

Identification des souches de mycobactéries isolées au Laboratoire National de Référence (LNR) de la Tuberculose du Mali : valeur diagnostique du test antigénique de diagnostic rapide SD Bioline MPT64**Identification of Isolate Mycobacteria Strains in tuberculosis National Reference Laboratory of Mali: diagnostic value of SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid**

A. Cissé^{*1}, F Camara¹, B Diarra², S.Y. Koné³, K. Ouattara⁴, A. Keita¹, A. Naco⁵, M. Berthé⁵, F. Coulibaly¹, A Traoré¹, M. Diallo², Lah K⁶, S. Diarra¹, F. Bougoudogo¹, A.K Traoré^{5,7}

1-Laboratoire National de Référence de la Tuberculose, Service de Bactériologie, Institut National de Recherche en Santé Publique, Bamako, Mali ; 2- Centre de Recherche et de Formation sur la tuberculose et le VIH/SEREFO, Mali, 3- Laboratoire Centrale Vétérinaire, Bamako, Mali, 4-Service de Pneumologie CHU du Point G, Mali, 5-Programme National de Lutte contre la Tuberculose Direction Nationale de la Santé, Mali, 6- Représentation marque SD Bioline Bamako, Mali, 7- Service de Médecine Interne CHU du Point G.

*Corresponding author: Dr Aissata Boubakar Cissé Traoré, Laboratoire National de Référence de la tuberculose, Service de Bactériologie, Institut National de Recherche en Santé Publique Tel: (00223) 66 79 57 83/75 50 70 91 BP: 1791 (INRSP)E-mail: aissatacisse@yahoo.fr

Résumé

Introduction : Le diagnostic bactériologique différentiel entre Mycobactéries du complexe *tuberculosis* et Mycobactéries non *tuberculosis* essentiel pour un suivi thérapeutique approprié, n'est pas toujours fait dans les pays en voie de développement. La mise en évidence rapide de l'Ag MPT64, protéine spécifique au complexe *tuberculosis* peut être utilisée pour cette différenciation.

Objectifs : Evaluer le test rapide immunochromatographique SD Bioline MPT64 dans notre contexte.

Méthodologie : Nous avons identifié par le test SD Bioline MPT64 les Mycobactéries isolées de patients référés pour antibiogramme et sur des Mycobactéries d'origine bovine. Les résultats d'identification par le test rapide, ont été confirmés par l'identification morphologique, par le Genprobe et le spoligotyping et par les tests biochimiques, catalase thermolabile et nitrate réductase.

Résultats : Une souche a été identifiée comme non *tuberculosis* par le test rapide alors qu'elle avait toutes les caractéristiques morphologique et biochimique en faveur du complexe *tuberculosis*. Nous avons évalué respectivement la spécificité et la sensibilité de ce test à 100% et à 99%.

Conclusion : Ce test plus simple que les méthodes biochimiques, moins coûteux que les tests moléculaires peut constituer un moyen diagnostique rapide et efficace dans les zones d'endémie tuberculeuse où les moyens diagnostiques sont limités. Les résultats négatifs doivent être cependant confirmés par une autre forme d'identification, notamment l'identification morphologique beaucoup plus abordable.

Mots clés : Identification, Mycobactéries, SD Bioline MPT64, Mali

Abstract

Introduction: The distinction between *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and Non tuberculous Mycobacteria (NTM) infection is essential for an appropriate treatment. Unfortunately this distinction is not done at regular basis in resource limited settings, as the decision to start is based on smear microscopy which cannot distinguish between bacterial species. SD Bioline rapid test for the detection of Ag MPT64 which is specific to *Mycobacterium* can be an interesting alternative for differential diagnosis.

Objective: To identify MTBC strains isolated at the National Reference Laboratory (NRL) of tuberculosis, Bamako using Ag MPT64 immunochromatographic SD Bioline rapid test relative to traditional biochemical and molecular tests.

Methods: We detected MPT64 proteins from both human and animal mycobacterial strains. Human strains were isolated from patients who were referred to NRL for culture and drug susceptibility testing (DST). SD Bioline rapid test results were confirmed using traditional biochemical tests, morphological and molecular techniques.

Results: We found that SD Bioline rapid test has a specificity and sensitivity of respectively 100% and 99%. There was only one false negative (FN) case which was identified by traditional biochemical and morphological techniques.

Conclusion: This is a simple technique, and may provide a fast, cheap and easy-to-perform alternative method to distinguish between mycobacterial strains in resource limited settings. However, negative results should be confirmed by another identification method such as morphological identification.

Keywords: Identification, Mali, Mycobacteria MPT64 SD Bioline

Introduction

Dans les pays en développement, particulièrement dans les programmes où la Stratégie Thérapeutique sous Observance Directe ou DOTS (Directly Observed therapeutic strategy) est appliquée, le diagnostic de la tuberculose pulmonaire repose essentiellement sur les signes cliniques et la microscopie directe à partir du crachat (1, 2, 3). Au Mali, la culture n'est généralement demandée qu'en cas d'échec du traitement de première intention ou de rechute et chez les sujets fortement suspects de tuberculose dont la microscopie reste négative (4). Les patients infectés par des mycobactéries le sont dans la majorité des cas par celles du complexe *tuberculosis* (5,6). Cependant un nombre non négligeable de patients sont infectés par les mycobactéries non *tuberculosis* (5, 6). Celles ci peuvent dans certaines conditions manifester un certain pouvoir pathogène et mimer les signes cliniques fréquents de la tuberculose (6, 1). Elles sont fréquemment résistantes aux antibiotiques utilisés dans les schémas thérapeutiques de première ligne (7), conduisant ainsi à des échecs de traitement. Le diagnostic différentiel des Mycobactéries du complexe *tuberculosis* et des Mycobactéries non *tuberculosis*, peut se faire par l'orientation morphologique, par des tests biochimiques, par des tests moléculaires ou par des tests immuno-chromatographiques rapides. Les tests biochimiques sont fastidieux, demandent l'entretien de souches contrôles, la pureté de la souche à tester, un respect de l'âge de la culture (ni trop jeune, ni trop vieille) et une expérience dans l'interprétation des résultats. Ces tests ne donnent pas toujours des résultats sans équivoques. Les tests moléculaires d'identification des mycobactéries comme le Genprobe ou le spolypotypage entre autres sont spécifiques et rapides (8, 9) mais nécessitent des équipements et des réactifs chers. Les tests immunochromatographiques de diagnostic des mycobactéries du complexe *tuberculosis* sont basés sur la détection de la protéine MPT64 uniquement sécrétée par les espèces du complexe *tuberculosis* sauf chez quelques sous souches de *M. bovis* BCG (10, 11).

Ce sont des tests ELISA en sandwich utilisant des anticorps monoclonaux de souris anti-MPT64 fixés sur une membrane de nitrocellulose, un second anticorps reconnaissant un autre épitope de l'AgMPT64 est utilisé pour la capture et la détection (12). Ces tests sont rapides (résultat obtenu en 15 minutes), d'utilisation facile tant en milieu liquide de MGIT qu'en milieu solide de Löweinstein Jensen (LJ) et ne nécessitent aucun appareillage particulier (10, 11). Trois tests sont actuellement disponibles, le test de diagnostic rapide de la tuberculose Capillia, le test rapide SD

Bioline AgMPT64 et le test d'identification BD MGIT TBcid (11). Les 3 tests présentent une sensibilité et une spécificité similaires (13) et sont moins chers que les tests moléculaires (10, 14,11). Ils ont montré une sensibilité et une spécificité élevées proches de 100% (13,10, 14, 2,15, 16, 17). En effet, plusieurs travaux ont trouvé une spécificité de 100%, la sensibilité varie cependant d'une étude à l'autre (10, 14, 15, 12). Cette variation de la sensibilité est due généralement aux possibles mutations dans le gène de la protéine MPT64 entraînant une absence de détection par les tests immunochromatographiques (18, 15). Parmi les trois tests, le test rapide SD Bioline est actuellement proposé sur le marché malien. Ce travail a pour objectif de d'évaluer la performance de ce test dans notre contexte.

Méthodologie

Nous avons effectué une étude rétrospective et prospective sur des souches de Mycobactéries conservées dans du glycérol à -20°C entre 2009 et 2010 au Laboratoire National de Référence de la Tuberculose et sur des souches fraîchement isolées en 2011 et en 2012. Les souches provenaient de malades référés pour test de sensibilité aux médicaments de première ligne, par l'Hôpital du Point G principalement du service de Pneumophysiologie, des Centres de Santé de Référence de Bamako, de Centres de Santé Communautaire de Bamako, d'autres hôpitaux et de cliniques privées. Le reste des isolats de l'étude provenaient de lésions suspectes de tuberculose prélevées sur des carcasses de bovins provenant de l'abattoir frigorifique de Bamako.

Le statut VIH des malades et la catégorie du patient en fonction du traitement ont été obtenus à partir des renseignements cliniques mentionnés sur les fiches de demande de culture et de tests de sensibilité. Pour le statut VIH, la recherche avait été effectuée dans les centres de santé d'origine selon le diagramme de dépistage (2 tests rapides, un pour le diagnostic VIH, le deuxième pour le typage et en cas de discordance, un troisième test est réalisé).

Au laboratoire de culture, les prélèvements qui étaient d'origine pulmonaire pour la majorité, ont été décontaminés par la méthode de Petroff à 4%, puis neutralisés avec du tampon phosphate et enfin concentrés par centrifugation. Pour les lésions tuberculeuses d'origine bovine, les morceaux de tissu (10g) ont été préalablement découpés, puis écrasés à l'aide de billes de verre.

A chaque fois, le culot de concentration a été récupéré avec 2 ml d'eau distillée stérile, avant de servir à l'étalement sur lame pour la microscopie après coloration au Ziehl Neelsen à chaud et à l'ensemencement sur milieux de culture. Le milieu

de Löwenstein-Jensen (LJ) a été ensemencé pour tous les prélèvements d'origine humaine et les milieux de Löwenstein Jensen avec et sans glycérol et le milieu liquide de MGIT (Mycobacteria Groth Indicator Tube) (19) pour les prélèvements bovins.

Les souches conservées, avaient été préalablement identifiées lors de leur premier isolement en fonction de l'aspect des colonies, du délai d'apparition des colonies, de l'aspect des Bacilles Acido-Alcool Résistants (BAARs) au microscope et par les tests biochimiques, catalase à 70°C, et réduction du nitrate. Les souches fraîchement isolées ont été identifiées à partir des aspects morphologique et cultural et par le test rapide. La réalisation technique du test rapide a consisté pour toutes les souches après confirmation de la présence de BAARS dans la culture, à écraser 3 à 4 colonies dans 200 µl de solution tampon fourni dans la trousse de diagnostic. Puis 100µl de ce mélange, sont déposés dans le puits de la cassette.

Pour les souches bovines, l'identification a été faite sur le milieu solide comme décrit précédemment et sur milieu liquide de MGIT. Pour le milieu liquide de MGIT, après confirmation de la présence de BAARS dans la culture au ZN, 100µl du milieu sont déposés dans le puits de la cassette. Un résultat positif en faveur du complexe *tuberculosis* apparaît sous forme de deux bandes et sous forme d'une bande pour les Mycobactéries non *tuberculosis*.

Les tests de sensibilité des souches identifiées comme appartenant au complexe *tuberculosis*, ont été réalisés sur milieu solide de LJ en suivant la méthode des proportions développée par Canetti, Ritz et Grosset avec les 4 antibiotiques de première intention, streptomycine, isoniazide, rifampicine et ethambutol.

Les souches conservées ont été repiquées sur milieu solide de LJ en 2011 afin de reprendre à

l'apparition des colonies, leur identification par le test rapide.

Pour la confirmation moléculaire des résultats du test rapide, le GenProbe et le spoligotypage ont été effectués sur environ 27% des souches non pigmentées trouvées négatives au test rapide au Centre de Recherche et de Formation sur le VIH et la Tuberculose SEREFO/CEREFO (Mali).

Résultats :

En tout 77 souches provenant de prélèvements cliniques ont été repiquées et 64 ont été fraîchement isolées dont 51 isolats humains et 13 d'origine bovine.

Catégorie de patients et statut VIH

Les isolats cliniques provenaient de 49 patients naïfs de tout traitement antituberculeux et de 78 patients en phase chronique (échec de traitement de première ligne et rechute). La coinfection avec le VIH a été retrouvée chez 16 patients, 49 avaient une sérologie VIH négative et le statut de 63 n'était pas renseigné (Tableau I).

Aspects bactériologiques

Pour les prélèvements des patients ayant servi à l'étude, 100 étaient positifs à la microscopie et 28 étaient négatifs (Tableau II). Parmi les 77 souches repiquées, 48 avaient été identifiées comme appartenant au complexe *tuberculosis* et 29 comme non *tuberculosis* à leur premier isolement. L'identification morphologique des 51 souches fraîchement isolées ont donné 37 *M. tuberculosis* et 14 *M. non tuberculosis*. Les tests de sensibilité réalisés sur 56 des 85 *M. tuberculosis*, ont donné 18 souches pharmacosensibles, 4 souches monorésistances, 5 souches polyrésistantes et 29 souches multi résistantes (Tableau III).

Tableau I : Statut VIH et catégories de patients par rapport aux Mycobactéries isolées

Table I: HIV status, categories of patients and isolated Mycobacteria

Souches	Nouveaux cas			Cas chroniques		
	VIH+	VIH-	NR	VIH+	VIH-	NR
MTBc	4	0	26	4	36	15
MNT	8	1	10	0	13	11
Total	12	1	36	4	49	26

MCTB= Mycobactéries du complexe *tuberculosis*, MNT= Mycobactéries non *tuberculosis*

NT= Non Renseigné

Tableau II : Résultat de la recherche de BAARs dans le prélèvement en fonction des souches isolées
Table II: Specimen AFB result and strains isolated

SOUCHES	MICROSCOPIE		TOTAL	
	Positif	Négatif	Nombre	Pourcentage
MTBc	73	12	85	66,4
MNT	27	16	43	33,6
TOTAL	100	28	128	100,0

AFB= Acid-Fast Bacillus

Tableau III : Profil de résistance aux antituberculeux de première ligne testés
Table III: Resistance profile of the first line and tuberculosis drugs

Pharmacosensible	Monorésistante	Polyrésistante	Multirésistante	TOTAL
NOUVEAUX CAS				
13	2	0	0	15
CAS CHRONIQUES				
5	2	5	29	41
TOTAL				
18	4	5	29	56

Evaluation du test rapide

L'identification par le test rapide des 77 souches repiquées, a donné 47 *M. tuberculosis* et 30 *M. non tuberculosis* (Tableau IV); une des souches identifiées comme *tuberculosis* lors du premier isolement n'a pas été reconnue comme tel par le test rapide. Au premier isolement et après repiquage, elle a présenté sur milieu de LJ, toutes les caractéristiques d'orientation morphologiques en faveur d'une mycobactérie du complexe *tuberculosis*.

Parmi les 43 autres souches diagnostiquées non *tuberculosis* par le test rapide, 7 se présentaient sous forme de colonies pigmentées. Les BAARs au microscope ne se présentaient pas sous forme d'agrégats. Le test à la catalase à 70°C avait été positif au premier isolement chez 17 des 28 souches

repiquées et testées. Les souches analysées, 9 par le Gen Probe et 3 par le spoliotypage ont été négatives pour le complexe *tuberculosis*.

Quant aux 51 souches fraîchement isolées, leur identification par le test rapide a donné 37 MTBc et 14 MNT.

Les 13 souches d'origine bovine, identifiées comme *M.bovis* par les aspects morphologiques et culturels et par le test de réduction du nitrate, ont été toutes positives au test rapide. Cependant 3 souches avaient donné des colonies pigmentées sur milieu de LJ orientant vers un atypique cependant, le test rapide réalisé à partir du milieu liquide a été positif impliquant un mélange de Mycobactéries *tuberculosis* et non *tuberculosis* dans la culture (Tableau IV).

Tableau IV : Résultats des tests d'identification réalisés**Table IV** : Identification tests profile

SOUCHES REPIQUEES		SOUCHES FRAICHES				
Isolats cliniques		Isolats cliniques		Bovines		
ID* biochimique+ morphologie colonies	Test rapide	ID Morphologie (colonies sur LJ et BAARS)	Test rapide	Morphologie BAARS et colonies sur LJ	ID rapide	Identification morphologique et test rapide
MTBC= 48	47	MTBC = 37	37	10 MTBC+ 3 co infections	13 positifs	10 MTBC + 3 co- infections MTBC/MNT
MNT= 29	29	MNT= 14	14			
ID moléculaire	Test rapide					
Genprobe MNT= 9	9					
Spoligotyping MNT= 3	3					

ID*= Identification

Sur 98 MTBC testés dans l'étude, le test rapide a pu diagnostiquer 97 (un seul faux négatif). Quant aux prélèvements ne contenant pas de mycobactéries du complexe *tuberculosis*, ils ont été correctement diagnostiqués comme tel (pas de faux positif).

Nous avons évalué la sensibilité de notre test par rapport à l'identification biochimique et morphologique à 99% et la spécificité à 100%. Cette sensibilité atteint 100% en combinant l'identification biochimique ou l'identification morphologique au test rapide.

Discussion :

La fréquence des mycobactéries du complexe non *tuberculosis* isolées au laboratoire est importante au Mali comme en attestent les résultats de cette étude (33,6%). La différence de fréquence avec une autre étude effectuée au Mali (6) peut s'expliquer par le fait que dans celle ci, l'infection à mycobactérie non *tuberculosis* avait été confirmée par 2 prélèvements contrairement à la notre, la taille de l'échantillon étant différente ainsi que la période de l'étude. La microscopie après concentration du prélèvement a révélé la présence ou l'absence de BAARS autant pour les prélèvements contenant des mycobactéries *tuberculosis* que pour ceux contenant des non *tuberculosis* (Tableau II), ce résultat confirme la nécessité de l'identification de la souche infectante avant la mise sous traitement, la microscopie seule ne pouvant pas différencier le complexe *tuberculosis* des autres mycobactéries (20). Nous n'avons pas pu faire une corrélation entre apparition d'infection à Mycobactéries non *tuberculosis* et infection VIH, le statut sérologique de tous nos patients n'étant pas connu.

L'AgMPT64 n'a pas été détecté par le test rapide chez une seule souche de mycobactéries du complexe *tuberculosis* sur un total de 98 des souches testées. Cette non détection peut être due à une mutation sur la séquence de la protéine, les phénomènes de délétion, d'insertion ont été très souvent évoqués pour ce gène (14, 18, 2, 15). L'identification morphologique de même que l'identification biochimique ont permis de classer cette souche parmi les mycobactéries *tuberculosis* évitant ainsi une erreur de diagnostic. Le test biochimique utilisant la propriété de la catalase thermolabile à 70°C, n'a pas pu identifier de façon équivoque certaines mycobactéries atypiques. Moins du tiers seulement des mycobactéries non *tuberculosis* diagnostiquées par le test rapide, ont pu être confirmés par les techniques de biologie moléculaire à cause du coût élevé de ces tests. Nous n'avons donc pas pu estimer les performances de notre test par rapport à cette méthode d'identification.

La protéine a pu être décelée dans un mélange de souches en milieu liquide, ce qui confirme qu'elle est détectable malgré la présence de contaminants ou d'autres mycobactéries (21, 15) contrairement aux tests biochimiques qui nécessitent la pureté de la culture.

L'analyse des résultats des tests de sensibilité aux médicaments, nous a permis d'affirmer que le profil de résistance et ou la prise répétée des médicaments antituberculeux de première ligne pour les cas de retraitement et de rechute n'ont aucun impact sur la détection de l'Ag MPT64, ce qui confirme les résultats d'autres recherches (21).

Nous avons trouvé une spécificité de 100% et une sensibilité de 99%, par rapport aux tests d'identification classiques à partir des aspects morphologiques et des propriétés biochimiques. Ces pourcentages sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études pour les tests rapides détectant l'Ag MPT64 (2, 15, 16). En combinant le test rapide et l'identification morphologique, nous avons obtenu une sensibilité de 100%. D'autres chercheurs avaient trouvé une sensibilité similaire en combinant un test rapide immunochromatographique avec la présence de cordes dans le milieu liquide (16).

Conclusion

Le test rapide de détection de l'Ag MPT64 SD Biline MPT64 est très simple, ne nécessite que quelques consommables à la portée de tout laboratoire de culture, donne un résultat au bout de 15 minutes après confirmation de la présence de BAARs dans la culture.

Les tests immunochromatographiques rapides peuvent constituer un moyen diagnostique efficace dans les zones d'endémie tuberculeuse où les moyens diagnostiques sont limités. A cause d'une possibilité d'apparition de mutation dans le gène de la protéine, les résultats négatifs doivent être confirmés par une autre forme d'identification, notamment l'identification morphologique qui présente un coût moindre.

Référence :

- 1- Gopinath K, Singh S Non-Tuberculous Mycobacteria in TB-Endemic Countries: Are We Neglecting the Danger? PLoS Neglected Tropical Diseases 2010; 4(4): 615.
- 2- **Muyoyeta, M., et al.** Comparison of four culture systems for Mycobacterium tuberculosis in the Zambian National Reference Laboratory. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2009; **13**:460–465.
- 3- Ramsay. A and Harries A.D. The clinical value of new diagnostic tools for tuberculosis. Medicine Reports 2009 ; 1:36
- 4- PNLT. Guide Technique pour le personnel de santé, Programme National de Lutte contre la Tuberculose, Mali. 3^e édition, Version 2008.
- 5- Ani AE, Diarra B, Dahle UR, Lekuk C, Yetunde F, Somboro AM, Anatole Tounkara, Idoko J. Identification of mycobacteria and other acid fast organisms associated with pulmonary disease. Asian Pacific Journal of Tropical Disease (2011): 259-262
- 6- Maiga M, Siddiqui S, Diallo S, Diarra B, Traore´ B, et al. (Failure to Recognize Nontuberculous Mycobacteria Leads to Misdiagnosis of Chronic Pulmonary Tuberculosis. PLoS ONE 2012 ; 7(5): e36902.
- 7- Tortoli E . Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. Clinical Microbiology and Infection 2009 ; 15(10): 906–910.
- 8- Gori. A, Bandera. A, Marchetti. G, Esposti. A.D, Catozzi. L, Nardi. G.P, and al. .Spoligotyping and Mycobacterium tuberculosis. Emerging Infectious Diseases 2005 ; 11 (8) : 1242-1248
- 9- Somoskovi. A., Song. Q, Mester J., Tanner C. , Hale. Y.M, Parsons L.M, and Max Salfinger. Use of Molecular Methods To Identify the Mycobacterium tuberculosis Complex (MTBC) and Other Mycobacterial Species and To Detect Rifampin Resistance in MTBC Isolates following Growth Detection with the BACTEC MGIT 960 System. Journal of clinical microbiology 2003 ; 2822–2826
- 10- **Fabre, M. R.** Vong(1), T. Gaillard(2), A. Merens(3), F. Nouridjan(2), P. Saint-Blancard(1),, **and al.** 2010. Evaluation of the SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid(R) for the diagnosis of tuberculosis. Pathologie Biologie 2010; **59**:26–28.
- 11- Parsons. L.M, Somosko`vi. A, Gutierrez. C, Lee. E, Paramasivan C. N.,Abimiku. A et al. Laboratory Diagnosis of Tuberculosis in Resource-Poor Countries: Challenges and Opportunities. Clinical Microbiology Reviews 2011 ; 24: 314–350.
- 12- **Park, M. Y., et al.** Evaluation of an immunochromatographic assay kit for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex in clinical isolates. Journal of Clinical Microbiology 2009 ; **47**:481–484
- 13- Brent A.J, Mugo. D, Musyimi. R, Mutiso A., Morpeth. S, Levin. M and Scott A.G. Performance of the MGIT TBc Identification Test and Meta-Analysis of MPT64 Assays for Identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex in Liquid Culture. Journal of clinical microbiology 2011, 49 (12): 4343–4346
- 14- Hillemann, D., S. Rusch-Gerdes, and E. Richter. Application of the Capilia TB assay for culture confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease 2005 ; **9**:1409–1411.
- 15- **Ngamlert, K., et al.** Diagnostic performance and costs of Capilia TB for Mycobacterium tuberculosis complex identification from broth-based culture in Bangkok, Thailand. Tropical Medicine and International Health 2009 ; **14**:748–753.
- 16- Shen, G. H., C. H. Chen, C. H. Hung, K. M. Wu, C. F. Lin, Y. W. Sun, and J. H. Chen. Combining the Capilia TB assay with smear morphology for the identification of Mycobacterium tuberculosis

- complex. *Int. J. Tuberc. Lung Dis* 2009 ; 13:371–376
- 17- **Wang, J. Y., et al.** Performance assessment of the Capilia TB assay and the BD ProbeTec ET system for rapid culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis* 2007 ; **59**:395–399
- 18- **Hirano, K., A. Aono, M. Takahashi, and C. Abe.** Mutations including IS6110 insertion in the gene encoding the MPB64 protein of Capilia TB negative *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; **42**:390–392.
- 19- **Siddiqi, S. H., and S. Ruesch-Gerdes.** MGIT Procedure manual. Foundation for Innovative New Diagnostics (FIND), Geneva, Switzerland. http://www.finddiagnostics.org/export/sites/default/resourcecentre/find_documentation/pdfs/mgit_manual_nov_2007.pdf.
- 20- Koh, W. J., O. J. Kwon, C. M. Yu, K. M. Jeon, G. Y. Suh, M. P. Chung, H. J. Kim, S. W. Han, S. Y. Park, and N. Y. Lee. Recovery rate of nontuberculous mycobacteria from acid-fast-bacilli smear-positive sputum specimens. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2003; 54:22–32.
- 21- Hasegawa, N., T. Miura, K. Ishii, K. Yamaguchi, T. H. Lindner, S. Merritt, et al. New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; **40**:908–912.