of acid-fast bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34 : 293-9.
- da Silva PA, Boffo MM, de Mattos IG, Silva AB, Palomino JC, Martin A *et al.* Comparison of redox and D29 phage methods for detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12 : 293-6.
- Affolabi D, Odoun M, Martin A, Palomino JC, Anagonou S, Portaels F. Evaluation of direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* rifampin resistance by a nitrate reductase assay applied to sputum samples in Cotonou, Benin. *J Clin Microbiol* 2007; 45 : 2123-5.
- Martin A, Montoro E, Lemus D, Simboli N, Morcillo N, Velasco M *et al.* Multicenter evaluation of the nitrate reductase assay for drug resistance detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Microbiol Methods* 2005; 63 : 145-50.
- Musa HB, Ambroggi M, Souto A, Angeby KA. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* by a nitrate reductase assay applied directly on microscopy- positive sputum samples. *J Clin Microbiol* 2005; 43 : 3159-61.

47. Pai M, Kalantri S, Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of *tuberculosis*: Part II. Active *tuberculosis* and drug resistance. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6: 423-32.
48. Baylan O, Kisa O, Albay A, Doganci L. Evaluation of a new automated, rapid, colorimetric culture system using solid medium for laboratory diagnosis of *tuberculosis* and determination of anti-*tuberculosis* drug susceptibility. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 772-7.
49. Kocagoz T, O'Brien R, Perkins M. A new colorimetric culture system for the diagnosis of *tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; 8: 1512.
50. Kocagoz T, Tiryaki S, Silier T, Güney C. TK System, the colorimetric mycobacterial culture system enables rapid, easy and effective diagnosis of *tuberculosis* [poster] Toronto: ASM General Meeting, May 21-24, 2006.
51. Welch DF, Guruswamy AP, Sides SJ, Shaw CH, Gilchrist MJ. Timely culture for mycobacteria which utilizes a microcolony method. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2178-84.
52. Robledo JA, Mejía GI, Morcillo N, Chacón L, Camacho M, Luna J *et al.* Evaluation of a rapid culture method for *tuberculosis* diagnosis: a Latin American multi-center study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 613-9.
53. Flournoy D, Twilley J. Modified Middlebrook 7H9 broth for the rapid detection of mycobacteria. *Clin Lab Sci* 2001; 14: 85-8.
54. Kalantri S, Pai M, Pascopella L, Riley L, Reingold A. Bacteriophage-based tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 59.
55. Irfan S, Hasan R, Kanji A, Hassan Q, Azam I. Evaluation of a microcolony detection method and phage assay for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum samples. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 1187-95.
56. Pai M, Kalantri S, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. *J Infect* 2005; 51: 175-87.
57. McNerney R, Kambashi BS, Kinkese J, Tembwe R, Godfrey-Faussett P. Development of a bacteriophage phage replication assay for diagnosis of pulmonary *tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2115-20.
58. Traore H, Ogwang S, Mallard K, Joloba ML, Mumbowa F, Narayan K *et al.* Low-cost rapid detection of rifampicin resistant *tuberculosis* using bacteriophage in Kampala, Uganda. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; 6: 1.
59. Nahid P, Pai M, Hopewell PC. Advances in the diagnosis and treatment of *tuberculosis*. *Proc Am Thorac Soc* 2006; 3: 103-10.
60. Iwamoto T, Sonobe T, Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 2616-22.
61. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza P, Ragib R, Rahim Z, Gerhardt M *et al.* Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for the diagnosis of pulmonary *tuberculosis* in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1936-40.
62. Goletti D, Cannas A, Chiacchio T, Umanski S, Melkonyan H. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* transrenal DNA from urine samples of patients with pulmonary TB. In: Program and abstracts of 35th World Conference on Lung Health of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (Paris). Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. 2005.
63. Lin SY, Probert W, Lo M, Desmond E. Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4204-8.
64. Piatek AS, Telenti A, Murray MR, El-Hajj H, Jacobs WR Jr, Kramer FR *et al.* Genotypic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* in two distinct populations using molecular beacons: implications for rapid susceptibility testing. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 103-10.
65. Somoskovi A, Dormandy J, Mitsani D, Rivenburg J, Salfinger M. Use of smear-positive samples to assess the PCR-based genotype MTBDR assay for rapid, direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex as well as its resistance to isoniazid and rifampin. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4459-63.
66. Morgan M, Kalentri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 62.
67. Kim SY, Park YJ, Song E, Jang H, Kim C, Yoo J *et al.* Evaluation of the CombiChip Mycobacteria Drug-Resistance detection DNA chip for identifying mutations associated with resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 203-10.
68. Traore H, Fissette K, Bastian I, Devleeschouwer M, Portaels E. Detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an initial indicator of multidrug resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 481-4.
69. Trébuq A. La lutte contre la tuberculose dans le monde: résultats et défis. *Med Trop* 2004; 64: 587-94.
70. Van der Schouw YT, Verbeek AL, Ruijs SH. Guidelines for assessment of new diagnostic tests. *Invest Radiol* 1995; 30: 334-40.
71. Small PM, Perkins MD. More rigour needed in trials of new diagnostic agents for tuberculosis. *Lancet* 2000; 356: 1048-9.
72. OMS. Lignes directrices relatives à la mise en place des projets pilotes «DOTS-Plus» pour la prise en charge de la tuberculose à bacilles multirésistants [TB-MR]. WHO/CDS/TB/2000.279.
73. Farmer P, Furin J, Bayona J, Becerra M, Henry C, Hiatt H *et al.* Management of MDR-TB in resource-poor countries. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 643-5.



Maison en Ethiopie © Maslin J.