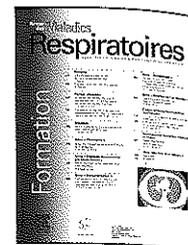




Disponible en ligne sur  
**SciVerse ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com



SÉRIE « TUBERCULOSES ET MYCOBACTÉRIOSES »  
Coordonnée par F.X. Blanc, J.-P. Janssens et M. Underner

## Les nouveaux tests diagnostiques de la tuberculose maladie : de la théorie à la pratique dans les pays du Sud

New diagnostic tests for tuberculosis in southern countries: From theory to practice in Southern countries

**M. Bonnet**

*Epicentre, Médecins-Sans-Frontières, 78, rue de Lausanne, 1211 Genève 21, Suisse*

Reçu le 16 décembre 2010 ; accepté le 2 avril 2011  
Disponible sur Internet le 8 novembre 2011

### MOTS CLÉS

Diagnostic ;  
Tuberculose ;  
VIH

### Résumé

**Introduction.** – La tuberculose (TB) est responsable d'environ 1,7 millions de décès par an. Dans les pays du Sud, l'examen microscopique des crachats ne diagnostique que 50 % des TB pulmonaires. Aucun test ne remplacera la microscopie dans les structures périphériques dans un avenir proche.

**État des connaissances.** – Depuis 2007, l'OMS a recommandé sept nouveaux tests ou approches diagnostiques de la TB pour les pays du Sud, pour les laboratoires périphériques : 1) amélioration de l'examen microscopique avec révision des définitions de cas frottis-positifs ; 2) réduction du nombre d'examens de crachat ; 3) examen de deux crachats collectés le même jour ; 4) utilisation de la microscopie à fluorescence avec lampes LED et pour les laboratoires de référence ; 5) culture rapide sur milieu liquide ; 6) identification rapide de la mycobactérie avec test antigénique ; 7) bandelette moléculaire pour la détection rapide de la TB multirésistante.

**Perspectives.** – Le développement récent de PCR automatisée devrait permettre d'améliorer le diagnostic de la TB chez les patients infectés par le VIH en dehors des laboratoires de référence.

**Conclusion.** – Malgré les progrès récents dans le diagnostic de la TB, la recherche reste indispensable pour obtenir des tests rapides qui ne soient pas dépendants du crachat, utilisables en périphérie et dont les performances restent élevées chez les patients infectés par le VIH et l'enfant.

© 2011 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Adresse e-mail : maryline.bonnet@geneva.msf.org

**KEYWORDS**

Tuberculosis;  
Diagnosis;  
HIV

**Summary**

**Introduction.** — Tuberculosis (TB) is responsible of 1.7 millions of deaths per year worldwide. In high burden countries sputum smear-microscopy diagnoses only half of the cases of pulmonary TB. It is unlikely that a new test will replace smear-microscopy in peripheral services in the short term.

**Background.** — Between 2007 and 2009 WHO recommended the introduction of seven new tests or diagnostic approaches for high burden countries, for peripheral laboratories: 1) the optimisation of smear-microscopy using the revised smear-positive case definitions; 2) examination of two specimens instead of three; 3) examination of two specimens collected on the same day; 4) the use of light-emitting diode based fluorescence microscopy and for reference laboratories: 5) the use of liquid medium culture; 6) the use of rapid antigenic identification tests; 7) the rapid detection of rifampicin resistance.

**Viewpoints.** — The recent development of a fully automated nucleic acid amplification test for both TB detection and detection of rifampicin resistance will soon improve the diagnosis of TB in HIV infected patients outside reference laboratories in high burden countries.

**Conclusion.** — Despite the recent advances in TB diagnosis, there is need for more research to develop point of care tests that do not depend on sputum specimens, that are practicable at peripheral units and that are highly sensitive in HIV infected patients and children.

© 2011 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Introduction**

Avec deux milliards de personnes infectées et 9,4 millions de nouveaux malades par an, la tuberculose (TB) est, à l'échelle mondiale, une maladie infectieuse majeure. Un tiers des cas surviennent sur le continent africain en raison de l'épidémie VIH [1]. Elle est responsable de 1,5 à deux millions de décès chaque année dont un quart chez des patients infectés par le VIH (VIH-positifs) [1]. Les pays à haute prévalence de TB (>100 cas/100 000 habitants) sont dans 90% des cas des pays en voie de développement [1].

Dans les pays du Sud, le diagnostic de la TB repose principalement sur la détection microscopique de bacilles alcoolorésistants (BAAR) dans les crachats des patients [2]. La méthode de Ziehl-Neelsen, datant de 1880, est la méthode la plus fréquemment utilisée. C'est un examen rapide, simple, bon marché et très spécifique (>95% dans les pays à haute prévalence), mais de faible sensibilité en comparaison avec la culture de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) [3,4]. Sa sensibilité varie avec la qualité et le volume de l'expectoration, le statut immunitaire du patient, l'expérience et la charge de travail du microscopiste. En condition de routine, la sensibilité évolue entre 35 et 80% chez les patients non infectés par le VIH (VIH-négatifs) et peut chuter jusqu'à 20% chez les patients VIH-positifs, en raison de leur difficulté à expectorer et de la diminution des formes de TB bronchique à un stade avancé d'immunodépression [3-7]. Sa sensibilité est aussi très faible (15%) chez les jeunes enfants [3,8]. L'OMS recommande d'examiner un set de trois crachats collectés sur deux jours consécutifs, ce qui s'accompagne souvent de retards diagnostiques et de perdus de vue entre l'examen du premier et du troisième crachat [9,10].

La culture de MTB est le diagnostic de référence de la TB. Elle nécessite un niveau d'infrastructure et d'expertises disponibles seulement dans certains laboratoires de référence des pays du Sud. Le lavage bronchoalvéolaire et le diagnostic moléculaire de la TB, d'utilisation courante dans les

pays du Nord, ne sont utilisés que dans certains hôpitaux de référence dans les pays du Sud [11].

Pour toutes ces raisons, dans les pays du Sud, plus de la moitié des patients traités pour une TB, le sont sans preuve bactériologique. La décision thérapeutique est empirique, se basant sur la présence de signes cliniques et radiologiques suggestifs d'une TB, en l'absence de réponse clinique à un traitement antibiotique d'épreuve ciblant les germes responsables de pneumonie communautaire [12]. L'utilisation de ces algorithmes diagnostiques est difficile du fait de l'accès restreint à l'examen radiographique dans beaucoup de centres de santé et de la qualité souvent médiocre des radiographies [13-17]. Elle s'accompagne de retards diagnostiques, de traitements antituberculeux prescrits à tort et d'un sous-diagnostic de la TB [15,18-20]. Enfin, ces algorithmes ne diagnostiquent pas les formes infracliniques de TB décrites chez 15 à 20% des patients VIH-positifs sévèrement immunodéprimés [18-22].

Le contrôle de l'épidémie de TB dans les pays du Sud nécessite de nouveaux tests diagnostiques qui soient plus sensibles que l'examen microscopique, notamment chez les patients VIH-positifs et les enfants; dont les résultats soient disponibles avant que le patient ne quitte le centre de santé; et qui soient suffisamment simples pour être utilisés par du personnel peu qualifié [23-25]. À ce jour, aucun test ne remplit toutes ces conditions et l'obtention d'un tel test dépendra des progrès de la recherche fondamentale sur les marqueurs biologiques de la TB maladie [26]. Néanmoins, depuis 2007, le groupe d'expert stratégique et technique pour la TB de l'OMS (STAG-TB) a recommandé l'utilisation de sept nouveaux outils ou approches diagnostiques de la TB dans les pays du Sud [27].

Cette revue dresse un état des lieux des nouveaux outils et approches diagnostiques de la TB maladie disponibles ou à venir pour les pays du Sud, avec un intérêt particulier pour la TB pulmonaire de l'adulte dans les contextes à haute prévalence d'infection VIH.

## Dépistage des cas suspects de tuberculose

Dans la stratégie de lutte contre la TB de l'OMS, le dépistage de la TB est passif. Il repose sur le l'examen microscopique des crachats de patients suspects de TB, définis par l'existence d'une toux chronique, se présentant d'eux-mêmes au centre de santé [12,28]. Pour les pays à haute prévalence d'infection VIH ( $\geq 1\%$  dans la population des femmes enceintes ou  $\geq 5\%$  chez les patients tuberculeux adultes), la durée de la toux chronique a été réduite de trois à deux semaines [13,29]. Dans les pays du Sud, le désavantage de ce dépistage passif est la présentation tardive des patients, que ce soit en raison de la distance entre l'habitat et le centre de santé, du coût du transport, de l'utilisation de médecine traditionnelle, de la peur, de la stigmatisation ou d'autres priorités familiales [30,31]. Le dépistage passif des patients frottis-positifs contribue aussi au sous-diagnostic et au diagnostic tardif de la TB chez les patients VIH-positifs.

Pour les patients VIH-positifs, un dépistage actif intensifié est recommandé lors de chaque visite dans un centre de santé [32]. En l'absence d'un test de dépistage sensible, simple et rapide, un dépistage symptomatique est proposé afin d'identifier rapidement les patients pouvant être suspects de TB et nécessitant des investigations complémentaires. Plusieurs études dont une méta-analyse récente ont montré qu'un questionnaire portant sur quatre symptômes (toux, perte de poids, fièvre et sueurs nocturnes) avait une sensibilité globale de 78,9% (IC95% 58,3%–90,9%) et une spécificité de 49,6% (95%IC 29,2%–70,1%) [20,33–36]. Ce questionnaire avait des valeurs prédictives négatives entre 98% et 90% pour des prévalences de TB variant entre 1% et 20%, permettant d'exclure une TB chez un patient VIH-positif avec un questionnaire négatif [36]. Cela a un intérêt majeur pour l'exclusion de la TB avant de débiter une prophylaxie par isoniazide. Des stratégies de dépistage actif intensifié répété dans les communautés, que ce soit au domicile des patients ou avec un bus médicalisé, ont montré une réduction de 40% des cas contagieux de TB après intervention [37].

Le dépistage actif radiologique de la TB chez les patients VIH-positifs dans les pays du Sud reste controversé avec des sensibilités variant entre 27 et 81% selon les études [15,34,38–43]. Son coût élevé, la mauvaise qualité des clichés et les difficultés de lecture diminuent la faisabilité de ce type de dépistage dans ces pays [44]. Cela pourrait changer avec l'introduction de la radiographie digitale et l'utilisation de grilles de lecture standardisées [45].

- Dépistage passif des patients avec toux chronique par l'examen microscopique des crachats.
- Nécessité d'un dépistage actif intensifié chez les patients infectés par le VIH. Proposition d'un dépistage symptomatique sur quatre signes cliniques: toux, perte de poids, fièvre et sueurs nocturnes.
- Pas de recommandation claire quant à un dépistage radiologique dans les pays du Sud.

## Examen microscopique

Plusieurs interventions permettent d'améliorer les performances de l'examen microscopique, en commençant par la révision du seuil de 10 BAAR/100 champs longtemps recommandé par l'OMS pour définir un résultat frottis-positif et l'examen de trois crachats [3,46–48]. L'abaissement du seuil à 1 BAAR/100 champs augmente la sensibilité de l'examen microscopique, notamment chez les patients dont les expectorations sont de moins bonne qualité et de plus faible volume comme les femmes et les patients immunodéprimés [49–51]. Plusieurs études, dont une méta-analyse, ont montré le très faible gain (+2,3%) de l'examen microscopique du troisième crachat [52–54]. En 2008, l'OMS a révisé la définition de cas frottis-positif pour les pays à haute prévalence d'infection VIH, définissant un cas frottis-positif à partir d'un résultat de crachat frottis positif ( $\geq 1$  BAAR/100 champs), sur deux crachats collectés, le deuxième n'étant examiné que si l'examen du premier est négatif [6,55]. Au niveau programmatique, cette nouvelle définition de cas permet d'alléger la charge de travail des laboratoires, d'améliorer ainsi la qualité de la lecture des frottis et secondairement la sensibilité de la microscopie, de réduire le coût de l'examen microscopique et de limiter le nombre de patients perdus de vue en cours d'investigation microscopique [54,56–59]. Pour diminuer le nombre de visites du patient au centre de santé, des approches alternatives, telles que l'examen de deux crachats collectés le même jour à une heure d'intervalle ou l'examen de deux frottis réalisés à partir d'un seul crachat, sont proposées avec des performances équivalentes à celles de l'examen de deux crachats collectés sur deux jours consécutifs [60–62].

La microscopie à fluorescence après coloration à l'auramine augmente la sensibilité de la microscopie d'environ 10% par rapport à la méthode classique de Ziehl-Neelsen et permet une lecture entre trois à quatre fois plus rapide des frottis, lus sous plus faible grossissement [63]. Dans les pays du Sud, cet examen n'est utilisé que dans les laboratoires de référence en raison du coût du microscope à fluorescence, de l'utilisation de lampes à vapeur de mercure et des besoins d'une chambre noire [63]. Les systèmes récents utilisant des lampes *light-emitting diodes* (LED) incorporées ou s'adaptant sur un microscope à lumière claire, sans nécessité de chambre noire, sont une bonne alternative au microscope à fluorescence conventionnel pour les laboratoires périphériques des pays du Sud [63–68]. Ces lampes ont l'avantage d'avoir une durée de vie de 10 000 heures contre 200 heures pour les lampes à mercure, ne produisent pas d'ultraviolet et nécessitent beaucoup moins d'électricité que la microscopie conventionnelle [69]. Ces nouvelles méthodes sont actuellement recommandées par l'OMS en remplacement des méthodes conventionnelles de fluorescence et pourraient prochainement se substituer à la méthode de Ziehl-Neelsen dans les pays du Sud [61].

Il est aussi possible d'optimiser l'examen microscopique en améliorant la qualité de l'expectoration. Des mesures simples de motivation et une vérification systématique de la qualité des expectorations évaluées dans un essai clinique randomisé au Pakistan ont permis d'augmenter significativement le rendement diagnostique de l'examen microscopique chez les femmes, en améliorant la qualité et en augmentant le volume des expectorations [70,71]. Des méthodes

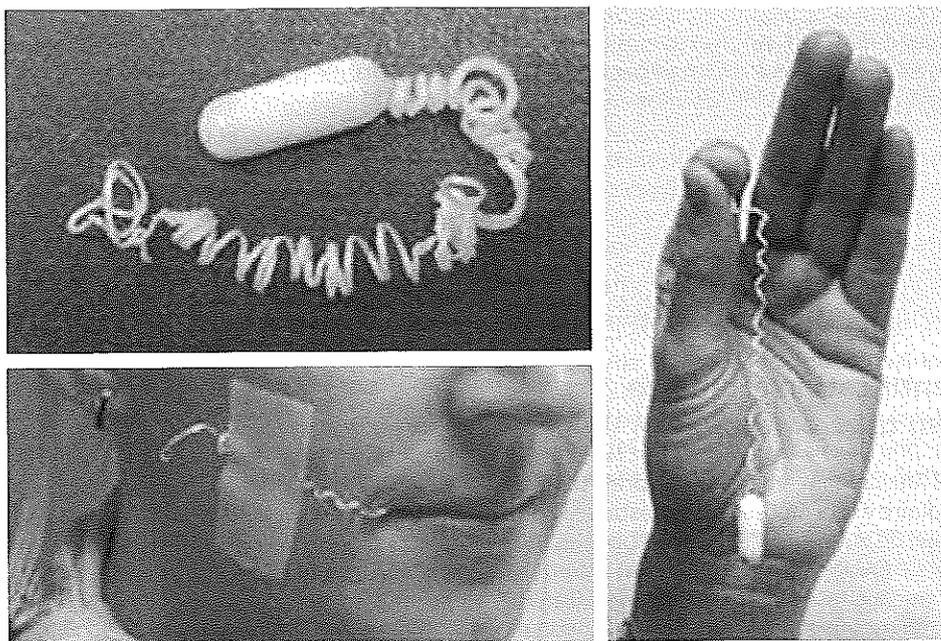


Figure 1. String test.

d'induction du crachat après nébulisation de sérum salé hypertonique ont des résultats similaires, voire supérieurs à ceux des tubages gastriques chez les enfants et chez les adultes ne pouvant pas cracher, avec une meilleure acceptabilité par les patients et la possibilité d'être réalisés en ambulatoire [72–74]. Néanmoins, ces méthodes augmentent le risque de contamination du manipulateur par le bacille de la TB et nécessitent des mesures de protection qui ne sont pas toujours disponibles dans les centres de santé des pays du Sud. Des alternatives au tubage gastrique, comme l'aspiration nasogastrique, l'utilisation du String Test (fil de nylon contenu dans une capsule gélatineuse avalée par le patient pour collecter les bacilles déglutis) ou du Lung Flute (vibrations intrabronchiques obtenues lorsque le patient souffle dans une petite flûte) sont en cours d'évaluation [75–78] (Fig. 1 et 2).

Enfin, la concentration préalable du crachat peut aussi augmenter la sensibilité de l'examen microscopique. Les méthodes de concentration étudiées associent classiquement une première phase de liquéfaction du crachat par un agent chimique, puis une deuxième phase de concentration par centrifugation ou sédimentation par gravité [46,79,80]. Par rapport à la centrifugation, la sédimentation

nocturne a l'avantage de ne pas nécessiter d'électricité et d'éviter les risques d'aérosols. Elle est donc mieux adaptée aux conditions des laboratoires des centres de santé périphériques des pays du Sud [80]. L'agent chimique le plus fréquemment utilisé est l'hypochlorite de sodium (NaOCl) en raison de sa grande disponibilité et de son faible coût. Une méta-analyse récente décrit une différence significative de sensibilité de 6% pour la méthode avec centrifugation et de 9% pour la méthode avec sédimentation nocturne en comparaison avec la méthode classique [81]. Néanmoins, ces méthodes s'accompagnent d'une faible diminution de spécificité [81,82]. En effet, l'augmentation des débris après digestion du crachat par le NaOCl peut créer des artéfacts et induire des résultats microscopiques faussement positifs [81]. En raison de la variabilité de la sensibilité entre les études, en partie expliquée par l'absence de standardisation des méthodes de concentration et la variation de prévalence d'infection VIH dans les populations d'étude, d'un gain de sensibilité modéré et de l'augmentation de la charge de travail du laboratoire, leur utilisation n'est pas à ce jour recommandée par l'OMS [81,83]. D'autres méthodes utilisant des agents chimiques avec un plus fort pouvoir de concentration ou des techniques de filtration du crachat sont en cours d'évaluation [84,85].

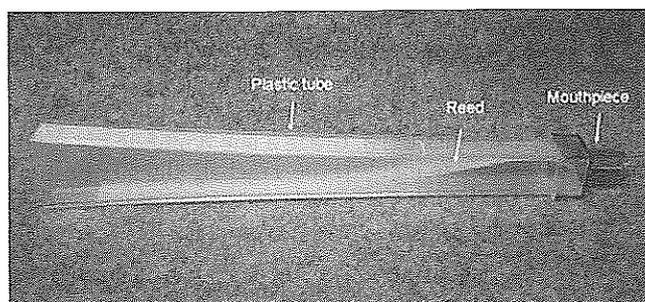


Figure 2. Lung Flute.

- Examen microscopique des crachats: sensibilité entre 35 et 80% en condition de routine, diminuée chez les patients infectés par le VIH. Sa sensibilité dépend de la qualité et du volume d'expectoration. Examen technicien dépendant. Seul examen disponible dans la majorité des centres de santé des pays du Sud.

- Révision des définitions de cas frottis-positifs : au moins un crachat frottis positif ( $\geq 1$  bacille par 100 champs microscopiques) et examen de deux crachats.
- La microscopie à fluorescence : 10% plus sensible que la méthode de Ziehl-Neelsen. Le développement de microscopes équipés avec lampes LED permet son utilisation dans les laboratoires périphériques des pays du Sud.

## Culture et identification rapide de *Mycobacterium tuberculosis*

La culture de MTB du crachat ou d'autres prélèvements bronchique ou alvéolaire est la méthode diagnostique la plus sensible, avec un seuil de détection de dix à 100 bacilles/mL, contre 5000 et 10 000 BAAR/mL pour l'examen microscopique [86]. Elle augmente la détection de TB de 30 à 50% par rapport à la microscopie, permet de diagnostiquer les patients plus précocement, avant qu'ils ne deviennent plus infectieux et fournit le matériel nécessaire à la réalisation d'antibiogrammes [87]. En comparaison avec la méthode classique sur milieu solide de Lowenstein-Jensen (LJ), les méthodes sur milieu liquide ont une sensibilité supérieure de 10–15%, sont automatisables et réduisent les délais de résultats de six à deux semaines [88–91]. Elles détectent plus fréquemment les mycobactéries atypiques que les méthodes sur milieu de LJ. La plus répandue dans les pays du Sud est la culture MGIT sur milieu de Middlebrook 7H9 modifié. Le développement de tests rapides d'identification de l'antigène MPT64 (eg. CapiliaTB-Neo®, BIOLINE TB Ag. MPT64® [Eurobio] ou BD MGIT TBc® identification test [Beckton Dickinson]) combiné à l'identification morphologique cordoïde de MTB permet une identification plus rapide et plus simple de MTB que les techniques d'identification biochimiques et moléculaires [92,93]. La culture sur milieu liquide et le test Capilia TB® sont actuellement recommandés par l'OMS pour le diagnostic des patients frottis-négatifs. Un groupe d'experts en a précisé les conditions d'introduction pour les pays du Sud [55].

Outre le coût qui reste élevé, la culture sur milieu liquide s'accompagne d'un risque plus important de contamination que la méthode de LJ [94,95]. Le manque d'infrastructures adaptées, notamment en ce qui concerne les conditions de biosécurité, de programmes d'assurance qualité et de personnel bien formé compliquent les possibilités de décentralisation de la culture de MTB dans les pays du Sud [96–98].

Des alternatives non commerciales avec des délais de résultats équivalents voire plus rapides que ceux de la méthode MGIT sont proposées [99,100]. Certaines se basent sur l'identification précoce de l'aspect cordoïde de MTB sous examen microscopique, telles que la *microscopic observation drug susceptibility assay* (MODS) sur milieu liquide ou la méthode de *thin layer agar* (TLA) (méthode sur couche mince) sur milieu gélosé. Leurs performances sont proches de celles de la méthode de LJ avec des délais de résultats positifs d'environ dix jours et possibilités d'antibiogrammes [101–104]. D'autres méthodes dites colorimétriques basées sur les capacités de MTB de réduction

oxydative d'un indicateur coloré (Alamar Blue, résazurine, nitrate réductase) permettent une identification rapide de MTB à l'œil nu et des antibiogrammes simplifiés à partir d'une culture primaire [105]. Certaines de ces méthodes non commerciales sont actuellement recommandées par l'OMS comme une alternative au MGIT pour le diagnostic rapide de la résistance aux antituberculeux [106]. Les possibilités de substitution de l'étape de centrifugation du crachat par une technique de filtration beaucoup moins chère et moins risquée en termes de transmission sont en cours d'évaluation [107].

- Culture de MTB : examen de référence du diagnostic de TB. Nécessite un niveau d'infrastructure et d'expertise qui n'est disponible que dans les laboratoires de référence dans les pays du Sud.
- Culture sur milieu liquide : 10 à 20% plus sensible et plus rapide que la culture sur milieu solide. Risque plus important de contamination.

## Méthodes moléculaires

L'amplification du génome de MTB par des techniques *polymerase chain reaction* (PCR) peut être utilisée pour le diagnostic rapide (en quelques heures) de la TB et la détection rapide de la résistance à certains antituberculeux.

En ce qui concerne le diagnostic de TB, bien qu'ayant une bonne spécificité, la sensibilité des méthodes commerciales et non commerciales classiques reste très variable et globalement inférieure à celle de la culture, notamment lorsqu'il s'agit de spécimens pauvres en bacilles (frottis-négatifs), de faible volume ou en présence de substances inhibitrices [108–110]. Les méthodes commerciales qui reposent principalement sur des tests d'hybridation sur bandelette après amplification ont une sensibilité globale de 85% (36 à 100%) et une spécificité de 97% (54 à 100%) pour le diagnostic de la TB pulmonaire (mélange de spécimens BAAR positifs et négatifs), et des sensibilités de 56% et 62% pour le diagnostic des formes méningées et pleurales, d'après les résultats de méta-analyses récentes [109,111,112]. Les techniques de PCR en temps réel sont plus sensibles que les méthodes classiques, mais restent relativement complexes.

Jusqu'à ce jour, les méthodes PCR, que ce soit en raison de leur sensibilité inférieure à celle de la culture ou du niveau relativement élevé d'infrastructure et d'expertise qu'elles exigent, n'étaient pas recommandées pour le diagnostic de la TB dans les pays du Sud.

Cela est en train de changer avec le développement récent de méthodes PCR en temps réel en circuit fermé et automatisées, comme le test Xpert MTB/RIF® (Cepheid, Sunnyvale, CA, États-Unis). Grâce à une limite de détection de 131 colonies par millilitre de crachat, dans une étude prospective multicentrique, la sensibilité du Xpert MTB/RIF® variait entre 72 et 92% chez les patients BAAR négatifs selon que le test était réalisé sur un, deux ou trois crachats avec une spécificité de 99% [113]. Ce test permet aussi la détection concomitante de la résistance à la rifampicine. Bien que sa technologie soit très avancée, il est simple

d'utilisation, nécessite peu de manipulations et a un risque faible de production d'aérosol, ce qui permet en théorie son utilisation par du personnel peu qualifié au niveau de centres de santé de district dans les pays du Sud [114]. Bien que tout récemment recommandé par l'OMS ([http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/tb\\_test.20101208/en/index.html](http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/tb_test.20101208/en/index.html)), la place de ce nouveau test dans l'algorithme diagnostique, notamment pour les pays à forte prévalence d'infection VIH, les conditions opérationnelles d'introduction du test et les possibilités de réductions de prix (15 € par test) pour en faciliter l'accès aux pays du Sud restent à préciser [115].

Certaines équipes travaillent sur la détection de l'ADN de MTB dans les urines et dans les selles pour le diagnostic de la TB disséminée ou de la TB pulmonaire chez les patients ne pouvant pas cracher (enfants et patients immunodéprimés). Les résultats sont à ce jour assez décevants [116–118].

En raison du nombre limité de mutations sur le gène *rpoB* responsables de la résistance à la rifampicine, des méthodes d'amplification génique spécifique suivie d'une hybridation sur bandelette, utilisées directement sur le crachat frottis-positif, permettent une détection rapide de la résistance à la rifampicine. Cette dernière est un très bon marqueur de la TB multirésistante (résistance à la rifampicine et à l'isoniazide) [119,120]. L'OMS recommande l'utilisation des méthodes de *line probe assay* (LPAs), comme le INNO-LiPA Rif.TB® (Innogenetics NV, Gent, Belgique) et le GenoType® MTBDRplus (Hain Lifescience G,bH, Nehren, Allemagne) pour les laboratoires de référence des pays du Sud [100,121]. Le GenoType MTBDRplus a la particularité de détecter aussi les mutations responsables de la résistance à l'isoniazide.

- PCR moins sensible que la culture pour la détection de MTB. Niveau d'infrastructure et d'expertise équivalent à celui de la culture.
- En méthode directe sur crachat frottis-positif, la PCR permet le diagnostic rapide (deux heures) de la résistance à la rifampicine, qui est un très bon marqueur de TB multirésistante.
- Développement de PCR en temps réel automatisée (XpertTB/RIF) avec une sensibilité de 70% pour la détection de MTB chez les patients frottis-négatifs et permettant le diagnostic concomitant de la résistance à la rifampicine. Pour les pays du Sud, ce test pourrait dans un avenir proche se substituer à la microscopie ou en être un complément pour le diagnostic de la TB dans les contextes à haute prévalence d'infection VIH. Il devrait aussi permettre le dépistage rapide de la TB multirésistante dans les contextes à haute prévalence de TB résistante aux antituberculeux.

## Diagnostic immunologique

L'intradermoréaction (IDR) à la tuberculine fait partie des examens recommandés dans l'algorithme diagnostique de la TB chez l'enfant, mais en raison de la vaccination systématique par le BCG, du risque d'anergie tuberculique chez les

patients VIH-positifs, des difficultés d'approvisionnement en tuberculine via les programmes nationaux et de la nécessité de faire revenir les patients pour la lecture du test, cet examen est très peu utilisé dans les pays du Sud [122]. D'après une méta-analyse récente, la sensibilité des tests de relargage d'interféron gamma (IGRA) dans le sang périphérique pour le diagnostic de la TB maladie est de 80%, proche de celle de l'IDR (77%), mais avec une faible spécificité de 59% pour T-SPOT.TB (Oxford Immunotec Ltd., Abingdon, UK) et 79% pour QFT-G-IT (Cellestis Ltd., Cernegie, Australie), ne permettant pas de distinguer une infection latente d'une TB maladie [123,124]. Les évaluations dans d'autres fluides (LBA, liquide pleural ou liquide céphalorachidien) sont limitées, mais avec des résultats prometteurs [123,125,126]. Les performances des IGRA varient entre les pays à haute et faible prévalence de TB, avec une valeur ajoutée plus importante dans les pays à faible prévalence [127].

- Les tests immunologiques n'ont pas de place pour le diagnostic de la TB active dans les pays du Sud.

## Autres diagnostics

De récentes méta-analyses ont montré l'absence d'utilité diagnostique des tests sérologiques commercialisés en raison de performances sous-optimales et très variables selon les tests [128,129].

Le dosage de l'adénosine désaminase (ADA) dans le liquide pleural est une méthode simple et peu chère pour le diagnostic de TB pleurale, avec une sensibilité et une spécificité globales de 92% et 90%, d'après les résultats d'une méta-analyse récente portant sur 63 études [130,131]. Un taux supérieur à 70 U/L associé à un rapport lymphocytes/neutrophiles supérieur à 0,75 serait suffisant pour confirmer le diagnostic de TB pleurale [132]. Le dosage d'ADA dans le liquide céphalorachidien ne permet pas de différencier une méningite bactérienne d'une méningite tuberculeuse [133].

Une méta-analyse portant sur l'utilisation d'antigènes non commerciaux purifiés montrait une utilité diagnostique très modeste du diagnostic anté-génique, avec néanmoins de meilleures sensibilités quand les antigènes étaient combinés [134]. Parmi les tests antigéniques, le lipoarabinomannan (LAM) a été le plus évalué et est déjà commercialisé sous la forme d'une bandelette urinaire (Determine TB, Inverness Medical Innovations) [135]. Dans les contextes à haute prévalence de TB, la sensibilité du LAM variait entre 17 et 40% selon les études [136,137]. Néanmoins, plusieurs études ont retrouvé une meilleure sensibilité du test chez les patients VIH-positifs avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup> tout en conservant une très bonne spécificité, probablement en raison de l'atteinte glomérulaire facilitant le passage transrénal de l'antigène [138,139]. Certains auteurs proposent d'inclure le test urinaire LAM dans l'algorithme diagnostique des patients VIH positifs avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup> suspects de TB frottis-négatifs [135]. Des premiers résultats sont encourageants pour une éventuelle utilisation du test LAM dans le liquide céphalorachidien pour le diagnostic de méningite

**Tableau 1** Résumé des nouveaux outils ou approches diagnostiques de la tuberculose recommandés pour les laboratoires périphériques et de référence des pays du Sud.

Outil ou approche diagnostique	Résultats principaux
<i>Au niveau de laboratoires périphériques</i>	
Examen microscopique [55,83] Examen de 2 crachats au lieu de 3 : collectés sur 2 jours consécutifs ou le même jour à 1 h d'intervalle Révision de la définition d'un cas frottis-positif : au moins 1 crachat > = 1 BAAR/100 champs microscopiques Utilisation de la microscopie à fluorescence avec lampes LED	Réduction du délai de résultat et réduction de charge de travail et de coût Gain de sensibilité  10% plus sensible et lecture 4 fois plus rapide que la méthode de Ziehl-Nielsen Aussi sensible de la méthode de fluorescence conventionnelle, mais moins cher et plus adapté aux conditions des laboratoires périphériques Procédure d'assurance qualité peu standardisée
PCR automatisée en circuit fermé : XpertMTB/RMP ( <a href="http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/tb_test_20101208/en/index.html">http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/tb_test_20101208/en/index.html</a> )	70% de sensibilité pour la détection de <i>MTB</i> chez les cas frottis-négatifs. Très bonne sensibilité et spécificité pour la détection de la résistance à la rifampicine, mais faible valeur prédictive positive dans les contextes à prévalence faible ou modérée (< 8%) de résistance Rapide (2h), peu de risque de contamination croisée, robuste et facile d'utilisation Cher, besoin d'électricité, nécessite une maintenance annuelle dans un centre de référence
ADA dans le liquide pleural [100]	Très sensible pour le diagnostic de pleurésie, péricardite et ascite tuberculeuses
<i>Au niveau de laboratoires de référence</i>	
Culture de <i>MTB</i> Culture sur milieu liquide MGIT [83]	10% plus sensible et temps de détection plus rapide que la méthode sur milieu solide, mais augmentation du risque de contaminations
Identification avec MPT64 (Capillia test) et aspect cordoïde en microscopie [83]	Rapide et simple d'utilisation. Risque de faux positifs en cas de cultures faiblement positives
Méthodes de culture non commerciales : <i>thin layer agar</i> ou MODS pour culture et antibiogrammes [55] Méthodes colorimétriques pour antibiogramme [55]	Moins chères que les méthodes commerciales, très sensibles et spécifiques pour la détection de la résistance à la rifampicine et isoniazide. Certaines restent peu standardisées
Diagnostic moléculaire de la résistance à rifampicine Line probe assay pour détection de la résistance à la rifampicine et isoniazide [115]	Très sensibles et spécifiques sur les spécimens frottis positifs et très rapides (2h). Faible sensibilité sur les spécimens frottis-négatifs Nécessite un niveau d'expertise élevé, risque de contamination croisée
BAAR : bacilles alcoolrésistants ; <i>MTB</i> : <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ; MODS : <i>microscopic observation drug susceptibility assay</i> ; LED : <i>light-emitting diodes</i> .	

tuberculeuse [140]. Des méthodes de détection antigénique ou chimique dans l'air expiré (nez électroniques ou breathalyzer) sont à des stades précoces d'évaluation [141,142].

- Le dosage de l'adénosine désaminase dans le liquide pleural est une méthode simple, peu chère et très sensible pour le diagnostic de TB pleurale.

- Pas de test antigénique de la TB maladie si ce n'est le rôle potentiel de la détection du lipoarabinomannan dans les urines des patients infectés par le VIH avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup>.
- Aucun rôle pour les tests sérologiques dans le diagnostic de la TB maladie.

## En pratique

À ce jour, aucun test n'est suffisamment sensible, rapide et simple d'utilisation pour permettre un diagnostic de la TB maladie au niveau d'un centre de santé primaire [143,144]. Le test Xpert MTB/RIF s'en rapproche avec une utilisation potentielle au niveau de centres de santé de district et sous-district. Les conditions d'utilisation de ce test, sa place dans l'algorithme diagnostique des patients suspects de TB et les possibilités de réduction de coût sont autant de questions à résoudre avant de l'utiliser en routine dans les pays du Sud. L'amélioration de l'examen microscopique avec l'utilisation des dernières définitions de cas de l'OMS et de la microscopie à fluorescence avec lampes LED sont en cours d'implémentation dans beaucoup de pays du Sud [27,55,83] (Tableau 1).

La culture de MTB reste indispensable, notamment pour la réalisation d'antibiogramme en cas d'échec ou plus systématiquement dans les régions à forte prévalence de résistance aux antituberculeux. La culture sur milieu liquide a une bonne sensibilité, mais nécessite des laboratoires sophistiqués et très peu de patients y ont accès. Le développement de méthodes simplifiées devrait faciliter la décentralisation de la culture, mais quelle que soit la méthode, l'introduction de la culture dans les laboratoires existants nécessite un effort financier, technique et logistique important [96].

À ce jour, les tests immunologiques, sérologiques ou antigéniques n'ont pas de place pour le diagnostic de la TB maladie dans les pays du Sud. La détection du LAM dans les urines des patients VIH positifs frottis négatifs avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup> nécessite plus d'évaluation en condition programmatique.

Une des limites principales des tests diagnostiques actuels est leur dépendance du crachat limitant le rendement diagnostique chez les patients immunodéprimés et chez les jeunes enfants [145]. Les différentes pistes de recherche sont l'amélioration des tests sérologiques, l'évaluation de combinaisons antigéniques, la détection de volatiles organiques dans l'air expiré, les techniques moléculaires simplifiées et le développement de nouvelles plateformes diagnostiques, métaboliques ou protéomiques [100,146]. Des études prospectives et multicentriques d'évaluation du LAM urinaire, des nouvelles méthodes de culture, ou du Xpert MTB/RIF dans d'autres spécimens que les crachats, sont aussi absolument nécessaires chez l'enfant [71]. En ce qui concerne les formes extrapulmonaires, des tests existants comme le dosage de l'ADA dans le liquide pleural et la cytologie de l'aspiration ganglionnaire après ponction à l'aiguille fine restent sous-utilisées dans les pays du Sud [147].

Pour les pays à ressources limitées, le coût de l'introduction de nouveaux outils diagnostiques, leur mise en place, et leur pérennité sont des éléments très importants à considérer [100,148]. Certains auteurs, en se basant sur des modèles de décision analytiques, suggèrent que pour être coût-efficace en termes de santé publique, un nouveau test doit principalement être très spécifique, abordable en termes de prix et suffisamment sensible chez les cas habituellement non diagnostiqués par les outils standards [149]. D'après ces modèles mathématiques, un test rapide

et largement accessible ayant une sensibilité supérieure à 85 % et une spécificité de 97 % pourrait sauver environ 400 000 vies par an [150]. Outre l'aspect économique, le manque d'information sur les obstacles, les avantages et la complémentarité des nouveaux outils diagnostiques récemment recommandés par l'OMS explique aussi le décalage que l'on observe entre les recommandations et leur mise en place sur le terrain [27]. On ne peut dissocier le diagnostic de la mise en traitement. Un nouveau test diagnostique de la TB, en général et de ses formes résistantes aux antituberculeux en particulier, n'aura un impact que s'il conduit à la mise sous traitement du patient sans délai, ce qui dans bon nombres de pays nécessitent une amélioration des systèmes de soins [143].

### POINTS ESSENTIELS

- L'examen microscopique des crachats reste l'examen principal de diagnostic de la TB dans les pays du Sud, mais en raison de sa faible sensibilité, près de la moitié des patients avec TB pulmonaire sont diagnostiqués à l'aide d'algorithme clinique et radiologique sans confirmation bactériologique.
- Dans les pays du Sud, la culture de MTB et le diagnostic rapide PCR de la résistance à la rifampicine ne sont disponibles que dans les laboratoires de référence et la plupart des patients n'y ont pas accès.
- Le développement de PCR en temps réel automatisée devrait permettre de décentraliser la PCR pour le diagnostic rapide de la TB, notamment dans les contextes à haute prévalence d'infection VIH et de la TB multirésistante dans les zones à haute prévalence de résistance aux antituberculeux.
- Les tests immunologiques, sérologiques ou antigéniques n'ont pas de place à ce jour pour le diagnostic de la TB maladie dans les pays du Sud, si ce n'est la détection rapide de lipoarabinomannan dans les urines des patients infectés par le VIH avec moins de 100 CD4/mm<sup>3</sup>.
- Les perspectives de la recherche dans le domaine du diagnostic de la TB sont le développement de test rapides indépendants du crachat, d'utilisation facile par du personnel peu qualifié et avec une très bonne sensibilité, notamment chez les patients immunodéprimés et chez les enfants.

### Déclaration d'intérêts

L'auteur déclare ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

### Remerciements

Je remercie le Dr Francis Varaine pour sa relecture attentive du manuscrit.

## Références

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report, WHO, Geneva; 2009. p. 2010.
- [2] International union against tuberculosis and lung disease. Sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. Fifth edition ed. 2000.
- [3] Perkins MD, Roscigno G, Zumla A. Progress towards improved tuberculosis diagnostics for developing countries. *Lancet* 2006;367:942–3.
- [4] Kubica GP. Correlation of acid-fast staining methods with culture results for mycobacteria. *Bull Int Union Tuberc* 1980;55:117–24.
- [5] Davies PD, Pai M. The diagnosis and misdiagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:1226–34.
- [6] Gilpin C, Kim SJ, Lumb R, et al. Van Deun. Critical appraisal of current recommendations and practices for tuberculosis sputum smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:946–52.
- [7] Samb B, Sow PS, Kony S, et al. Risk factors for negative sputum acid-fast bacilli smears in pulmonary tuberculosis: results from Dakar, Senegal, a city with low HIV seroprevalence. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999;3:330–6.
- [8] Hesselting AC, Schaaf HS, Gie RP, et al. A critical review of diagnostic approaches used in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:1038–45.
- [9] World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Part II Microscopy. WHO, Geneva; 1998.
- [10] Squire SB, Belaye AK, Kashoti A, 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.
- [11] Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009;56:103–11.
- [12] World Health Organization. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. WHO, Geneva; 2003.
- [13] World Health Organization. Improving the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary and extrapulmonary tuberculosis among adults and adolescents: recommendations for HIV-prevalent and resourceconstrained settings. WHO, Geneva; 2006.
- [14] van Cleeff MR, Kivihya-Ndugga LE, Meme H, et al. The role and performance of chest X-ray for the diagnosis of tuberculosis: a cost-effectiveness analysis in Nairobi, Kenya. *BMC Infect Dis* 2005;5:111.
- [15] Siddiqi K, Lambert ML, Walley J. Clinical diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in low-income countries: the current evidence. *Lancet Infect Dis* 2003;3:288–96.
- [16] Getahun H, Harrington M, O'Brien R, et al. Diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in people with HIV infection or AIDS in resource-constrained settings: informing urgent policy changes. *Lancet* 2007;16:2042–9.
- [17] Colebunders R, Bastian J. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:97–107.
- [18] Mtei L, Matee M, Herfort O, et al. High rates of clinical and subclinical tuberculosis among HIV-infected ambulatory subjects in Tanzania. *Clin Infect Dis* 2005;40:1500–7.
- [19] Palmieri F, Girardi E, Pellicelli AM, et al. Pulmonary tuberculosis in HIV-infected patients presenting with normal chest radiograph and negative sputum smear. *Infection* 2002;30:68–74.
- [20] Wood R, Middelkoop K, Myer L, et al. Undiagnosed tuberculosis in a community with high HIV prevalence: implications for tuberculosis control. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175:87–93.
- [21] Corbett EL, Bandason T, Cheung YB, et al. Epidemiology of tuberculosis in a high HIV prevalence population provided with enhanced diagnosis of symptomatic disease. *PLoS Med* 2007;4:e22.
- [22] Navarro V, Guix J, Juan G, et al. Pulmonary tuberculosis with normal chest radiography and infection by human immunodeficiency virus. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1991;9:26–9.
- [23] Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:5182–8.
- [24] Pai M, Minion J, Steingart KR, et al. New and improved tuberculosis diagnostics: evidence, policy, practice, and impact. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:271–84.
- [25] Lemaire JF, Casenghi M. New diagnostics for tuberculosis: fulfilling patient needs first. *J Int AIDS Soc* 2010;13:40.
- [26] Nyendak MR, Lewinsohn DA, Lewinsohn DM. New diagnostic methods for tuberculosis. *Curr Opin Infect Dis* 2009;22:174–82.
- [27] van Kampen SC, Ramsay AR, Anthony RM, et al. Retooling national TB control programmes (NTPs) with new diagnostics: the NTP perspective. *PLoS ONE* 2010;5:e11649.
- [28] Raviglione MC, Pio A. Evolution of WHO policies for tuberculosis control, 1948–2001. *Lancet* 2002;359:775–80.
- [29] Santha T, Garg R, Subramani R, et al. Comparison of cough of 2 and 3 weeks to improve detection of smear-positive tuberculosis cases among out-patients in India. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:61–8.
- [30] Cambanis A, Ramsay A, Yassin MA, et al. Duration and associated factors of patient delay during tuberculosis screening in rural Cameroon. *Trop Med Int Health* 2007;12:1309–14.
- [31] Cambanis A, Yassin MA, Ramsay A, et al. Rural poverty and delayed presentation to tuberculosis services in Ethiopia. *Trop Med Int Health* 2005;10:330–5.
- [32] World Health Organization. Interim policy on collaborative TB/HIV activities. WHO, Geneva; 2004.
- [33] Corbett EL, Zezai A, Cheung YB, et al. Provider-initiated symptomatic screening for tuberculosis in Zimbabwe: diagnostic value and the effect of HIV status. *Bull World Health Organ* 2010;88:13–21.
- [34] Day JH, Charalambous S, Fielding KL, et al. Screening for tuberculosis prior to isoniazid preventive therapy among HIV-infected gold miners in South Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10:523–9.
- [35] Kranzer K, Houben RMGJ, Glynn JR, et al. Yield of HIV-associated tuberculosis during intensified case finding in resource-limited settings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010;10:93–102.
- [36] Getahun H, Kittikraisak W, Heilig CM, et al. development of a standardized screening rule for tuberculosis in people living with hiv in resource- constrained settings: individual participant data metaanalysis of observational studies. *PLoS Med* 2001;8:e1000391.
- [37] Corbett EL, Bandason T, Duong T, et al. Comparison of two active case-finding strategies for community-based diagnosis of symptomatic smear-positive tuberculosis and control of infectious tuberculosis in Harare, Zimbabwe (DETECTB): a cluster-randomised trial. *Lancet* 2010;376:1244–53.
- [38] Shah S, Demissie M, Lambert L, et al. Intensified tuberculosis case finding among HIV-infected persons from a voluntary counseling and testing center in Addis Ababa, Ethiopia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009;50:537–45.
- [39] Mohammed A, Ehrlich R, Wood R, et al. Screening for tuberculosis in adults with advanced HIV infection prior to preventive therapy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:792–5.
- [40] Hudson CP, Wood R, Maartens G. Diagnosing HIV-associated tuberculosis: reducing costs and diagnostic delay. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:240–5.
- [41] Cain KP, McCarthy KD, Heilig CM, et al. An algorithm for tuberculosis screening and diagnosis in people with HIV. *N Engl J Med* 2010;362:707–16.

- [42] Basset IV, Wang B, Chetty S, et al. Intensive tuberculosis screening for HIV-infected patients starting antiretroviral therapy in Durban, South Africa. *Clin Infect Dis* 2010;51:823–9.
- [43] Bakari M, Arbeit RD, Mtei L, et al. Basis for treatment of tuberculosis among HIV-infected patients in Tanzania: the role of chest x-ray and sputum culture. *BMC Infect Dis* 2008;8:32.
- [44] Agizew TB, Arwady MA, Yoon JC, et al. Tuberculosis in asymptomatic HIV-infected adults with abnormal chest radiographs screened for tuberculosis prevention. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:45–51.
- [45] Dawson R, Masuka P, Edwards DJ, et al. Chest radiograph reading and recording system: evaluation for tuberculosis screening in patients with advanced HIV. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:52–8.
- [46] Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6:664–74.
- [47] Lawson L, Yassin MA, Ramsay A, et al. Comparison of scanty AFB smears against culture in an area with high HIV prevalence. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:933–5.
- [48] Aber VR, Allen BW, Mitchison DA, et al. Quality control in tuberculosis bacteriology. 1. Laboratory studies on isolated positive cultures and the efficiency of direct smear examination. *Tubercle* 1980;61:123–33.
- [49] Kivihya-Ndugga LE, van Cleeff MR, Ng'ang'a LW, et al. Sex-specific performance of routine TB diagnostic tests. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005;9:294–300.
- [50] Ramsay A, Bonnet M, Gagnidze L, et al. Sputum, sex and scanty smears: new case definition may reduce sex disparities in smear-positive tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:613–9.
- [51] Van Deun A, Salim AH, Cooreman E, et al. Scanty AFB smears: what's in a name? *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:816–23.
- [52] Van Deun, Salim AH, Cooreman E, et al. Optimal tuberculosis case detection by direct sputum smear microscopy: how much better is more? *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:222–30.
- [53] Mase SR, Ramsay A, Ng V, 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.
- [54] Bonnet M, Ramsay A, Gagnidze L, et al. Reducing the number of sputum samples examined and thresholds for positivity: an opportunity to optimise smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:953–8.
- [55] World Health Organization. Report on conclusions and recommendations. strategic and technical advisory group for tuberculosis. WHO, Geneva; 2007.
- [56] Cambanis A, Ramsay A, Wirkom V, et al. Investing time in microscopy: an opportunity to optimise smear-based case detection of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:40–5.
- [57] Harries AD, Mphasa NB, Mundy C, et al. Screening tuberculosis suspects using two sputum smears. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:36–40.
- [58] Monkongdee P, McCarthy KD, Cain KP, et al. Yield of acid-fast smear and mycobacterial culture for tuberculosis diagnosis in people with human immunodeficiency virus. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:903–8.
- [59] Soemantri S, Senewe FP, Tjandrarini DH, et al. Three-fold reduction in the prevalence of tuberculosis over 25 years in Indonesia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:398–404.
- [60] Ramsay A, Yassin MA, Cambanis A, et al. Front-loading sputum microscopy services: an opportunity to optimise smear-based case detection of tuberculosis in high prevalence countries. *J Trop Med* 2009;398767.
- [61] World Health Organization. Report of the Ninth Meeting WHO strategic and technical advisory group for tuberculosis (STAG-TB). WHO, Geneva 2009.
- [62] Cattamanchi A, Huang AH, Worodria W, et al. Integrated strategies to optimize sputum smear microscopy: a prospective observational study. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:547–51.
- [63] Steingart KR, Henry M, Ng V, et al. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006;6:570–81.
- [64] Van Deun, Chonde TM, Gumusboga M, et al. Performance and acceptability of the FluorLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:1009–14.
- [65] Trusov A, Bumgarner R, Valijev R, et al. Comparison of Lumin LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:836–41.
- [66] Torrea G, Chakaya J, Mayabi M, et al. Evaluation of the Fluorescence and fluorescence microscopy blinded rechecking trial, Nairobi, Kenya. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:658–63.
- [67] Minion J, Sohn H, Pai M. Light-emitting diode technologies for TB diagnosis: what is on the market? *Expert Rev Med Devices* 2009;6:341–5.
- [68] Marais BJ, Brittle W, Painsczyk K, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008;47:203–7.
- [69] Stop TB Partnership and World Health Organization. New laboratory diagnostic tools for tuberculosis control. Retooling task force. 2008.
- [70] Khan MS, Dar O, Sismanidis C, et al. Improvement of tuberculosis case detection and reduction of discrepancies between men and women by simple sputum-submission instructions: a pragmatic randomised controlled trial. *Lancet* 2007;369:1955–60.
- [71] Khan MS, Dar O, Tahseen S, et al. Judging respiratory specimen acceptability for AFB microscopy: visual versus microscopic screening. *Trop Med Int Health* 2009;14:571–5.
- [72] Zar HJ, Hanslo D, Apolles P, et al. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet* 2005;365:130–4.
- [73] Marais BJ, Pai M. Recent advances in the diagnosis of childhood tuberculosis. *Arch Dis Child* 2007;92:446–52.
- [74] Brown M, Varia H, Bassett P, et al. Prospective study of sputum induction, gastric washing, and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in patients who are unable to expectorate. *Clin Infect Dis* 2007;44:1415–20.
- [75] Chow F, Espiritu N, Gilman RH, et al. La cuerda dulce—a tolerability and acceptability study of a novel approach to specimen collection for diagnosis of paediatric pulmonary tuberculosis. *BMC Infect Dis* 2006;6:67.
- [76] Fujita A, Murata K, Takamori M. Novel method for sputum induction using the Lung Flute in patients with suspected pulmonary tuberculosis. *Respirology* 2009;14:899–902.
- [77] Vargas D, Garcia L, Gilman RH, et al. A. Diagnosis of sputum-scarce HIV-associated pulmonary tuberculosis in Lima, Peru. *Lancet* 2005;365:150–2.
- [78] Nicol MP, Zar HJ. New specimens and laboratory diagnostics for childhood pulmonary TB: progress and prospects. *Paediatr Respir Rev* 2010, doi:10.1016/j.prrv.2010.09.008.
- [79] Angeby KA, Hoffner SE, Diwan VK. Should the bleach microscopy method be recommended for improved case detection of tuberculosis? Literature review and key person analysis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004;8:806–15.
- [80] Bonnet M, Ramsay A, Githui W, et al. Bleach sedimentation: an opportunity to optimize smear microscopy for tuberculosis diagnosis in settings of high prevalence of HIV. *Clin Infect Dis* 2008;46:1710–6.
- [81] Cattamanchi A, Davis JL, Pai M, et al. Does bleach processing increase the accuracy of sputum smear microscopy for diagnosing pulmonary tuberculosis? *J Clin Microbiol* 2010;48:2433–9.

- [82] Merid Y, Yassin MA, Yamuah L, et al. Validation of bleach-treated smears for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:136–41.
- [83] World Health Organization. Report on conclusions and recommendations. Strategic and Technical Advisory Group For Tuberculosis. WHO, Geneva 2009.
- [84] Smithwick RW, Stratigos CB. Acid-fast microscopy on polycarbonate membrane filter sputum sediments. *J Clin Microbiol* 1981;13:1109–13.
- [85] den Hertog AL, Klatser PR, Anthony RM. Buoyant density of *Mycobacterium tuberculosis*: implications for sputum processing. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:466–71.
- [86] Rouillon A, Perdriet S, Parrot R. Transmission of tubercle bacilli: The effects of chemotherapy. *Tubercle* 1976;57:275–99.
- [87] World Health Organization. Laboratory services in tuberculosis control. Culture. Part III. WHO, Geneva 2009.
- [88] Berner P, Palicova F, Rusch-Gerdes S, et al. Multicenter evaluation of fully automated BACTEC mycobacteria growth indicator tube 960 system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2002;40:150–4.
- [89] Cruciani M, Scarparo C, Malena M, et al. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2004;42:2321–5.
- [90] Muyoyeta M, Schaap JA, De HP, et al. Comparison of four culture systems for *Mycobacterium tuberculosis* in the Zambian National Reference Laboratory. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:460–5.
- [91] Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, Ko WC, Jin YT, Wu JJ. Comparison of the MB/Bact and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:25–30.
- [92] Muyoyeta M, de Haas PE, Mueller DH, et al. Evaluation of the Capilia TB assay for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* in Zambia and South Africa. *J Clin Microbiol* 2010;48:3773–5.
- [93] Shen GH, Chen CH, Hung CH, et al. Combining the Capilia TB assay with smear morphology for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:371–6.
- [94] Anthony RM, Cobelens FG, Gebhard A, et al. Liquid culture for *Mycobacterium tuberculosis*: proceed, but with caution. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1051–3.
- [95] van Kampen SC, Anthony RM, Klatser PR. The realistic performance achievable with mycobacterial automated culture systems in high and low prevalence settings. *BMC Infect Dis* 2010;10:93.
- [96] Paramasivan CN, Lee E, Kao K, et al. Experience establishing tuberculosis laboratory capacity in a developing country setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:59–64.
- [97] Urbanczik R, Rieder HL. Scaling up tuberculosis culture services: a precautionary note. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:799–800.
- [98] Hanscheid T, Grobusch MP. Biosafety and tuberculosis laboratories in Africa. *Lancet Infect Dis* 2010;10:582–3.
- [99] Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: feasibility and applicability in the field. *Eur Respir J* 2005;26:339–50.
- [100] Pai M, Minion J, Sohn H, et al. Novel and improved technologies for tuberculosis diagnosis: progress and challenges. *Clin Chest Med* 2009;30:701–16.
- [101] Martin A, Munga WP, Babu OF, et al. Implementation of the thin layer agar for the diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis in a high HIV prevalence setting in Homa Bay, Kenya. *J Clin Microbiol* 2009;47:2632–4.
- [102] Minion J, Leung E, Menzies D, et al. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:688–98.
- [103] Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006;355:1539–50.
- [104] Robledo JA, Mejia GI, Morcillo N, 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.
- [105] 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.
- [106] World Health, Organisation. Non-commercial culture and drug-susceptibility testing methods for screening of patients at risk of multi-drug resistant tuberculosis: policy statement (July 2010), WHO, Geneva; 2010.
- [107] Ramos E, Schumacher SG, Siedner M, et al. Optimizing tuberculosis testing for basic laboratories. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:896–901.
- [108] Greco S, Girardi E, Navarra A, et al. Current evidence on diagnostic accuracy of commercially based nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Thorax* 2006;61:783–90.
- [109] Ling DI, Flores LL, Riley LW, et al. Commercial nucleic-acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS ONE* 2008;3:e1536.
- [110] Flores LL, Pai M, Colford Jr JM, et al. In-house nucleic acid amplification tests for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens: meta-analysis and meta-regression. *BMC Microbiol* 2005;5:55.
- [111] Pai M, Flores LL, Pai N, et al. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2003;3:633–43.
- [112] Pai M, Flores LL, Hubbard A, et al. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2004;4:6.
- [113] Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N Engl J Med* 2010;363:1005–15.
- [114] Banada PP, Sivasubramani SK, Blakemore R, et al. Containment of bioaerosol infection risk by the Xpert MTB/RIF assay and its applicability to point-of-care settings. *J Clin Microbiol* 2010;48:3551–7.
- [115] Van RA, Page-Shipp L, Scott L, et al. Xpert((R)) MTB/RIF for point-of-care diagnosis of TB in high-HIV burden, resource-limited countries: hype or hope? *Expert Rev Mol Diagn* 2010;10:937–46.
- [116] Oberhelman RA, Soto-Castellares G, Gilman RH, et al. Diagnostic approaches for paediatric tuberculosis by use of different specimen types, culture methods, and PCR: a prospective case-control study. *Lancet Infect Dis* 2010;10.
- [117] Green C, Huggett JF, Talbot E, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis through the detection of mycobacterial DNA in urine by nucleic acid amplification methods. *Lancet Infect Dis* 2009;9:505–11.
- [118] Cordova J, Shiloh R, Gilman RH, et al. Evaluation of molecular tools for detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in stool specimens from patients with pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2010;48:1820–6.
- [119] Perkins MD, Cunningham J. Facing the crisis: improving the diagnosis of tuberculosis in the HIV era. *J Infect Dis* 2007;196:S15–27.
- [120] Traore H, Fissette K, Bastian I, et al. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from diverse countries by a commercial line probe assay as an ini-

- tial indicator of multidrug resistance. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:481-4.
- [121] World Health Organisation. Policy statement. Molecular line probe assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB). WHO, Geneva 2009.
- [122] Kruk A, Gie RP, Schaaf HS, et al. Symptom-based screening of child tuberculosis contacts: improved feasibility in resource-limited settings. *Pediatrics* 2008;122:e1646-52.
- [123] Sester M, Sotgiu G, Lange C, et al. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of active tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J* 2011;37:100-11.
- [124] Goletti D, Carrara S, Butera O, et al. Accuracy of immunodiagnostic tests for active tuberculosis using single and combined results: a multicenter TBNET-Study. *PLoS ONE* 2008;3:e3417.
- [125] Jafari C, Thijsen S, Sotgiu G, et al. Lange C. Bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot for a rapid diagnosis of tuberculosis: a Tuberculosis Network European Trialsgroup study. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:666-73.
- [126] Strassburg A, Jafari C, Ernst M, et al. Rapid diagnosis of pulmonary TB by BAL enzyme-linked immunospot assay in an immunocompromised host. *Eur Respir J* 2008;31:1132-5.
- [127] Dheda K, Smit RZ, Badri M, et al. T-cell interferon-gamma release assays for the rapid immunodiagnosis of tuberculosis: clinical utility in high-burden vs. low-burden settings. *Curr Opin Pulm Med* 2009;15:188-200.
- [128] Steingart KR, Henry M, Laal S, et al. Commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *PLoS Med* 2007;4:e202.
- [129] Steingart KR, Henry M, Laal S, et al. A systematic review of commercial serological antibody detection tests for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Thorax* 2007;62:911-8.
- [130] Porcel JM, Esquerda A, Bielsa S. Diagnostic performance of adenosine deaminase activity in pleural fluid: a single-center experience with over 2100 consecutive patients. *Eur J Intern Med* 2010;21:419-23.
- [131] Liang QL, Shi HZ, Wang K, et al. Diagnostic accuracy of adenosine deaminase in tuberculous pleurisy: a meta-analysis. *Respir Med* 2008;102:744-54.
- [132] Light RW. Update on tuberculous pleural effusion. *Respirology* 2010;15:451-8.
- [133] Tuon FF, Higashino HR, Lopes MI, et al. Adenosine deaminase and tuberculous meningitis-a systematic review with meta-analysis. *Scand J Infect Dis* 2010;42:198-207.
- [134] Steingart KR, Dendukuri N, Henry M, et al. Performance of purified antigens for serodiagnosis of pulmonary tuberculosis: a meta-analysis. *Clin Vaccine Immunol* 2009;16:260-76.
- [135] Peter J, Green C, Hoelscher M, et al. Urine for the diagnosis of tuberculosis: current approaches, clinical applicability, and new developments. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:262-70.
- [136] Daley P, Michael JS, Hmar P, et al. Blinded evaluation of commercial urinary lipoarabinomannan for active tuberculosis: a pilot study. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:989-95.
- [137] Mutetwa R, Boehme C, Dimairo M, et al. Diagnostic accuracy of commercial urinary lipoarabinomannan detection in African tuberculosis suspects and patients. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1253-9.
- [138] Dheda K, Davids V, Lenders L, et al. Clinical utility of a commercial LAM-Elisa assay for TB diagnosis in HIV-infected patients using urine and sputum samples. *PLoS ONE* 2010;5:e9848.
- [139] Lawn SD, Edwards DJ, Kranzer K, et al. Urine lipoarabinomannan assay for tuberculosis screening before antiretroviral therapy diagnostic yield and association with immune reconstitution disease. *AIDS* 2009;23:1875-80.
- [140] Patel VB, Bhigjee AI, Paruk HF, et al. Utility of a novel lipoarabinomannan assay for the diagnosis of tuberculous meningitis in a resource-poor high-HIV prevalence setting. *Cerebrospinal Fluid Res* 2009;6:13.
- [141] McNerney R, Wondafrash BA, Amena K, et al. Field test of a novel detection device for *Mycobacterium tuberculosis* antigen in cough. *BMC Infect Dis* 2010;10:161.
- [142] Kolk A, Hoelscher M, Maboko L, et al. Electronic-nose technology in diagnosis of TB patients using sputum samples. *J Clin Microbiol* 2010;48:4235-8.
- [143] Small PM, Pai M. Tuberculosis diagnosis - time for a game change. *N Engl J Med* 2010;363:1070-1.
- [144] Wallis RS, Pai M, Menzies D, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice. *Lancet* 2010;375:1920-37.
- [145] Dorman SE. New diagnostic tests for tuberculosis: bench, bedside and beyond. *Clin Infect Dis* 2010;3:S173-7.
- [146] Lange C, Mori T. Advances in the diagnosis of tuberculosis. *Respirology* 2010;15:220-40.
- [147] Wright CA, Warren RM, Marais BJ. Fine needle aspiration biopsy: an undervalued diagnostic modality in paediatric mycobacterial disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1467-75.
- [148] Sohn H, Minion J, Albert H, et al. TB diagnostic tests: how do we figure out their costs? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7:723-33.
- [149] Dowdy DW, O'Brien MA, Bishai D. Cost-effectiveness of novel diagnostic tools for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12:1021-9.
- [150] Keeler E, Perkins MD, Small P, et al. Reducing the global burden of tuberculosis: the contribution of improved diagnostics. *Nature* 2006;1:49-57.