

Source des mycobactéries non tuberculeuses dans les bassins versants

Nicolas Radomski¹, Françoise Lucas^{2*}, Emmanuelle Cambau³, Laurent Moulin⁴,
Sophie Haenn⁴, Moilleron Régis²

¹ *Leesu-Cereve, Ecole des Ponts ParisTech, Université Paris Est, 6-8 avenue Blaise Pascal Cité Descartes, 77455 Champs sur marne : nicolas.radomski@leesu.enpc.fr*

² *Leesu-Cereve, Université Paris Est, 61 avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil : moilleron@univ-paris12.fr, lucas@univ-paris12.fr*

³ *Laboratoire associé du Centre national de référence des mycobactéries et de la résistance aux antituberculeux, Laboratoire de bactériologie, Hospital Saint-Louis, 75010 Paris : emmanuelle.cambau@sls.aphp.fr*

⁴ *Eau de Paris, Direction Recherche Développement Qualité Environnement, 144 avenue Paul Vaillant Couturier, 75014 Paris : laurent.moulin@eaudeparis.fr, sophie.haenn@eaudeparis.fr*

* *Personne à contacter, lucas@univ-paris12.fr*

Plan

Introduction.....	2
1 Résumé des développements analytiques de 2008	3
1.1 Harmonisation des méthodes bactériologiques.....	3
1.2 Développement d'une méthode en biologie moléculaire.....	3
2 Développements analytiques de 2009.....	3
2.1 Harmonisation des méthodes bactériologiques.....	3
2.1.1 Matériel et méthode.....	4
2.1.2 Résultats	4
2.1.3 Conclusion.....	5
2.2 Développement d'une méthode de biologie moléculaire.....	5
2.2.1 Matériel et méthode.....	5
2.2.2 Résultats et conclusion	7
2.2.3 Discussion	8
2 Campagnes d'échantillonnage 2009	9
3 Prévision 2010	9
3.1 Campagnes de prélèvement à compléter.....	10
3.2 Identification des sources de MNT	10
Références bibliographiques.....	11

1 Introduction

Sans transmission interhumaine démontrée, il est généralement accepté que l'exposition environnementale, particulièrement par l'eau, est une origine majeure de la plupart des infections humaines à mycobactéries non tuberculeuses (MNT). L'incidence des cas de mycobactériose d'origine hydrique est décrite de plus en plus fréquemment dans la littérature, en particulier des infections cutanées de personnes immunocompétentes [1] et des infections pulmonaires causées par l'inhalation d'aérosols [1-3]. L'ingestion ou l'inhalation d'eau contaminée par des MNT, à l'exception des eaux de baignade pour l'instant, peuvent aussi être une voie d'exposition des enfants [1, 4].

Les MNT sont ubiquitaires et peuvent être isolées d'une grande variété d'écosystème aquatiques, incluant l'eau de l'environnement, l'eau potable, l'eau récréative et l'eau d'origine industrielle [5, 6]. Par exemples, les MNT peuvent persister et proliférer dans les fleuves [7] et l'eau du réseau utilisée dans les hôpitaux a été reportée comme potentiellement contaminée par les MNT [1, 8]. Les réservoirs naturels incluent des plants aquatiques, des amibes, des vertébrés et des insectes aquatiques [9-11]. Du fait que les MNT sont des pathogènes émergents pour l'homme et les animaux domestiques, il semble important d'identifier les sources des MNT et de mesurer leur prolifération, ainsi que leur persistance dans les écosystèmes d'eau douce. Ceci nécessite donc une méthode standardisée et robuste de quantification des MNT dans l'eau. Ainsi, les actions de 2009 viennent compléter celles de 2008 (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008) dans l'objectif d'obtenir une méthode fiable de quantification des MNT par bactériologie ou biologie moléculaire.

Suite à un résumé des résultats des actions 2008 (§1), nous présenterons les études complémentaires de comparaison des méthodes de bactériologie pour le dénombrement et l'isolement des MNT dans les échantillons d'eau de surface. La plupart des méthodes de culture des MNT sont développées pour le milieu médical, et de ce fait sont peu adaptées à des échantillons de l'environnement (§2.1). Effectivement, l'eau de surface comprend 10^4 à 10^7 bactéries par ml [12] et une diversité microbienne plus importante que celle des échantillons cliniques [13-17]. De ce fait de nombreuses espèces bactériennes de l'environnement peuvent évincer les MNT lors de la croissance sur milieu de culture et ainsi gêner leur isolement et dénombrement. Actuellement, il n'y a pas de consensus claire sur les méthodes de bactériologie, et nous avons donc déterminé quelle était la méthode la plus à même de convenir à des échantillons d'eaux de surface. En suite (§2.2), nous reviendrons sur le développement d'une méthode de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR) basée sur les amorces nucléiques F et R ciblant l'ADNr 16S ([18], qui se sont avérées très spécifiques (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008). le principe de balanced heminested PCR (B-HN PCR) [18, 19] à également été appliqué à ce couple d'amorce afin d'en améliorer la sensibilité. La nouvelle méthode de qPCR a été comparée à deux méthodes de qPCR déjà publiées et dont la spécificité des amorces n'avait pas été étudiée en détail. La première cible l'ADNr 16S et utilise une chimie SyberGreen®, elle a déjà été utilisée pour quantifier les MNT dans de l'eau d'hémodialyse [20]. La seconde méthode cible le gène *hsp65* et utilise une chimie TaqMan® [21], elle a initialement était développée pour identifier des MNT d'intérêt clinique et n'a jamais était appliquée à des échantillons de l'environnement. Notre action 2009 a donc été de comparer la spécificité et la sensibilité de la méthode que nous avons développée à celles des deux méthodes publiées, à l'aide d'un ensemble de 86 microorganismes isolées de la Seine ou provenant de collections. Suite à ces présentations des développements analytiques, nous concluons sur les perspectives des actions à mener en 2010 en regard des campagnes de prélèvement réalisées en 2008 et 2009 (§2 et §3).

1 Résumé des développements analytiques de 2008

1.1 Harmonisation des méthodes bactériologiques

Avec l'objectif d'harmoniser les méthodes de recherche des MNT (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008), l'action menée en 2008 avait porté sur l'élimination des microorganismes interférants dans les échantillons d'eau de Seine. Notre étude de 2008 a permis d'observer que le cocktail d'antibiotiques polymyxine, amphotéricine B, acide nalidixique, triméthoprime et carboxy pénicilline (PANTA) additionné ou non de vancomycine (PANTAV), diminuait significativement la densité de microorganismes interférents. La comparaison des méthodes de décontamination chimiques Lowenstein, Petroff, Tacquet-Tison, Kubica, acide oxalique acid et chlorure de cetylpyridinium (CPC), avait permis d'observer une diminution significative de la densité de microorganismes interférents par rapport aux témoins non décontaminés, sans pour autant observer de différences significatives entre elles (GLM, $p=0,666$). Aucune des méthodes de décontamination chimique, combinées ou non à l'utilisation d'antibiotiques dans le milieu de culture, n'avaient permis d'éliminer l'ensemble des microorganismes interférents présents dans des échantillons d'un litre d'eau de surface. Cependant la combinaison des méthodes de décontamination chimique avec la supplémentation du milieu de culture en antibiotiques sont apparues comme la méthode la plus efficace, engendrant une diminution de 4 à 4,5 log de la densité en microorganismes interférents en comparaison au témoin sans décontamination chimique ni antibiotiques dans le Middlebrook 7H11j.

Durant ces études d'impacts des méthodes de bactériologie sur les microorganismes interférants, différentes espèces de MNT avaient été isolées de l'eau de surface de la prise d'eau de l'usine de potabilisation d'Orly. D'après la littérature, les espèces de MNT que nous avons isolées dans l'eau de la Seine (*M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. austroafricanum*, *M. psychrotolerans*, *M. insubricum*, *M. arupense*, *M. llutzerense*, *M. setense*) sont potentiellement pathogènes pour l'homme et sont connues historiquement ou ont été décrites très récemment. Cependant le nombre d'isolement faible et non reproductible, n'avait pas permis de les quantifier de façon fiable. C'est pourquoi nous avons développé une méthode de quantification par PCR en temps réel (qPCR) qui soit adapté aux échantillons d'eau de surface.

1.2 Développement d'une méthode en biologie moléculaire

Avec l'objectif de développer une méthode de quantification par qPCR des MNT dans les eaux de surface, 38 couples d'amorces PCR avaient été triés en fonction de leur spécificité et de leur sensibilité théorique (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008) par l'algorithme BLAST de GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les dix couples d'amorces les plus spécifiques et sensible théoriquement avaient été retenus pour étudier par PCR conventionnelle leur spécificité sur une collection des microorganismes non mycobactérien de référence (7 bactéries) et isolés de la Seine et identifiés par séquençage de l'ADNr 16S (47 bactéries) ou de l'ADNr 28S (3 champignons filamenteux). Les résultats de cette étude de spécificité avaient permis de sélectionner le couple d'amorce F/R spécifique des MNT à 92,98%.

2 Développements analytiques de 2009

Les développements analytiques de 2009 visaient à finaliser la mise au point de la méthode bactériologique et à mettre au point une méthode de quantification par PCR temps réel à partir du couple d'amorce sélectionné en 2008.

2.1 Harmonisation des méthodes bactériologiques

L'action menée en 2009 avait pour but de déterminer l'impact des cocktails d'antibiotiques et des méthodes de décontamination chimique sur la croissance des MNT. Ainsi les résultats ont permis de finaliser le choix de la meilleure méthode pour l'isolement des MNT dans les échantillons d'eau de surface.

2.1.1 Matériel et méthode

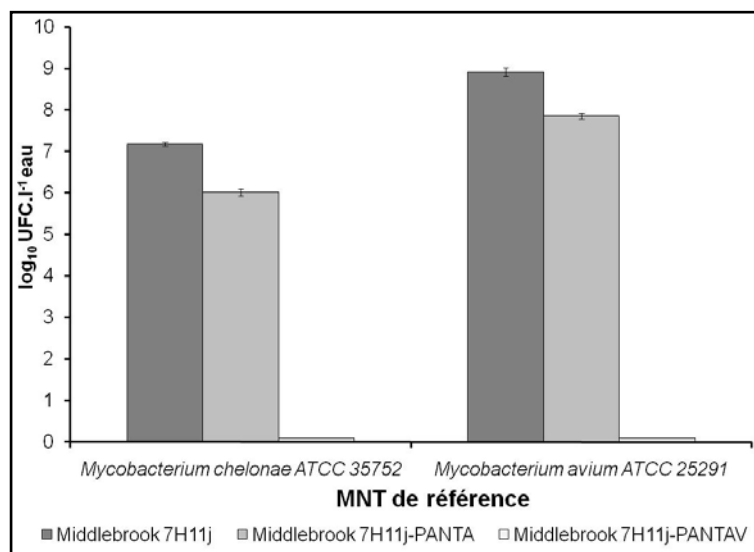
Des échantillons d'eau de surface ont été concentrés par centrifugation, stérilisés et inoculés artificiellement par une MNT à croissance rapide (*M. chelonae* ATCC 35752, à 10^5 UFC/ml d'inoculum) et une MNT à croissance lente (*M. avium* ATCC 25291, à 10^7 UFC/ml d'inoculum). Les échantillons inoculés artificiellement ont été traités suivant les protocoles utilisés précédemment durant l'étude d'impact sur les microorganismes interférents (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008). Sans détailler, les méthodes de décontamination Lowenstein [22], Petroff [23], Tacquet-Tison [24], Kubica [25], acide oxalique acid [26] et cetylpyridinium chloride (CPC) [27] ont été appliquées en combinaison avec ou sans l'utilisation dans le milieu de culture Middlebrook des cocktails d'antibiotiques PANTA et PANTAV [28, 29].

2.1.2 Résultats

- Impact de l'utilisation des antibiotiques

Le cocktail d'antibiotique PANTA diminuait (Figure 1) significativement la densité des deux MNT de référence étudiées (*M. chelonae*: GLM: $F=261.09$, d.f.=2, $n=9$, $p<0.001$; *M. avium*: GLM: $F=52.99$, d.f.=2, $n=9$, $p<0.001$). Cependant le cocktail PANTA s'est avéré beaucoup moins nocif que le cocktail PANTAV pour ces deux MNT étudiées. Effectivement, les densités de *M. chelonae* et *M. avium* ont été évaluées respectivement à $6.0 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/l et $7.9 \pm 0.1 \log_{10}$ CFU/l sur Middlebrook 7H11j-PANTA, alors qu'aucune croissance n'a été observée sur Middlebrook 7H11j-PANTAV (Figure 1).

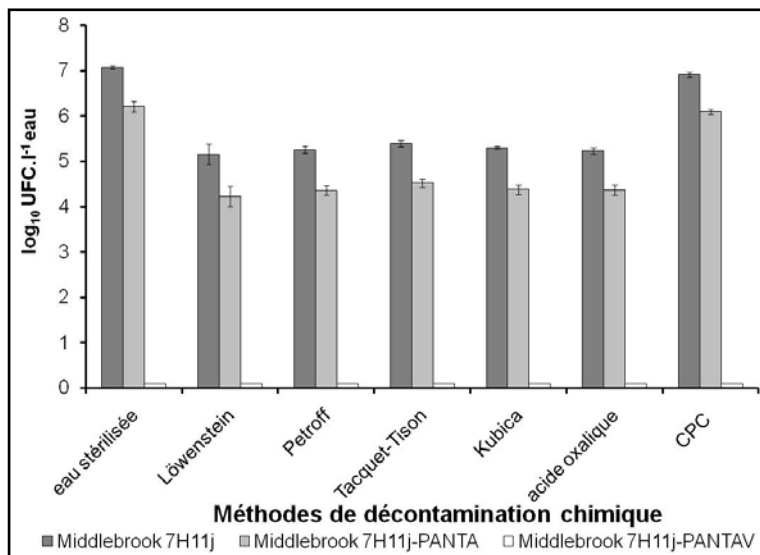
Figure 1 : Effet de la supplémentation en antibiotiques (PANTA et PANTAV) du milieu Middlebrook. Nombre moyen de MNT récupéré (n=9 pour chaque MNT de référence).



- Impact des méthodes de décontamination chimique

La comparaison des méthodes de décontamination chimiques a permis d'observer une diminution (Figure 2) significative de la densité de *M. chelonae* ATCC 357525 par rapport aux témoins non décontaminés (GLM: $F=276.66$, d.f.=6, $n=63$, $p<0.001$, contrôlé par la supplémentation en antibiotique). Cette observation a aussi été effectuée avec la souche *M. avium* ATCC 25291 (GLM: $F=59.11$, d.f.=6, $n=63$, $p<0.001$, contrôlé par la supplémentation en antibiotique). De plus, il est apparu que la méthode CPC diminuait (Figure 2) significativement moins la densité de *M. chelonae* ATCC 357525 (MLG: $F=216.89$, d.f.=5, $n=54$, $p<0.001$, contrôlé par la supplémentation en antibiotiques) et *M. avium* ATCC 25291 (GLM: $F=37.30$, d.f.=5, $n=54$, $p<0.001$, contrôlé par la supplémentation en antibiotiques) que les autres méthodes de décontamination chimique étudiées.

Figure 2 : Effet des méthodes de décontamination chimique sur la croissance de *M. chelonae* ATCC35752. Les échantillons d'eau de surface concentrés, stérilisés, puis inoculé (n=63), ont été ensemencé après décontamination chimique sur milieu Middlebrook 7H11j avec ou sans antibiotiques (PANTA ou PANTAV). Les barres d'erreurs représentent la déviation standard à la moyenne.



2.1.3 Conclusion

Les résultats de 2008 et 2009 nous ont montré que la quantification des MNT dans l'eau de surface semble impossible avec les méthodes de bactériologie actuelles, car que ce soit après décontamination chimique, supplémentation du milieu de culture en antibiotiques, ou une combinaison des deux, des microorganismes interférents subsistent et peuvent se développer sur les milieux plus rapidement que les MNT. Mise à part l'utilisation du supplément d'antibiotiques PANTA dans le milieu de culture qui pourrait convenir à une énumération reproductible dans des échantillons pauvres en microorganismes interférents, la quantification des MNT par bactériologie ne semble pas être possible pour des échantillons riches en microorganismes interférents comme l'eau de surface. A contrario, l'isolement de MNT potentiellement pathogènes pour l'homme est possible dans l'eau de surface. En raison de son efficacité sur la diminution de la densité en microorganismes interférents et de sa faible diminution de la densité en MNT, la méthode CPC combinée à la supplémentation en antibiotiques PANTA est la plus appropriée au traitement de l'eau de surface en vue d'isoler des MNT. Pour quantifier les MNT nous avons décidé de privilégier une approche moléculaire par PCR quantitative.

2.2 Développement d'une méthode de biologie moléculaire

En 2009 nous avons développé une méthode de PCR quantitative (qPCR) à partir des amorces nucléiques F et R ciblant l'ADNr 16S [18] que nous avons sélectionnées précédemment (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008). Ces amorces avaient été utilisées précédemment pour détecter la présence du genre *Mycobacterium* dans des échantillons cliniques. Nous avons utilisé ces amorces et sondes [18] pour développer une PCR en temps réel par chimie TaqMan® en vue de quantifier les MNT. Le développement de cette nouvelle méthode a intégré l'évaluation de l'utilité de l'étape B-HN PCR [18, 19], et l'optimisation des concentrations en amorces, sondes et MgCl₂. Nous avons comparé cette méthode avec la méthode de PCR quantitative publiée par Dutil *et al.* [20] pour des fluides caloporteurs en chimie Sybergreen® et celle publiée par Tobler *et al.* [21] pour des échantillons cliniques en chimie TaqMan®. La comparaison et la mise au point ont été effectuées à partir d'ADN extrait d'une collection de souches de MNT et d'une collection de souches d'espèces non mycobactériennes (description des souches dans PIREN_Rapport_actionMNT2008).

2.2.1 Matériel et méthode

- Extraction de l'ADN chromosomique

Après culture des microorganismes étudiés sur milieu approprié (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008), leur ADN chromosomique a été extrait par la méthode d'extraction cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) usuellement utilisées pour les mycobactéries dont la paroi est plus difficile à rompre que celle des microorganismes non acido-alcool résistants [30-34]. L'ADN et les protéines ont été dosés respectivement à 260 nm et 280 nm par un spectrophotomètre WPA Biowave DNA.

- Réactifs et appareillage de qPCR

La méthode qPCR basée sur les amorces F et R que nous avons développée est nommée méthode A [18]. Les concentrations en ratio d'amorces, en sonde et en MgCl₂ ont été optimisées successivement pour cette méthode. Les deux autres méthodes qPCR ont été respectivement notées B et C pour Dutil *et al.* [20] et Tobler *et al.* [21].

Les réactions de qPCR incluent du 6-carboxy-X-rhodamine (ROX) comme référence passive de normalisation du volume réactionnel. Un ABI 7500 real-time PCR muni du logiciel d'acquisition SDS (Applied Biosystems Inc) a été utilisé pour l'ensemble des analyses. Les tampons qPCR d'Eurogentec ont été utilisés en suivant les recommandations du fournisseur pour les chimies Sybergreen® et TaqMan®. Une HotGoldStar Taq polymérase a été utilisée pour l'amplification (Eurogentec). Les sondes ont été marquées avec du 6-carboxyfluorescein (FAM) et du Black Hole Quencher (BHQ™). Toutes les réactions et les gammes d'ADN étalon ont été effectuées en triplicata. La détermination du cycle threshold (Ct) a été effectuée pour 0.1 unités de ΔRn (fluorescence gagnée au dessus de la ligne de base/signal de la référence passive de normalisation du volume réactionnel).

- Cycles d'amplification de qPCR

En fonction des méthodes de qPCR étudiées (A, B ou C), différents cycles de qPCR ont été appliqués en accord avec les auteurs [20, 21].

- Paramètre de comparaison des méthodes de qPCR

Les méthodes de qPCR ont aussi été comparées sur la base de leur efficacité (E), de leur coefficient de corrélation (r²), de leur limite inférieure de quantification (LIQ), de leur spécificité et de leur sensibilité. Pour cela des dilutions en séries au 5^{ème} d'une extraction d'ADN de *M. chelonae* spp. *chelonae* ATCC 35752^T ont été préparées indépendamment dans du tampon TE 1X en triplicata. L'efficacité (E) a été calculée en utilisant la formule $E(\%) = (10^{(-1/CD)} - 1) \times 100$ basée sur le calcul préalable du coefficient directeur (CD) de la régression linéaire de l'évolution du cycle de détection en fonction du logarithme décimale de la masse d'ADN mesurée par spectrophotométrie [35]. Les amplifications non reproductibles n'ont pas été prises en compte pour estimer E et r². La limite inférieure de quantification (LIQ) correspond à la gamme de concentrations pour laquelle les 9 essais réalisés se sont avérés positifs (essais en triplicata pour trois gammes étalon indépendantes). Les résultats sont donnés en équivalent génome (EG) de *M. chelonae* spp. *chelonae*, en accord avec différents auteurs [36-43].

La spécificité a été évaluée en utilisant une collection de 100 microorganismes interférents constituée en 2008 (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008), et incrémentée de bactérie de référence éloignées et proches du genre *Mycobacterium* (Tableau 1). La sensibilité a été évaluée en utilisant une collection de 30 espèces du groupe MNT représentatives des infections humaines liées à une contamination hydrique, ainsi que des espèces isolées de la Seine (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008).

Tableau 1 : Bactéries de référence non mycobactériennes utilisées pour estimer la spécificité des méthodes qPCR.

Genre et espèce	Source (codification) ^a	Origine de l'isolat	Référence
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032 ^T	Eau usée	[44, 45]
<i>Corynebacterium ammoniagenes</i>	ATCC 6871 ^T	Selle d'enfant	[45, 46]
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	ATCC 10700 ^T	Gorge humaine	[45]
<i>Helicobacter pylori</i>	ATCC 43504 ^T	Biopsie gastrique	[47-49]
<i>Nocardia cerraadoensis</i>	DSM 44546 ^T	sol	[50, 51]
<i>Nocardia farcinica</i>	IFM 10152	Bronche humaine	[52]
<i>Nocardia cummidelens</i>	DSM 44490 ^T	Caoutchouc vulcanisé	[53, 54]

^a ATCC: American Type Culture Collection, Rockville; Maryland; DSM: DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany; IFM: Culture Collection of the Research Centre for Pathogenic Fungi and Microbial Toxicoses, Chiba, Japan; T: souche type.

2.2.2 Résultats et conclusion

- Intérêt de la B-NH PCR

Bien que permettant de diminuer la LIQ (Tableau 2), l'addition d'une étape de pré-amplification (B-NH-PCR) préalable diminue grandement la linéarité de réponse de la PCR ($r^2 < 0.9$) (Tableau 2).

Tableau 2 : Comparaison de l'efficacité (E), du coefficient de corrélation (r^2), de la limite inférieure de quantification (LIQ) et du cycle threshold (Ct max) de la méthode de quantification du genre *Mycobacterium* par la méthode A non optimisée avec ou sans balanced heminested (B-HN) PCR préalable.

Facteurs ^a	sans B-HN PCR	avec B-HN PCR
E moyenne (%)	68.47±1.53 %	58.71±15.95 %
r^2 moyen (régression linéaire)	96.66±0.01	74.76±0.04
gamme LIQ ^b]1731; 8656] fg]346; 1731] fg
]393; 1967] GE]79; 393] GE
Ct max ^c	34.82±1.00	15.51±3.23

^a La déviation standard est estimée avec 3 séries de dilutions indépendantes réalisées chacune en triplicata. ^b Les gammes de LIQ correspondent aux gammes de détection des 9 essais (3 essais pour chacune des 3 séries de dilutions indépendantes) et les unités sont exprimées en fentogramme (fg) et en équivalent génome (EG) de *M. chelonae ssp. chelonae* ATCC 35752T. ^c Le Ct max correspond au cycle threshold moyen ± la déviation standard sur les 9 essais.

- Optimisation de la méthode A

Concernant l'optimisation de la qPCR (méthode A) basée sur les amorces et la sonde sélectionnées [18], les plus faibles Ct ont été observés pour un ratio particulier en amorces 110F et I571R. En utilisant ce ratio d'amorces, l'étude de l'influence de la concentration n'a pas permis d'observer de tendance particulière sur l'évolution de E, r^2 et Ct max, pour les trois concentrations de sonde testées (Tableau 3).

Tableau 3 : Evolution de l'efficacité (E), du coefficient de régression (r^2) et du cycle threshold de la limite de quantification (Ct max) en fonction de la concentration en sonde H19R sur une gamme d'ADN de *M. chelonae ssp. chelonae* ATCC 35752.

[H19R] (nM)	50	100	250
E (%)	65.49	63.20	66.61
r^2 (%)	99.35	98.98	99.04
Ct max	39.02 ± 0.57	39.00 ± 0.77	38.38±0.40

La concentration en MgCl₂ est apparue être fonction de l'efficacité de qPCR et fonction inverse du coefficient de régression linéaire de cette dernière (Tableau 4). Effectivement, l'augmentation des conditions de stringence de la réaction permet d'améliorer le rendement de détection du nombre de copie d'ADN, mais rend aussi la quantification de ces dernières moins stable. Les conditions de stringence étant aussi reconnues comme fonction inverse de la spécificité de réaction, nous avons donc opté pour la concentration la plus faible en MgCl₂ de 5 mM (Tableau 4), privilégiant ainsi la linéarité de la quantification au détriment de son efficacité.

Tableau 4 : Evolution de l'efficacité (E), du coefficient de régression (r^2) et du cycle threshold de la limite de quantification (Ct max) en fonction de la concentration en MgCl₂ sur une gamme d'ADN de *M. chelonae ssp. chelonae* ATCC 35752.

[MgCl ₂] (mM)	5	6	7	8
E (%)	76.26	77.12	99.74	0
r^2 (%)	99.43	96.13	86.70	ND
Ct max	39.02 ± 0.57	39.00 ± 0.77	38.38±0.40	0

- Comparaison des méthodes de qPCR

Pour les trois méthodes de qPCR comparées, l'efficacité a été estimée aux alentours de 75%, et le coefficient de régression linéaire au alentour de 98% (Tableau 5), ce qui rend ces méthodes applicables dans un objectif de quantification. Par ailleurs, la LIQ de la méthode A a été estimée environ 5 fois plus faible que la LIQ des méthodes B et C pour 0.1 unités de ΔRn .

Tableau 5 : Comparaison de l'efficacité (E), du coefficient de corrélation (r^2), de la limite inférieure de quantification (LIQ) et du cycle threshold (Ct max) des méthodes de quantification du genre *Mycobacterium* par qPCR.

Facteur ^a	Méthodes qPCR		
	A	B	C
E moyenne (%)	74.26±1.74	74.40±3.32	74.19±1.95
r^2 moyen (régression linéaire)	98.60±0.16	98.81±0.01	98.34±0.93
gamme LIQ ^b]346; 1731] fg]69; 346] fg]69; 346] fg
]79; 393] GE]16; 79] GE]16; 79] GE
Ct max ^c	38.43±0.16	35.00±1.54	38.19±1.37

^a La déviation standard est estimée avec 3 séries de dilutions indépendantes réalisées chacune en triplicata. ^b Les gammes de LIQ correspondent aux gammes de détection des 9 essais (3 essais pour chacune des 3 séries de dilutions indépendantes) et les unités sont exprimées en fentogramme (fg) et en équivalent génome (EG) de *M. chelonae* spp. *chelonae* ATCC 35752T. ^c Le Ct max correspond au cycle threshold moyen \pm la déviation standard sur les 9 essais.

A contrario des méthodes B et C qui ont détecté l'ensemble des mycobactéries testées (Tableau 6), la spécificité de la méthode A a été estimée à 77%, en raison de 7 espèces de mycobactéries indétectables sur 30 espèces testées. Par opposition, la méthode A s'est avérée totalement spécifique contrairement aux méthodes B et C dont les spécificités ont été évaluées à 44 et 91% respectivement, en raison de 13 et 2 genres non mycobactériens détectables sur 24 testés respectivement (i.e. faux positifs) (Tableau 6).

Tableau 6 : Sensibilité et spécificité des méthodes de quantification du genre *Mycobacterium* par qPCR.

Method a	Nombre d'espèce de <i>Mycobacterium</i> détectées au dessus de la LIQ (30 espèces testées)	Nombre de genres non mycobactériens détectés au dessus de la LIQ (24 genres testés)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
A	23	0	77	100
B	30	13	100	44
C	30	2	100	91

^a Méthode A: chimie TaqMan® utilisant les amorces 110F et I571R et la sonde H19R [18]; méthode B: chimie SyberGreen® utilisant les amorces pMyc14 et pMyc7 [20]; méthode C: chimie TaqMan® utilisant les amorces 65darf2 et 65darf3 et la sonde Dabcyl [21]. ^b LIQ: Limite inférieure de quantification.

2.2.3 Discussion

- Limite de quantification

Relativement au ΔRn de comparaison inter-méthodes (Tableau 5), la LIQ de la méthode A est apparue plus faible (environ 100 copies de génomes) que la LIQ des méthodes B et C (environ 10 copies de génomes). Néanmoins, ce ΔRn a été fixé à 0.1 unités pour comparer les méthodes A, B et C en elles, et pourrait donc être diminué pour améliorer la valeur absolue de la LIQ de la méthode A.

- Sensibilité

La sensibilité évaluée dans notre étude à 100% (Tableau 6) pour la méthode C décrite par Tobler *et al.* [21], est relative au choix des espèces de mycobactéries (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008). Effectivement, d'après son auteur cette méthode ne peut pas détecter les espèces *M. celatum*,

M. heckeshornense et *M. leprae* [21] qui n'ont pas été prises en compte dans notre étude. La spécificité de la méthode B ne serait donc pas aussi totale que ce que nous avons pu observer.

- Spécificité

La méthode B utilisée par Dutil *et al.* [20], a généré un grand nombre de faux positif ; l'ensemble des *Arthrobacter* sp. (4 souches), l'ensemble de *Micrococcus* sp. (5 souches), l'ensemble des *Rhodococcus* sp. (4 souches), l'ensemble des *Corynebacterium* sp. (3 souches), l'ensemble des *Nocardia* sp. (3 souches), les seuls représentants des genres *Kocuria*, *Solibacillus*, *Leucobacter* et *Streptomyces*, concernant le phylum Actinobacteria, mais aussi les genres *Bacillus* (2 souches sur 4), *Staphylococcus* (2 souches sur 4), *Serratia* (1 souche sur 1), et *Helicobacter* (1 souche sur 1) concernant les genres non phylogénétiquement apparentés aux Actinobacteria.

Dans l'article de Dutil, la spécificité des ces amorces avait été contrôlée par PCR conventionnelle (Veillette *et al.* [55]) en utilisant uniquement *Pseudomonas* ATCC 27853, *Escherichia* ATCC 35219 et *Staphylococcus* ATCC 25923. La faible spécificité de la qPCR basée sur les amorces pMyc7 et pMyc14, pourrait s'expliquer par l'origine du design des ces dernières. Effectivement, en accord avec nos résultats, Kox *et al.* qui ont dessiné ces amorces dans un objectif d'identification d'espèces de mycobactéries par hybridations croisées inversée, avait aussi observé des détections des genres *Corynebacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus* par PCR conventionnelle utilisant les amorces pMyc7 et pMyc14 [56].

La méthode C décrite par Tobler *et al.* [21], a détecté seulement 2 genres non mycobactériens sur les 24 genres testés. Plus précisément, cette méthode a détecté les 2 représentants du genre *Rhodococcus* de façon similaire au témoin positif (*M. chelonae* spp. *chelonae* ATCC 35752¹), et 2 représentants sur 4 du genre *Bacillus* en dessous de la LIQ. Ainsi, la méthode qPCR de Tobler *et al.* [21] semble utilisable sur des échantillons cliniques car les genres *Rhodococcus* de *Bacillus* sont rarement responsables de cas pathologiques, mais ne semble pas convenir à des échantillons d'eau de surface dans les lesquelles ont été isolés ces deux genres non mycobactériens (Tableau 10).

En conclusion, les comparaisons des méthodes de bactériologie nous ont permis de détecter différentes espèces de MNT potentiellement pathogènes dans l'eau de surface, mais ne nous a pas permis de les quantifier de façon reproductibles en raison de leur faible nombre et des microorganismes interférant leur culture (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008). Par ailleurs, en raison de sa spécificité totale, la méthode A de qPCR que nous avons développée est apparue applicable à des échantillons d'eau de surface contrairement aux deux autres méthodes de la littérature. En conséquence et dans l'objectif de déterminer les sources des MNT dans le bassin versant de la Seine, les MNT des campagnes de prélèvement réalisées en 2008 et 2009, et des campagnes qui vont être réalisées en 2010 seront analysées par la méthode que nous avons développée et caractérisée.

2 Campagnes d'échantillonnage 2009

Plusieurs campagnes de prélèvement ont été réalisées en 2008 et 2009, puis conservées à -20°C. En 2008, une campagne a consisté à suivre la nappe de déversement unitaire dans la Seine engendrée par l'orage du 07/08/08 (cf PIREN_Rapport_actionMNT2008). En 2009, il a été effectué une campagne de prélèvement sur les rejets unitaires dans la Marne le 05/10/09. A cette date, une série de prélèvements en temps sec et 10 séries de prélèvements en 36 heures de temps de pluie ont été réalisées dans la Marne (d'amont en aval : Tribardou, Chalifert, Thorigny, Gournay, Champigny, Charentonneau) et dans trois de ces affluents (d'amont en aval : la Beuvronne, la Gondoire, le Morbras).

3 Prévision 2010

Dans le but d'identifier les sources de MNT dans les bassins versants tels que la Seine, l'action de l'année 2010 portera sur l'application de la méthode A sur les échantillons prélevés en 2008 et en 2009. Des campagnes additionnelles sont prévues en Seine et Marne pour identifier les sources agricoles et piscicoles. Ces campagnes seront complétées par une étude sur le traitement des eaux usées à la station d'épuration de Seine Centre échantillonnée en 2008 dans le cadre du programme OPUR (collaboration avec le SIAAP), et par une étude des sources naturelles riches en acides

humiques sur la New River (Virginia, USA) dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. J. Falkinham (University VirginiaTech).

3.1 Campagnes de prélèvement à compléter

Suite à des discussions dans le cadre de deux comités thèse (09/02/09 et 11/01/10), il a été choisi d'annuler les campagnes des prélèvements en prévision sur les rejets de stations d'épuration et les rejets hospitaliers (cf. PIREN_Rapport_actionMNT2008), et de focaliser les prélèvements sur des rejets dans le milieu récepteur n'ayant pas encore été pris en compte. Ainsi, pour compléter les prélèvements déjà en notre possession, des campagnes de prélèvement seront effectuées sur des rejets de pisciculture et les rejets d'élevage animal, afin de déterminer la ou les sources majeures de MNT dans le bassin versant de la Seine.

3.2 Identification des sources de MNT

L'ADN des MNT provenant des différents échantillons collectés sur le bassin versant de la Seine et aux Etats-Unis, sera quantifié par la méthode A en vue d'évaluer les sources de MNT et d'identifier les ordres de grandeur potentiels de chaque source : eau brute type (Seine-Centre), élevage-pisciculture (en Marne), forestier-marécageux (Virginia, USA), rejets urbains de temps de pluie (campagnes de temps de pluie de Clichy et en Marne). La thèse sera finalisée et défendue, les résultats seront valorisés dans des journaux scientifiques et techniques nationaux et internationaux, ainsi que dans des congrès nationaux et un congrès international.

Références bibliographiques

1. Primm, T., C.A. Lucero, and J.O. Falkinham, *Health impacts of environmental mycobacteria*. Clinical Microbiology Reviews, 2004. **17**(1): p. 98-106.
2. Falkinham, J.O., *The changing pattern of nontuberculous mycobacterial disease*. Canadian Journal of Infectious Diseases, 2003. **14**(5): p. 281-286.
3. Falkinham, J.O., *Mycobacterial aerosols and respiratory disease*. Emerging Infectious Diseases, 2003. **9**(7): p. 763-7.
4. Lindeboom, J.A., J.M. Prins, S. Bruijnesteijn van Coppenraet, R. Lindeboom, and E.J. Kuijper, *Cervicofacial lymphadenitis in children caused by Mycobacterium haemophilum*. Clinical Infectious Diseases, 2005. **41**(1): p. 1569-1575.
5. Falkinham, J.O., G. Nichols, J. Bartram, A. Dufour, and F. Portaels, *Natural ecology and survival in water of mycobacteria of potential public health significance*, in *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*, S. Pedley, et al., Editors. 2004, IWA Publishing: London. p. 15-25.
6. Vaerewijck, M.J.M., G. Huys, J.C. Palomino, J. Swings, and F. Portaels, *Mycobacteria in drinking water distribution systems; ecology and significance for human health*. FEMS Microbiology Reviews, 2005. **29**(1): p. 911-934.
7. Bland, C.S., J.M. Ireland, E. Lozano, M.E. Alvarez, and T.P. Primm, *Mycobacterial ecology of the Rio Grande*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(10): p. 5719-5727.
8. Zhang, Q., R. Kennon, M.A. Koza, K. Hulten, and J.E. Clarridge, *Pseudoepidemic due to a unique strain of Mycobacterium szulgai: genotypic, phenotypic, and epidemiological analysis*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(4): p. 1134-1139.
9. Heckert, R.A., S. Elankumaran, A. Milani, and A. Baya, *Detection of a new Mycobacterium species in wild striped bass in the Chesapeake Bay*. Journal of Clinical Microbiology, 2001. **39**(2): p. 710-715.
10. Marsollier, L., T. Stinear, J. Aubry, J.P. St. André, R. Robert, P. Legras, A.L. Manceau, C. Audrain, S. Bourdon, H. Kouakou, and B. Carbonnelle, *Aquatic plants stimulate the growth of and biofilm formation by Mycobacterium ulcerans in axenic culture and harbor these bacteria in the environment*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(2): p. 1097-1103.
11. Steinert, M., K.A. Birkness, E.H. White, B. Fields, and F. Quinn, *Mycobacterium avium bacilli grow saprozoically in coculture with Acanthamoeba polyphaga and survive within cyst walls*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(6): p. 2256-2261.
12. Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe, *Prokaryotes: The unseen majority*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998. **95**(12): p. 6578-6583.
13. Blaise, C.R. and J.B. Armstrong, *Lipolytic bacteria in the Ottawa river*. Applied Microbiology, 1973. **26**(5): p. 733-740.
14. Donovan, E.P., D.F. Staskal, K.M. Unice, J.D. Roberts, L.C. Haws, B.L. Finley, and M.A. Harris, *Risk of gastrointestinal disease associated with exposure to pathogens in the sediments of the Lower Passaic River*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. **74**(4): p. 1004-1018.
15. Kenzaka, T., N. Yamaguchi, K. Tani, and M. Nasu, *rRNA-targeted fluorescent in situ hybridization analysis of bacterial community structure in river water*. Microbiology, 1998. **144**(1): p. 2085-2093.
16. Lünsdorf, H., I. Brümmer, K.N. Timmis, and I. Wagner-Döbler, *Metal selectivity of in situ microcolonies in biofilms of the Elbe river*. Journal of Bacteriology, 1997. **179**(1): p. 31-40.
17. Sekiguchi, H., M. Watanabe, T. Nakahara, B. Xu, and H. Uchiyama, *Succession of bacterial community structure along the Changjiang River determined by denaturing gradient gel electrophoresis and clone library analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. **68**(10): p. 5142-5150.

18. Garcia-Quintanilla, A., J. Gonzalez-Martin, G. Tudo, M. Espasa, and M.T. Jiménez de Anta, *Simultaneous identification of Mycobacterium genus and Mycobacterium tuberculosis complex in clinical samples by 5'-exonuclease fluorogenic PCR*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(12): p. 4646-4651.
19. Garcia-Quintanilla, A., L. Garcia, G. Tudo, M. Navarro, J. Gonzalez, and M.T. Jiménez de Anta, *Single-Tube Balanced Heminested PCR for Detecting Mycobacterium tuberculosis in Smear-Negative Samples*. Journal of Clinical Microbiology, 2000. **38**(3): p. 1166-1169.
20. Dutil, S., M. Veillette, A. Mériaux, L. Lazure, J. Barbeau, and C. Duchaine, *Aerosolization of mycobacteria and legionellae during dental treatment: low exposure despite dental unit contamination*. Environmental Microbiology, 2007. **9**(11): p. 2836-2843.
21. Tobler, N.E., M. Pfunder, K. Herzog, J.E. Frey, and M. Altwegg, *Rapid detection and species identification of Mycobacterium spp. using real-time PCR and DNA-Microarray*. Journal of Microbiological Methods, 2006. **66**(1): p. 116-124.
22. Caroli, G., E. Levre, G. Armani, S. Biffi-Gentili, and G. Molinari, *Search for acid-fast bacilli in bottled mineral waters*. Journal of Applied Bacteriology, 1985. **58**(1): p. 461-464.
23. Petroff, S.A., *A new and rapid method for the isolation and cultivation of the tubercle bacillus directly from sputum and feces*. Journal of Experimental Medecine, 1915. **XXI**: p. 38.
24. Tacquet, A. and F. Tison, *Nouvelle technique d'isolement des mycobactéries par le lauryl sulfate de sodium*. Annales de l Institut Pasteur, 1961. **100**: p. 676-680.
25. Kubica, G.P., A.J. Kaufmann, and W.E. Dye, *Comments on the use of the new mucolytic agent, N-acetyl-L-cysteine, as a sputum digestant for the isolation of mycobacteria*. American Review of Respiratory Diseases 1964. **87**(1): p. 775-779.
26. Whittier, S., R.L. Hopfer, M.R. Knowles, and P.H. Gilligan, *Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis*. Journal of Clinical Microbiology, 1993. **31**(4): p. 861-864.
27. Neumann, M., R. Schulze-Robbecke, C. Hagenau, and K. Behringer, *Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(2): p. 547-552.
28. Collins, M.T., K.B. Kenefick, D.C. Sockett, R.S. Lambrecht, J. McDonald, and J.B. Jorgensen, *Enhanced radiometric detection of Mycobacterium paratuberculosis by using filter-concentrated bovine fecal specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 1990. **28**(11): p. 2514-2519.
29. Stager, C.E., J.P. Libonati, S.H. Siddiqi, J.R. Davis, N.M. Hooper, J.F. Baker, and M.E. Carter, *Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification*. Journal of Clinical Microbiology, 1991. **29**(1): p. 154-157.
30. Amaro, A., E. Duarte, A. Amado, H. Ferronha, and A. Botelho, *Comparison of three DNA extraction methods for Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium*. Letters in Applied Microbiology, 2008. **47**(1): p. 8-11.
31. Honore, S., J.P. Vincensini, L. Hocqueloux, M.E. Noguera, D. Farge, P. Lagrange, and J.L. Herrmann, *Diagnostic value of a nested polymerase chain reaction assay on peripheral blood mononuclear cells from patients with pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis*. International Journal of Lung Disease, 2001. **5**(8): p. 754-762.
32. Kafwabulula, M., K. Ahmed, T. Nagatake, J. Gotoh, S. Mitarai, K. Oizumi, and A. Zumla, *Evaluation of PCR-based methods for the diagnosis of tuberculosis by identification of mycobacterial DNA in urine samples*. international Journal of Lung Disease, 2002. **6**(8): p. 732-737.
33. Mondragón-Barreto, M., C.A. Vázquez-Chacón, C. Barrón-Rivero, P. Acosta-Blanco, K.C. Jost, S. Balandrano, and M.H. Olivera-Díaz, *Comparison among three methods for mycobacteria identification*. Salud Pública de México, 2000. **42**(6): p. 484-489.
34. van Soolingen, D., P.W.M. Hermans, P.E.W. de Haas, D.R. Soll, and J.D.A. van Embden, *Occurrence and Stability of Insertion Sequences in Mycobacterium tuberculosis Complex*

- Strains: Evaluation of an Insertion Sequence-Dependent DNA Polymorphism as a Tool in the Epidemiology of Tuberculosis.* Journal of Clinical Microbiology, 1991. **29**(11): p. 2578-2586.
35. Swango, K.L., M.D. Timken, M.D. Chong, and M.R. Buoncristiani, *A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples.* Forensic Science International, 2006. **158**(1): p. 14-26.
 36. Fogel, G.B., C.R. Collins, J. Li, and C.F. Brunk, *Prokaryotic genome size and SSU rDNA copy number: Estimation of microbial relative abundance from a mixed population.* Microbial Ecology, 1999. **38**(2): p. 93-113.
 37. Vanitha, J.D., R. Venkatasubramani, K. Dharmalingam, and C.N. Paramasivan, *Large-Restriction-Fragment Polymorphism analysis of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium terrae isolates.* Applied and Environmental Microbiology, 2003. **60**(7): p. 4337-4341.
 38. Imaeda, T., G. Broslawski, and S. Imaeda, *Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1988. **38**(2): p. 151-156.
 39. del Carmen Menéndez, M., M.J. Rebollo, M. del Carmen Nunez, R.A. Cox, and M. Jesus Garcia, *Analysis of the precursor rRNA fractions of rapidly growing mycobacteria: Quantification by methods that include the use of a promoter (rrnA P1) as a novel standard.* Journal of Bacteriology, 2005. **187**(2): p. 534-543.
 40. Ninet, B., M. Monod, S. Emler, J. Pawlowski, C. Metral, P. Rohner, R. Auckenthaler, and B. Hirschel, *Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain.* Journal of Clinical Microbiology, 1996. **34**(10): p. 2531-2536.
 41. Wallace, R.J., A. Meier, B.A. Brown, Y. Zhang, P. Sander, G.O. Onyi, and E.C. Böttger, *Genetic Basis for Clarithromycin Resistance among Isolates of Mycobacterium chelonae and Mycobacterium abscessus.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1996. **40**(7): p. 1676-1681.
 42. Wallace, R.J., B.A. Brown-Elliott, S.C. Ward, C.J. Crist, L.B. Mann, and R.W. Wilson, *Activities of Linezolid against Rapidly Growing Mycobacteria.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2001. **45**(3): p. 764-767.
 43. Kim, H., S.H. Kim, T.S. Shim, M.n. Kim, G.H. Bai, Y.G. Park, S.H. Lee, G.T. Chae, C.Y. Cha, Y.H. Kook, and B.J. Kim, *Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65)* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005. **55**(4): p. 1649-1656.
 44. Kinoshita, S., S. Takayama, and S. Akita, *Taxonomical study of glutamic acid accumulating bacteria, Micrococcus glutamicus nov. sp.* Bulletin of the Agricol and Chemical Society of Japan 1958. **22**(1): p. 176-185.
 45. Skerman, V.B.D., V. McGowan, and P.H.A. NSneath, *Approved lists of bacterial names.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1980. **30**(1): p. 225-420.
 46. Cooke, J. and H. Keith, *A type of urea-splitting bacterium found in the human intestinal tract.* Journal of Bacteriology, 1927. **13**(5): p. 315-319.
 47. Marshall, B.J. and C.S. Goodwin, *Revised nomenclature of Campylobacter pyloridis.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1987. **37**(1): p. 68.
 48. Marshall, B.J., H. Royce, D.I. Annear, C.S. Goodwin, J.W. Pearman, J.R. Warren, and J.A. Armstrong, *Original isolation of Campylobacter pyloridis from human gastric mucosa.* Microbios Letters, 1984: p. 2583-2588.
 49. Goodwin, S., J.A. Armstrong, T. Chilvers, M. Petters, M.D. Collins, L. Sly, W. McConnell, and W.E.S. Harper, *Transfer of Campylobacter pylori and Campylobacter mustelae to Helicobacter gen. nov. as Helicobacter pylori comb. nov. and Helicobacter mustelae comb. nov., Respectively.* International Journal of Systematic Bacteriology, 1989. **39**(4): p. 397-405.

50. Albuquerque de Barros, E.V.S., G.P. Manfio, V. Ribeiro Maitan, L.A. Mendes Bataus, S.B. Kim, L.A. Maldonado, and M. Goodfellow, *Nocardia cerradoensis sp. nov., a novel isolate from Cerrado soil in Brazil* International Journal of Systematic Bacteriology, 2003. **53**(1): p. 29-33.
51. Euzéby, J., *Notification that new names and new combinations have appeared in volume 53, part 1, of the IJSEM*. International Journal of Systematic Bacteriology, 2003. **53**(3): p. 629-630.
52. Ishikawa, J., A. Yamashita, Y. Mikami, Y. Hoshino, H. Kurita, K. Hotta, T. Shiba, and M. Hattori, *The complete genomic sequence of Nocardia farcinica IFM 10152*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 2004. **101**(41): p. 14925-14930.
53. Maldonado, L., J.V. Hookey, A.C. Ward, and M. Goodfellow, *The Nocardia salmonicida clade, including descriptions of Nocardia cummidelens sp. nov., Nocardia fluminea sp. nov. and Nocardia soli sp. nov.* . Antonie van Leeuwenhoek, 2000. **78**(3-4): p. 367-377(11).
54. Anonymous, *Validation list N°82: Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM*. International Journal of Systematic Bacteriology, 2001. **51**(5): p. 1619-1620.
55. Veillette, M., P.S. Thorne, T. Gordon, and C. Duchaine, *Six Month Tracking of Microbial Growth in a Metalworking Fluid After System Cleaning and Recharging*. Annals of Occupational Hygiene, 2004. **48**(6): p. 541-546.
56. Kox, L.F.F., J. van Leeuwen, S. Knijper, H.M. Jansen, and A.H.J. Kolk, *PCR Assay Based on DNA Coding for 16S rRNA for Detection and Identification of Mycobacteria in Clinical Samples*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. **33**(12): p. 3225-3233.