

NVMM RICHTLIJN

MYCOBACTERIËLE LABORATORIUMDIAGNOSTIEK

1 November 2006

Inhoudsopgave:

Voorwoord	5
Samenstelling werkgroep	6
Termen en afkortingen	7
1. Inleiding	8
1.1. Algemene inleiding	8
1.2. Richtlijnontwikkeling en werkwijze werkgroep	11
1.3. Indeling van de literatuur naar de mate van bewijs	12
1.4. Doel	12
1.5. Doelgroep	12
1.6. Transport materialen buiten de ziekenhuislocatie	13
2. Patientenmaterialen	14
2.1. Respiratoir patiëntenmateriaal	
2.1.1. Afname	17
2.1.2. Transport	17
2.1.3. Voorbewerking	18
2.1.4. Uitvoering van de 2%Nalc-2%NaOH methode	19
2.1.5. Kleuring	20
2.1.5.1. Inleiding	20
2.1.5.2. Interpretatie van de resultaten van zuurvaste kleuringen	21
2.1.5.3. Schaal volgens Bronkhorst	21
2.1.6. Kweek	22
2.1.7. Moleculaire detectie	26
2.2. Pleuravocht	29
2.2.1. Inleiding	29
2.2.1.1. Specifieke diagnostiek	29
2.2.2. Afname en transport	29
2.2.3. Kleuring	30
2.2.4. Kweek	30
2.2.5. Moleculaire detectie	30
2.3. Pleurabiopt	30
2.3.1. Inleiding	30
2.3.2. Afname	30
2.3.3. kleuring	31
2.3.4. Kweek	31
2.3.5. Moleculaire detectie	31
2.4. Lymfeklieren	32

2.4.1.	Inleiding	32
2.4.2.	Afname	32
2.4.3.	Transport	32
2.4.4.	Moleculaire detectie	33
2.5.	Maaginhoud	33
2.5.1.	Inleiding	33
2.5.2.	Afname	34
2.5.3.	Transport	34
2.5.4.	Kleuring	34
2.5.5.	Moleculaire detectie	34
2.6.	Pericardvocht	34
2.6.1.	Inleiding	34
2.6.2.	Moleculaire detectie	34
2.7.	Peritoneum	35
2.7.1.	Inleiding	35
2.7.2.	Afname	35
2.8.	Darmmateriaal	35
2.8.1.	Inleiding	35
2.9.	Urine	36
2.9.1.	Inleiding	36
2.9.2.	Urine onderzoek	36
2.9.3.	Afname	36
2.9.4.	Transport	36
2.9.5.	Kleuring	36
2.9.6.	Kweek	37
2.9.7.	Moleculaire detectie	37
2.10.	Tuberculose van meningen en het centrale zenuwstelsel	37
2.10.1.	Inleiding	37
2.10.2.	Afname	38
2.10.3.	Transport	38
2.10.4.	Kleuring	39
2.10.5.	Kweek	39
2.10.6.	Moleculaire detectie	39
2.11.	Miliaire en gedissemineerde tuberculose	40
2.11.1.	Inleiding	40
2.11.2.	Afname	40
2.11.3.	Transport	41
2.11.4.	Kleuring	41
2.11.5.	Kweek	41
2.11.6.	Moleculaire detectie	41

2.12.	Formaline gefixeerd materiaal	42
3.	Identificatie van isolaten	42
4.	Gevoeligheidsbepalingen	43
4.1.	Fenotypische gevoeligheidsbepalingen	43
4.2.	Genotypische gevoeligheidsbepalingen	43
5.	Laboratorium kruiscontaminaties	45
6.	Kwaliteitscontrole	45
7.	Veiligheidseisen	46
8.	Taakverdeling tuberculose laboratoriumdiagnostiek	46
9.	Communicatie tussen behandelaar, laboratorium en GGD	48
10.	Implementatie en geldigheidsduur	49
11.	Literatuur	51
12.	Lijst van aanbevelingen	65
Bijlage I : Voorbeeld convenant		69
Bijlage II: (Multi)-resistentie tegen tuberculostatica		71

Voorwoord

Vanuit de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) is het initiatief genomen om tot richtlijnen te komen voor de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose. De Orde van Medische Specialisten coördineert het vervaardigen van dergelijke richtlijnen. Deze richtlijn is mede tot stand gekomen door het programma Evidence-Based Richtlijn Ontwikkeling (EBRO) van de Orde van Medisch Specialisten in het kader van de meerjaren afspraken (1998) Curatieve Somatische Zorg met het ministerie van VWS dat voor het EBRO-programma de financiële middelen ter beschikking stelt. Vanuit de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie is een multidisciplinaire werkgroep Richtlijnontwikkeling samengesteld onder voorzitterschap van dr. F.Vlaspolder, arts-microbioloog.

Voor een belangrijk deel zullen met name longartsen, GGD-artsen tuberculose-bestrijding en internisten-infectioloog geconfronteerd worden met resultaten van tuberculosediagnostiek. Voor andere klinische disciplines zal dat beduidend minder zijn.

Vandaar er gekozen is voor afgevaardigden uit de Nederlandse Vereniging Artsen Longziekten en Tuberculose (NVALT), Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot bestrijding der Tuberculose KNCV-Tuberculosefonds, Nederlandse Internisten Vereniging NIV en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)

Bij het uitnodigen van de (artsen)-microbioloog in de werkgroep is het uitgangspunt geweest om een optelsom van kennis binnen verschillende aspecten van de laboratoriumdiagnostiek voor tuberculose te verkrijgen.

De eerste vergadering van de werkgroep vond plaats op 5 april 2000, daarna volgen er 24 in getal tot het moment van aanbieden aan de commissie kwaliteit van de NVMM op 8 februari 2005. Naar aanleiding van het geleverde commentaar uit het veld is de werkgroep 3 maal bijeen geweest om tot een concept richtlijn te komen.

Tijdens de voorjaarsvergadering van de NVMM, april 2006 is de richtlijn aan de orde geweest en besloten om de NVMM leden nogmaals de werkgroep van commentaar te voorzien. Ook van dit commentaar is dankbaar gebruik gemaakt. Voorts is gevraagd aan telkens twee leden verbonden aan de NIV, NVALT en KNCV Tuberculosefonds mee te lezen. Hun commentaar was vooral gericht op de leesbaarheid van de voorliggende concept richtlijn. Alle participanten danken wij hartelijk voor hun geleverd commentaar.

De werkgroepleden hebben onafhankelijk gehandeld en waren gemandateerd door hun vereniging.

Samenstelling van de werkgroep

Dr. A.G.M. Buiting, arts-microbioloog

Mevrouw. J.M. van Duin, arts-microbioloog, secretaris

De heer P.J.H.J. van Gerven, arts-consulent tuberculosebestrijding, namens KNCV Tuberculosefonds

Dr. E. J. Kuijper arts-microbioloog

Mevrouw. dr. C.S.B.Lambregts-van Weezenbeek, arts-consulent. tuberculosebestrijding, namens KNCV Tuberculosefonds

De heer W.C.M. de Lange, longarts namens de NVALT

Dr. D. van Soolingen, medisch microbiologisch onderzoeker, Afdeling Mycobacteriën onderdeel van het Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en Screening (LIS), RIVM

Dr. C. Richter, internist-infectioloog, namens de NIV

Dr. F. Vlaspolder, arts-microbioloog, voorzitter

Dr. A.G.M. van der Zanden, medisch microbiologisch onderzoeker.

TERMEN EN AFKORTINGEN

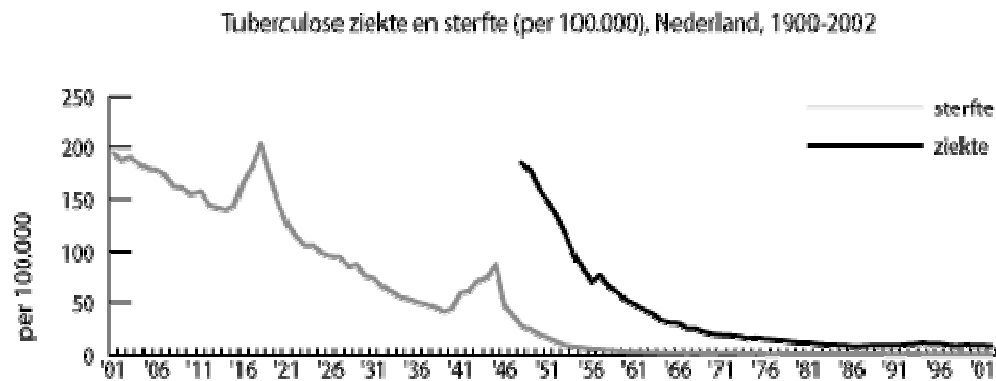
ADR	European Agreement Concerning the International Carriage of Dangerous Goods by Road
ASM	American Society for Microbiology
BSL-3	Biosafety Level-3
CDC	Centres for Disease control
CSF	Cerebrospinal Fluid
FNA	Fine Needle Aspiration
ICAO puncture test	international civil aviation organisation puncture test, dus van toepassing bij de burgerluchtvaart, die uiteraard eisen stelt. Bij de puncture test laat men een metalen staaf van bepaalde afmetingen van een bepaalde hoogte op de verpakking vallen. Die mag dan niet zodanig beschadigd worden dat de inhoud gaat lekken.
IUATLD	International Union against Tuberculosis and Lung Diseases
KNCV Tuberculosefonds	Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot bestrijding der Tuberculose
LKC	Laboratorium Kruis Contaminatie
MDR	Multidrug resistentie. Multi-resistentie is resistentie tegen tenminste INH en Rifampicine
MIRU/VNTR typing	Mycobacteria Interspersed Repetitive Unit/ Variable Number of Tandem Repeat
MOTT	Mycobacteria Other Than Tuberculosis (Atypische Mycobacteriën)
NAT	Nucleic Acid Amplification Technique
NALC	N-Acetyl-L-Cysteine
NVALT	Nederlandse Vereniging Artsen Longziekten en Tuberculose
NIV	Nederlandse Internisten Vereniging
NVMM	Nederlandse Vereniging Voor Medische Microbiologie
P650	Packaging Instruction 650
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
TPG	TPG Post

1. Inleiding

I

1.1. Algemene inleiding

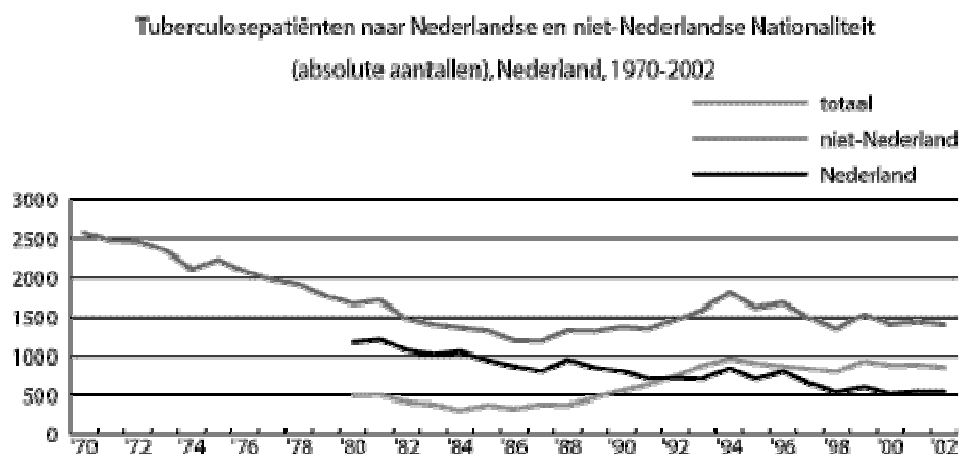
Nederland is een land met een lage tuberculoseprevalentie, waarin zich incidenteel grote outbreaks voordoen. Met een incidentie van vijf gevallen van actieve tuberculose per 100.000 autochtone inwoners is inmiddels de eliminatiefase bereikt. Deze lage prevalentie heeft tot gevolg dat de expertise en ervaring bij de betrokken beroepsgroepen en laboratoria afneemt, hetgeen zal leiden tot diagnostische vertraging, inadequate infectiepreventie, verkeerde behandeladviezen, nosocomiale infecties en foutpositieve en -negatieve resultaten van mycobacteriologisch onderzoek.



Bron: NTR, KNCV Tuberculosefonds

De epidemiologie van tuberculose wordt beïnvloed door de fluctuerende instroom van immigranten uit landen met een hoge tuberculoseprevalentie. Sinds 1991 is meer dan de helft van alle tuberculosepatiënten in Nederland van buitenlandse oorsprong. Omdat een aantal van de tuberculose patiënten uit landen afkomstig is waar ook HIV-infecties endemisch zijn, worden in toenemende mate tuberculose-HIV co-infecties gevonden. Mondiaal is er sprake van een verontrustende situatie, daar er zowel op het Afrikaanse als het Aziatische continent, alsmede in Oost-Europa, een explosieve groei van het aantal ziektegevallen wordt waargenomen.

De beheersbaarheid van de tuberculosesituatie wordt vooral bedreigd door een toename van (multi)resistentie, ook in Europa. Verspreiding van (multi)resistente *M.tuberculosis* stammen naar laag prevalentie landen is een realiteit. Zo kan de hoge prevalentie van multiresistente *M. tuberculosis* stammen in Oost-Europa een bedreiging vormen voor Nederland.



Bron: NTR, KNCV Tuberculosefond

Tuberculose wordt meestal veroorzaakt door *Mycobacterium tuberculosis*, één van de subspecies van het *M. tuberculosis* complex. Het complex is genetisch gezien zeer sterk geconserveerd, maar met de huidige moleculaire technieken kunnen de subspecies op efficiënte en betrouwbare wijze geïdentificeerd worden. Andere subspecies binnen het complex, die minder vaak gevonden worden in Nederland zijn *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis caprae*, *M. canetti* en *M. microti*. Het is vooral vanwege de verschillen in de epidemiologie van de bacteriën van de diverse subspecies dat een onderscheid van belang is. *M. bovis* veroorzaakt voornamelijk endogene reactivaties bij oudere Nederlanders, maar wordt ook bij jongere allochtonen nog wel gevonden. *M. bovis* BCG, de geattenueerde variant van *M. bovis* die gebruikt wordt voor vaccinaties en behandeling van o.a. blaascarcinomen, wordt in Nederland ook regelmatig geïsoleerd. Bij jonge patiënten betreft het vrijwel altijd complicaties na vaccinatie. Bij ouderen is isolatie van *M. bovis* BCG meestal geassocieerd met behandeling van blaascarcinomen. Recentelijk werd waargenomen dat BCG-bacteriën bereid met de Deense vaccinstam (ook gebruikt in Nederland voor vaccinatie) een intermediaire INH resistentie hebben. De Commissie Praktische Tuberculosebestrijding heeft naar aanleiding hiervan de aanbeveling voor behandeling van BCG-complicaties aangepast. (persoonlijke mededeling D. van Soolingen). In de afgelopen jaren werden ook nosocomiale infecties van *M. bovis* BCG waargenomen. Isolatie van *M. canetti* is bijna altijd te herleiden naar bronnen in de hoorn van Afrika (Djibouti en Somalië). *M. microti* infecties zijn vrijwel altijd geassocieerd met transmissie vanuit knaagdieren. De meeste *M. tuberculosis* complex bacteriën hebben eenzelfde gevoeligheid voor tuberculostatica, met uitzondering van *M. bovis* en de *M. bovis* BCG die resistent zijn tegen pyrazinamide.

Naast *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteriën, zijn er een aantal atypische mycobacteriën die als ziekteverwekker relevant zijn. Een deel van deze bacteriën kan infecties veroorzaken die een ziektebeeld oproepen dat gelijk is aan dat van tuberculose.

Het verrichten van goede laboratoriumdiagnostiek levert een belangrijke bijdrage in de bestrijding en behandeling van tuberculose. Met behulp van moleculaire technieken is het mogelijk aanzienlijk sneller mycobacteriën aan te tonen dan met conventionele methoden. De moleculaire technieken zullen vooral de doorlooptijd in het laboratorium bekorten. De meeste DNA- of RNA-amplificatietechnieken voor *Mycobacterium tuberculosis* zijn ontwikkeld voor toepassing op sputum of op via bronchoscopie verkregen materiaal. Hoewel er ook een behoefte bestaat om extrapulmonale tuberculose snel te diagnosticeren (meningitis, pericarditis, peritonitis, lymphadenitis etc.), zijn de commercieel verkrijgbare testen hiervoor niet ontwikkeld en niet gevalideerd. De diagnostiek en therapie van extrapulmonale tuberculose verdient volgens de werkgroep extra aandacht. In Nederland zijn in de periode 1993-2003 in totaal 16.386 patiënten met tuberculose gemeld, waarvan 33% alleen met een extrapulmonale vorm, 59% alleen pulmonaal en 8% pulmonaal en extrapulmonaal gelijktijdig (persoonlijke mededeling, N. Kalisvaart, KNCV Tuberculosefond).

Het stellen van de diagnose tuberculose is dan ook vaak een combinatie van kliniek, epidemiologische achtergrond, histologische bevindingen zonder aanwijzingen voor een andere diagnose.

Moleculair-biologische technieken zijn van belang om van gekweekte isolaten of direct patiëntenmateriaal een identificatie te verkrijgen. Daarnaast bestaat de mogelijkheid voor een snelle bepaling van de gevoeligheid voor INH en rifampicine (in de nabije toekomst ook voor fluorochinolonen en pyrazinamide) bij verdenking op multiresistente tuberculose. Tenslotte spelen moleculair-biologische technieken voor typering van *M. tuberculosis* een belangrijke rol bij het bestuderen van de epidemiologie. In deze richtlijn wordt zoveel mogelijk rekening gehouden met de situatie in een modern medisch microbiologisch

laboratorium waar moleculaire technieken zoals NAT en hybridisatie mogelijk zijn. Met deze technieken is het mogelijk dat het laboratorium binnen 30 dagen na insturen van het patiëntenmateriaal een identificatie en resistentie-bepaling moet kunnen rapporteren. Voor typeringsonderzoek is er in Nederland een Nationaal Referentiecentrum op het RIVM waar alle microbiologische laboratoria de isolaten naar toe zenden voor epidemiologisch onderzoek.

Vanuit de commissie Kwaliteit van de NVMM is er een opdracht geformuleerd om te komen tot richtlijnen 'Mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek'. De richtlijnontwikkeling heeft de laatste jaren steeds meer een centrale plaats gekregen als het gaat om de medisch-technische aspecten van de kwaliteit van het medisch handelen. Richtlijnontwikkeling en implementatie is de verantwoordelijkheid van de wetenschappelijke verenigingen van erkende medische specialismen. In het bijzonder zullen zij daaraan vormgeven vanuit de commissie Kwaliteit of de werkgroep Richtlijnen van de wetenschappelijke vereniging.

In Nederland is het aan elk medisch microbiologisch laboratorium gegeven, eventueel mycobacteriële diagnostiek te verrichten. Een enquête die werd rondgestuurd in 2002 liet zien dat ruim 45 laboratoria (van de 78 microbiologische laboratoria) zich inderdaad bezig houden met mycobacteriële diagnostiek, die verder gaat dan de primaire microscopische diagnostiek alleen. De resultaten van de enquête over 2001 geven aan dat op jaarbasis tussen 100 tot 6000 kweken per laboratorium worden verricht; richtlijnen hiervoor ontbreken. Bestaande Europese en Nederlandse richtlijnen op het gebied van bioveiligheid (biosafety level 3) zijn veelal niet geïmplementeerd in deze laboratoria.

Het microscopisch onderzoek ten aanzien van kleuringen is zeer divers, evenals het in cultuur brengen van de mycobacteriën op vaste dan wel vloeibare media.

Gevoeligheidsbepalingen worden in ongeveer de helft van de ondervraagde laboratoria verricht. Rondzendingen ter borging van de kwaliteit van resistentiebepalingen zijn in Europa alleen voor referentie-laboratoria gerealiseerd.

Ongeveer de helft van de ondervraagde laboratoria maakt gebruik van verschillende moleculaire technieken (commerciële/ in house methoden) als additionele methode om de detectie snelheid/gevoeligheid te verhogen. Hiervoor bestaan rondzendingen om de kwaliteit te toetsen.

Ook foutpositieve kweken zijn een realiteit. In Nederland is gebleken dat in de periode 1993-2000 2,4% van de *M. tuberculosis* kweken foutpositief was (27).

Daardoor zijn er patiënten onterecht behandeld. Een opmerkelijk feit uit het onderzoek was dat er meer foutpositieve kweken werden waargenomen in laboratoria met minder dan 3000 kweken per jaar (27). Overigens lijkt het aantal laboratorium kruiscontaminaties, wellicht mede door het terugkoppelen van DNA fingerprint analyses van het RIVM, te zijn afgenomen in de afgelopen jaren. (persoonlijke mededeling dr D. van Soolingen)

Het ontwikkelen van richtlijnen om de laboratoriumdiagnostiek om optimaal te laten verlopen lijkt op basis van bovenstaande gegevens dringend gewenst.

1.2. Richtlijnontwikkeling en werkwijze werkgroep

De afgelopen jaren werd veelal op basis van consensus een richtlijn opgesteld. Nu zal een werkgroep zich meer moeten verantwoorden voor haar uitspraken en aanbevelingen. De nadruk is meer komen te liggen op de wetenschappelijke onderbouwing (evidence-based), zodat de richtlijn transparanter is.

De werkgroep heeft gebruik gemaakt van meta-analyses, systematische reviews en van reeds bestaande internationale (IUATLD, ASM en CDC) richtlijnen. Voor literatuurzoekacties werd gebruik gemaakt van Medline, Pubmed en de database van het Cochrane Center. Na analyse van de literatuur zijn de gegevens ingedeeld naar de mate van bewijskracht (level of evidence). Hieruit volgen de conclusies en aanbevelingen.

De werkgroep heeft de volgende werkwijze gehanteerd. De te ontwerpen richtlijn werd ingedeeld in deelgebieden die overeenkomen met de hoofdstukken. Elk van deze deelgebieden werd door twee of meer leden van de werkgroep bestudeerd. Op elk deelgebied is literatuuronderzoek verricht, aanvankelijk door het bestuderen van de literatuur en al bestaande richtlijnen. Mocht dit niet voorhanden zijn geweest, zijn ervaringen en meningen van leden van de werkgroep meegenomen om te komen tot een aanbeveling.

1.3. Indeling van de literatuur naar de mate van bewijs

Diagnostische studies

- A1. Vergelijkend onderzoek naar de effecten van diagnostiek op klinische uitkomsten of onderzoek waarbij met behulp van besliskundige modellen of multivariate analyses de toegevoegde informatie wordt beoordeeld van de te onderzoeken test ten opzichte van een referentietest.

- A2. Vergelijkend onderzoek waarbij van tevoren criteria zijn gedefinieerd voor de te onderzoeken test en voor een referentietest, met een beschrijving van de onderzochte klinische populatie; bovendien moet het een voldoende grote serie van opeenvolgende patiënten betreffen, gebruik gemaakt zijn van tevoren gedefinieerde afkapwaarden van de test en de resultaten van de test en gouden standaard onafhankelijk zijn beoordeeld.
- B. Vergelijking met een referentietest, beschrijving van de onderzochte test en van de onderzochte populatie, maar niet de kenmerken die verder onder niveau A staan genoemd.
- C. Niet-vergelijkend onderzoek.
- D. Mening van deskundigen bijvoorbeeld werkgroepleden.

Niveau en formulering van conclusies en aanbevelingen.

- 1. Ondersteund door tenminste twee onafhankelijk van elkaar uitgevoerde studies van niveau A1 of A2 of een meta-analyse (A1).
- 2. Ondersteund door tenminste twee onafhankelijk van elkaar uitgevoerde onderzoeken van niveau B.
- 3. Niet ondersteund door voldoende onderzoek van niveau A of B.
- 4. Advies op grond van de mening van de werkgroepleden of van niveau D literatuur.

Richtlijnen zijn niet-bindende regels in tegenstelling tot voorschriften die dat wel zijn. Een richtlijn is een handelingsinstructie waarvan afgeweken mag/kan worden, mits men afwijkingen kan verantwoorden.

1.4. Doel

Het primaire doel van richtlijnen is kwaliteit van zorg. Daarvan afgeleide doelen van richtlijnen kunnen worden onderscheiden in zorginhoudelijke (kwaliteit, doeltreffendheid), organisatorische (afstemming, samenwerking) en financiële (doelmatigheid, bezuiniging). Deze richtlijn is een document met aanbevelingen en handelingsinstructies ter ondersteuning van de dagelijkse praktijkvoering. De richtlijn berust op resultaten van wetenschappelijk onderzoek en aansluitende meningsvorming van de werkgroep gericht op het uitvoeren van betrouwbare diagnostiek.

1.5. Doelgroep

Deze richtlijnen zijn bestemd voor diegenen verantwoordelijk voor de laboratoriumdiagnostiek van mycobacterien.

1.6. Transport materialen buiten de ziekenhuislocatie in Nederland

Per 1 januari 2004 is TPG Post akkoord gegaan met het vervoer van diagnostische monsters in een safety bag per brievenbuspost mits de verpakking voldoet aan:

- 1. verpakkingseis P 650.

2. de ICAO puncture test.

De verpakkingen worden op dit moment geleverd door; Minigrip BV, Carapack, en Transposage.

Onduidelijkheid bestaat over de interpretatie van de bepalingen in het ADR 2003 met betrekking tot het verzenden van "stammen" ("cultures"). Het Nederlandse Ministerie van Verkeer en Waterstaat zal naar alle waarschijnlijkheid een Canadees voorstel voor versoepeling van de tekst steunen waarna de gewijzigde tekst per 1 januari 2005 update.

Per 1 januari 2006 is de praktijkrichtlijn van kracht geworden.

Deze praktijkrichtlijn is opgesteld door een werkgroep met vertegenwoordigers van het Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, het Ministerie van Verkeer en Waterstaat, het Ministerie van Economische Zaken, het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, de Inspectie voor de Gezondheidszorg, de Inspectie Verkeer en Waterstaat, TPG Post, de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, de Nederlandse Vereniging voor Klinische Chemie en Laboratoriumgeneeskunde, Sanquin, het Leids Universitair Medisch Centrum, de Vereniging BVF-Platform en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM).

Deze praktijkrichtlijn is bedoeld om het omgaan met de regelgeving die van toepassing is op de verzending en het vervoer van biologische materialen bestemd voor humane of dierlijke diagnostiek te vergemakkelijken en tegelijkertijd de veiligheid in acht te nemen. De praktijkrichtlijn vervangt deze regelgeving niet. De praktijkrichtlijn heeft betrekking op het verzenden van biologische materialen over de weg binnen Nederland, bestemd voor de diagnostiek en is geldig in ieder geval tot 1 januari 2009.

Deze praktijkrichtlijn is te vinden op de Web site van de NVMM onder het hoofd "Richtlijnen" doorklikken op "overige richtlijnen".

2. Patiëntenmaterialen

Gelet op het feit dat patiëntenmateriaal afkomstig vanuit de luchtwegen het meest voor TBC diagnostiek wordt aangeboden bespreken we onder de kop respiratoir patiëntenmateriaal de afname, transport, voorbereiding, kleuring en de interpretatie daarvan, kweek en de moleculaire detectie uitgebreider dan bij de andere materialen. Bij de andere patiëntenmaterialen wordt meer aandacht besteed aan de voor dat materiaal specifieke afname mogelijkheden en vereisten voor transport. Voor kleuring, kweek en moleculaire detectie wordt niet meer ingegaan op de techniek, maar juist de waarde van de technieken als het gaat om sensitiviteit en specificiteit.

Patiëntenmateriaal dat wordt aangeboden voor mycobacteriële diagnostiek kan van velerlei aard en van alle weefsels en organen afkomstig zijn. Het merendeel is echter respiratoir van oorsprong. Het verkregen patiëntenmateriaal dient aan een aantal criteria te voldoen.

- Patiëntenmateriaal dat onderzocht wordt met het oog op het stellen van de diagnose en bepaling van de initiële gevoeligheid van de mycobacteriën, dient indien mogelijk vóór het begin van de therapie afgenomen te worden.
- Het materiaal dient op aseptische wijze in steriele containers te worden opgevangen om de kans op contaminatie met o.a. saprofytaire mycobacteriën maar ook andere micro-organismen tot een minimum te beperken.
- Wattenstokken zijn niet geschikt voor isolatie van mycobacteriën, vanwege de geringe hoeveelheid patiëntenmateriaal en het indrogen daarvan.
- De opbrengst neemt toe als van sommige patiëntenmaterialen (zoals sputum) meerdere monsters worden aangeboden voor diagnostiek.

Materiaal soort	Methode	Hoeveelheid	Commentaar
Expectoratie van sputum	Ochtend sputum	5-10 ml	Het samenvoegen van meerdere ochtend sputa wordt niet aanbevolen ochtendsputa op 3 achtereenvolgende dagen strekt nog steeds tot aanbeveling (zowel voor kweek als voor NATs)
Inductie van sputum	Vernevelen 5-10% fys. zout	5-10 ml	
Bronchoscopie vocht	BAL, Bronchus secreet, protected BAL	5-10 ml	Expectoratie van sputum 1-2 dagen na BAL kan waardevol zijn
Alternatieven voor sputumonderzoek zijn Dunne darm inhoud en maagsap			
Dunne darm inhoud	Stringtest	1-2 ml	Beschreven als alternatief voor maagsaponderzoek bij HIV-seropositieve patiënten (245)
maagsap	Nuchtere maaginhoud	Ongeveer 20 ml met hevelen van fysiologisch zout verkregen	In speciale buffer of snel naar het laboratorium brengen
Feces		1-2 gram	Alleen zinvol bij intestinale tbc (253)
Urine	Gewassen ochtend urine	2 x herhalen > 15 ml	
Bloed beenmerg	bloed centrifugeren, sediment verwerken of opvangen in een voor dit doel geschikt systeem	10-20 ml	bloed opvangen in medium met anticoagulans (heparine*, SPS of citraat) of direct afnemen in een commercieel flesje
Liquor	punctie	Tenminste 5 ml	Opbrengst neemt toe bij herhaald liquoronderzoek
Pericardvocht **	punctie	5 –20 ml	Bedside beenting of transport in heparine.*
Gewrichtsvocht**	punctie	5 –20 ml	Kweken van synovia biopten hebben grotere opbrengst dan synoviaalvocht (248)
Peritoneaalvocht**	punctie	5 - 20 ml	De werkgroep raadt aan ascites ook bedside te beënten
Pleuravocht		5 - 20 ml	Bedside beenting of transport in heparine.* Pleura biopten geven een beter resultaat dan pleuravocht
Andere exsudaten	aspiratie	3 - 5 ml	Geen wattenstokken
Weefsel paraffinecoupes	Kan worden aangeboden voor moleculaire technieken		Het is aan te bevelen dat er duidelijk afspraken gemaakt worden tussen de afdelingen Medische microbiologie en Pathologie over de aanlevering van patiëntenmaterialen.
Sinus materiaal	Naald aspiratie, biopsie		
Weefsel:	biopsie		CAVE: Ongefixeerd materiaal. Droog in steriele buis.
Lymfklieren	Dunne naald aspiratie (FNA), excisie biopsie		
Peritoneumbiopten	Gerichte biopsie		Biopten geven een beter resultaat dan ascites

- * Voor NAT geen heparine gebruiken
- ** Er zijn geen vergelijkende studies voorhanden waarin de kweekopbrengst in verschillende hoeveelheden lichaamsvloeistoffen met elkaar zijn vergeleken.

Veelal zullen in bovenstaande tabel genoemde op- en aanmerkingen bij afname en transport van patientenmateriaal opgenomen zijn in het voorschrift: "Instructies voor aanvragers"

De werkgroep heeft getracht aan de hand van literatuurgegevens de verschillende patientenmaterialen in de mogelijk vereiste hoeveelheid en conditie naar het laboratorium te vervoeren.

Gezien het geringe aantal gevallen van huidtuberculose van gemiddeld 19 (range 12-34) patienten/jaar wil de werkgroep aan dit onderwerp niet al te veel aandacht besteden. (NTR gegevens 1993-2004 Bron: KNCV-tuberculose fonds) Van belang is wel te vermelden dat de optimale incubatietemperatuur voor Mycobacteria uit de huid 30-33C bedraagt.

2.1. Respiratoir patiëntenmateriaal (sputum, bronchoalveolaire lavage, bronchussecreet)

2.1.1. Afname

Bij verdenking op longtuberculose wordt op drie tot vijf opeenvolgende dagen sputum, bij voorkeur 5 à 10 ml ochtendsputum, opgevangen in een potje met brede opening en goed sluitend deksel. Sputum moet vanuit de longen komen en de patiënt moet hiervoor geïnstrueerd worden hoe dit op te hoesten (1). Het verzamelen van sputum gedurende 24 uur wordt niet aanbevolen, omdat hierdoor de tijd voor transport en inzetten wordt vergroot evenals de kans op contaminatie met ander micro-organismen (2).

Bij een patiënt die geen sputum ophoest kan onderzoeksmateriaal verkregen worden door sputuminductie na toediening van een aërosol van een hypertoonische zoutoplossing (5% NaCl) of door het hevelen van nuchtere maaginhoud. Bij gebrek aan materiaal kan een fiberbronchoscopie met gerichte aspiratie of bronchiale lavage met 2 x 20 ml worden verricht. Voor welke afname-techniek wordt gekozen hangt ook af van de mogelijkheden (gehospitaliseerde of ambulante patiënt) en urgentie (vermoeden van MDR). Tijdens de opvang van patiëntenmateriaal moet erop worden toegezien dat de omgeving niet aan besmetting blootgesteld wordt. Alle patiëntenmonsters moeten van goede kwaliteit zijn en in voldoende kwantiteit aan het laboratorium aangeboden worden. In patiëntenmateriaal zijn tuberkelbacteriën meestal ongelijkmatig verdeeld en soms maar spaarzaam aanwezig (6).

2.1.2. Verzending van de patiëntenmonsters naar het laboratorium.

De patiëntenmonsters moeten zo snel mogelijk naar het laboratorium verzonden worden om overgroei door andere micro-organismen dan mycobacteriën te voorkomen. Wordt de kweek op een ander laboratorium uitgevoerd dan dient het materiaal binnen 24 uur (indien langer zie blz 17) op dat laboratorium aanwezig te zijn en dient tot verzending bewaard te worden bij 4°C (4).

Over de levensvatbaarheid van mycobacteriën in patiëntenmateriaal is niet veel bekend. In een laboratoriumstudie naar de bewaaromstandigheden van ZN-positieve sputa, bleek dat na 4 weken bewaren bij 4°C er nog 60% positief te zijn in de kweek. Bewaren bij kamertemperatuur leverde in 38% nog een positieve kweek op. De eerste duidelijke veranderingen in opbrengst van kweek werden na 2 weken zichtbaar, ook voor bij 4°C bewaard materiaal. De resultaten van de ZN-kleuring werden niet beïnvloed door de bewaaromstandigheden (16). Deze resultaten betekenen dat het laboratorium ingezonden materiaal uit de luchtwegen dat enkele dagen tot 1 week oud is, niet hoeft af te keuren maar gewoon in bewerking kan nemen. Wel is de werkgroep van mening dat in Nederland de laboratoria er naar moeten streven om het patiëntenmateriaal binnen 4 dagen na afname verwerkt te hebben voor kweek en een ZN-preparaat.

Als transportmedium komt 1% cetyl-pyridinium chloride en 2% natriumhydroxide in aanmerking. Deze oplossing kan in gelijke hoeveelheden gemengd met het patiëntenmateriaal gebruikt worden als transport medium waarin de tuberkel bacillen tot minstens 8 dagen levensvatbaar blijven. Nadeel is dat de tuberkelbacillen alleen goed groeien op LJ en niet op 7H10 en andere agar-based bodems (15).

2.1.3. Voorbewerking

Doel: Hogere sensitiviteit van zowel directe microscopie, kweek, NAT enz.

Twee belangrijke bewerkingen worden hier genoemd: de digestie van materiaal en het concentreren van materiaal.

De meeste diagnostische monsters bevatten verschillende hoeveelheden organisch materiaal en zijn gecontamineerd met commensale bacteriële flora. Een chemische decontaminatie is daarom noodzakelijk om de contaminanten te doden en de mycobacteriën te selecteren om deze te kunnen laten uitgroeien. Omdat ook de mycobacteriën wel in zekere mate gevoelig zijn voor decontaminatie, is het van belang zorgvuldig een protocol te kiezen waarmee een verontreiniging van het aantal kweken met commensale flora niet boven de 5% uitkomt. Bij beduidend lagere contaminatieniveaus moet worden opgepast voor een te sterke decontaminatie. Stoffen die worden gebruikt als chemische decontaminatie zijn 2% NaOH, 4% NaOH, 13% trisodium fosfaat met zephiran, 6% oxaalzuur en 4% zwavelzuur.

Agents		Commentaar
NALC + 2% NaOH	N-acetyl-L-cysteine-2%	Milde digestie en decontaminatie met NALC als mucolytisch middel. Geschikt voor alle niet-steriele materialen. Bij vloeistoffen eerst centrifugeren (3000x g, 30 minuten), sediment opnemen in 2-5 ml aqua dest. en verder bewerken als bij een sputum. De NaOH concentratie kan verhoogd worden tot 3%
4 % NaOH	Petroff's 4 %	Sterke decontaminatie, zeer kritische tijdsduur van decontaminatie. 4% NaOH zowel voor digestie als voor decontaminatie. (toxisch voor Mycobacteriën)
13 % Trinatriumfosfaat + benzalkonium chloride	Zephiran	Hierbij is geen kritische periode voor de tijdsduur van decontaminatie. Zephiran is bacteriostatisch voor mycobacteria zodat het sediment goed geneutraliseerd moet worden voor inoculatie op kweekmedia. Niet geschikt voor vloeibare kweekmedia.
4% zwavelzuur		Alleen bruikbaar voor urine monsters
5% Oxaalzuur	Nabehandeling van sediment bij pos Ps. aer na 2 dagen groei op tb media	Vooraf geschikt voor materiaal dat met <i>Pseudomonas aeruginosa</i> gecontamineerd is. Kan ook gebruikt worden op sedimenten van NALC-2% NaOH methode als uit de kweek blijkt dat er nog <i>P. aeruginosa</i> aanwezig is.
Natrium Lauryl sulfaat		Niet bruikbaar bij een BACTEC systeem
Cetylpyridinium chloride (CPC) (10)		Langdurige periode van decontaminatie (ten minste 24 uur), vooral geschikt voor transport van materiaal naar laboratoria om uitgroei van commensalen te voorkomen. Mycobacteria kunnen tot 8 dagen overleven in CPC. Niet geschikt voor enting in vloeibare kweekmedia.

Om het patiëntenmateriaal te vervloeien en meer geschikt te maken voor microscopisch onderzoek, wordt de decontaminatie stap vaak gecombineerd met een digestie met hulp van N-acetyl-L-cysteine (NALC) of dithiothreitol. Het meest gebruikt is de combinatie 2% NALC-2% NaOH dat voor alle niet steriele materialen kan worden toegepast. Een belangrijk nadeel is dat de NALC in oplossing niet langer dan 24 uur houdbaar is. Het dithiothreitol is daarentegen veel stabiel, maar ook duurder.

Technieken om de sensitiviteit van de microscopie en kweek te verhogen zijn veelvuldig beschreven (6-14). C₁₈- carboxypropylbetaine kan bij decontaminatie worden gebruikt en heeft de eigenschap dat het als een zwitterion de sedimentatie van mycobacteriën bevordert. In een publicatie is gerapporteerd dat gebruik van C₁₈- carboxypropylbetaine als decontaminatie een hogere opbrengst van microscopie en kweek van mycobacteriën (ZN en kweek) gaf, maar ook resulteerde in een hogere verontreinigingsgraad van 20% (9). De hogere opbrengst en contaminatie is ook in een andere studie gevonden (12). In een vergelijkende studie van C₁₈- carboxypropylbetaine met NaLC-NaOH werd geen significant verschil gevonden in de opbrengst van de ZN-kleuring (14). Een belangrijk nadeel van C₁₈- carboxypropylbetaine is dat het niet geïnactiveerd wordt als het behandelde materiaal in vloeibare media wordt gebracht. Uit de enquête gezonden naar Nederlandse laboratoria waar TB diagnostiek wordt verricht bleek dat er niet standaard gebruik werd gemaakt van bovengenoemde bewerkingen. Sommige laboratoria voeren zelfs geen enkele voorbereiding uit. Ondanks de gegevens uit de literatuur omtrent C₁₈- carboxypropylbetaine voor een betere opbrengst van mycobacteriën na decontaminatie van de te onderzoeken materialen is de aanbeveling van de werkgroep, gebaseerd op onze eigen ervaringen in Nederland* en op aanbevelingen uit andere richtlijnen, de NALC-NaOH methode (10,11).

*Uit de enquête bleek dat 28/32 gebruik maakt van deze decontaminatie methode

Aanbeveling 1 (niveau 2)

De 2% NALC- 2% NaOH voorbehandeling van respiratoir materiaal is noodzakelijk voor onderzoek naar de aanwezigheid van mycobacteriën. Dit geldt niet alleen voor een kweek, maar ook voor microscopie en moleculaire technieken.

2.1.4. Uitvoering van de 2% NALC- 2% NaOH methode:

Aan respiratoir patiëntenmateriaal (veelal sputum, maar ook BAL; tot 5 ml) gelijke hoeveelheden 2% NALC- 2% NaOH toevoegen. Goed sluitende dop. Buizen licht zwenken en 30 sec. vortexen om goed te mengen. Incuberen bij kamertemperatuur gedurende 15 minuten met af en toe licht zwenken van de buis. Aanvullen en neutraliseren met fosfaatbuffer (pH 6,8) tot 50 ml. Vervolgens centrifugeren bij $\geq 3000 \times g$ gedurende 15 tot 20 min, decanteren en het sediment resuspenderen in 1 tot 2 ml fosfaatbuffer. De suspensie kan gebruikt worden voor het maken van microscopische preparaten. Het overgebleven sediment (al dan niet na aanvullen) kan worden gebruikt voor kweek en evt. andere tuberculosedagnostiek.

2.1.5. Kleuring

2.1.5.1. Inleiding

Het direct microscopisch onderzoek van materiaal op de aanwezigheid van mycobacteriën blijft een belangrijk diagnosticum. De specificiteit van deze test is zeer hoog (>90%) en de sensitiviteit is afhankelijk van de gebruikte methode, het patiëntenmateriaal, de voorbereiding en de ervaring van de microscopist. Voor het microscopisch aantonen van zuurvaste staven is een minimale hoeveelheid van 5.000 tot 10.000 staven per milliliter noodzakelijk. De sensitiviteit van een kweek is ongeveer 10 tot 100 CFU/ml sputum (26). Gezien de soms geringe aantallen staven bij een actieve tuberculose varieert de gevoeligheid van deze methode tussen de 25-65 % (Cumitech, 17,19,21,26). Enkele (zeldzame) micro-organismen kunnen ook aankleuren in een zuurvaste kleuring; *Nocardia* spp., *Rhodococcus*, *Legionella micadadei*, *Isospora* spp, *Cyclospora* en *Cryptosporidium* (26). Twee belangrijke zaken hebben een rol gespeeld om de kleuring voor het aantonen van zuurvaste staven te modificeren en zelfs te vervangen door andere kleuringen: toxiciteit en gevoeligheid. Er zijn twee methoden om de zuurvaste bacteriën te kleuren: een Ziehl-Neelsen kleuring en een kleuring met een fluorochroom (auramine O of auramine-rhodamine). Bij de Ziehl-Neelsen methode wordt verhit carbolfuchsine gebruikt om de celwand van de mycobacterie te penetreren. Deze verhitting is een essentiële stap en dient niet achterwege te blijven. Bij verwarming van ZN preparaten komen giftige dampen (phenol) vrij. In veel laboratoria ontbreken adequate voorzieningen voor het afzuigen van deze dampen en dit is een reden waarom veel laboratoria overgegaan zijn op “koude” kleuringen”(bijvoorbeeld de kleuring volgens Kinyoun) met onverhit carbolfuchsine. Diverse studies geven aan dat de gevoeligheid van koude kleuringen minder is dan die van de ZN kleuring (18, 21, 22). Een nadeel van een koude kleuring is dat de ontcleuringstap geschiedt met een minder sterke zoutzure oplossing, zodat bijvoorbeeld bovengenoemde zeldzame micro-organismen niet ontcleuren en in eerste instantie ten onrechte aangemerkt worden als MOTT. Om de giftige dampen te voorkomen is de magnetron een goed alternatief voor de verwarming van de preparaten (25)

Het principe van de fluorochroom kleuring verschilt niet met de Ziehl-Neelsen kleuring, alleen is hier de carbolfuchsine vervangen door een fluorochroom en is verhitting niet nodig. Met fluorochroom gekleurde preparaten dienen wel dezelfde dag nog beoordeeld te worden omdat de fluorescentie-intensiteit snel vermindert. Het CDC beveelt aan in de Ziehl-Neelsen preparaten totaal tenminste 300 gezichtsvelden van drie parallelle lanen bij een 1000x te beoordelen, overeenkomend met ongeveer 15 minuten per preparaat. Bij fluorochroom gekleurde preparaten wordt aangeraden een 150x vergroting voor de screening (en 630-100x voor het onderscheid met artefacten) te gebruiken om tenminste 50 gezichtsvelden te onderzoeken in drie parallelle lanen. Omdat dit slechts 1-2 minuten in beslag neemt, meent de werkgroep dat er beter naar gestreefd kan worden het gehele preparaat te beoordelen. In de literatuur wordt ook vermeld dat de fluorescentiemicroscopie gevoeliger is dan de Ziehl-Neelsen kleuringen (19, 20). Het is mogelijk een positief auramine preparaat na ontvetting met aceton en een ontcleuring (30 minuten met mengsel van gelijke delen aceton en 95% ethanol) geschikt te maken voor een Ziehl-Neelsen kleuring (26).

2.1.5.2. Interpretatie van de resultaten van zuurvaste kleuringen.

Er zijn verschillende factoren die een fout-negatief resultaat kunnen geven van de zuurvaste kleuring. Als de ontkleuringstap met zoutzure alcohol te lang is, zal alle carbolfuchsiene uit de mycobacteriën onttrokken worden. Bij dikke preparaten zal bij de microscopie het soms moeilijk zijn in de pus, slijm of onder de cellen aanwezige zuurvaste bacteriën te ontdekken. Om die reden wordt ook wel aangeraden purulente en veel slijm bevattende materialen voor te behandelen met bijvoorbeeld sputolysine of Natrium-hypochloriet. Na deze voorbereiding is het materiaal niet meer geschikt voor kweek. Bloedige materialen zullen een behandeling moeten ondergaan om de erythrocyten te lyseren die anders het microscopiëren bemoeilijken. Fout-positieve resultaten ontstaan door bijvoorbeeld gebruik van een buffer of vloeistof die gecontamineerd is met saprofytische mycobacteriën of door gecontamineerd laboratoriumgereedschap. Ook is de immersie-olie van een positief preparaat een beruchte bron voor kruiscontaminatie van preparaten via de lens van de microscoop. Omdat sterk positieve preparaten de negatieve preparaten kunnen contamineren, zijn kleurbakjes of apparaten niet aan te raden.

Als in het patiëntenmateriaal zuurvaste staven worden gezien, zal tevens een schatting van de hoeveelheid per gezichtsveld naar de kliniek als resultaat kunnen worden gegeven (26). Het verdient aanbeveling een omrekeningsfactor te gebruiken voor fluorochroomkleuringen die bij lagere vergroting beoordeeld worden. In de tabel een voorbeeld van deze semikwantitatieve uitslag zoals door het CDC aanbevolen.

Aantal zuurvaste staven per gezichtsveld

Ziehl-Neelsen 1000x	Auramine 250x	Auramine 450x	Auramine 630x	uitslag
1-9/100gv	1-9/10gv	2-18/50gv	2-18/100gv	1+
1-9/10gv	1-9/10gv	4-36/10gv	2-18/10gv	2+
1-9/gv	10-90/gv	4-36/gv	2-18/gv	3+
>9/gv	>90/gv	>36/gv	>18/gv	4+

De duur van beoordelen voor de Ziehl-Neelsen kleuring is 15 min (totaal 300 velden), de beoordeling van het auramine-preparaat daarentegen is minder tijdrovend en kan het gehele preparaat worden doorzocht.

2.1.5.3. Schaal volgens Bronkhorst

In Nederland wordt op enkele plaatsen nog gebruik gemaakt van de schaal van Bronkhorst om een indruk te krijgen over de hoeveelheid mycobacteriën die in het materiaal van de luchtwegen aanwezig is. Hierbij wordt in niet geconcentreerd (!) patiëntenmateriaal het aantal zuurvaste staven weergegeven in een schaal van 1 (niet meer dan 10 zuurvaste staven in het gehele preparaat) tot +5 (zeer veel per gezichtsveld). Buiten Nederland wordt een vergelijkbare methode gebruikt, de zgn. indeling van Gaffky, waarbij in een schaal van 1 tot 10 de dichtheid wordt berekend. Hoewel deze schalen soms gebruikt worden om een effect van de therapie te kunnen waarnemen, is de kwaliteit van het opgehoeste sputum nooit constant waardoor grote variaties kunnen ontstaan. Soms wordt deze kwantificering toegepast om de mate van besmettelijkheid te schatten, waarbij een sputum met veel zuurvaste staven een grotere kans voor verspreiding van de mycobacterie zou hebben dan sputum met weinig staven. Een negatief ZN-preparaat betekent echter niet dat er geen kans op verspreiding is. Dit blijkt uit de waarneming in San Francisco bij het bestuderen van de epidemiologie van 1574 patiënten met tuberculose, dat 17% van de secundaire gevallen waren besmet door Ziehl-Neelsen negatieve patiënten (23). Recent is deze waarneming bevestigd in Canada bij 791 patiënten, waarbij de bron voor kweekpositieve secundaire gevallen in 15% ZN-negatieve patiënten waren (24).

Aanbeveling 2 (niveau 1)

*Het patiëntenmateriaal dient de eerder beschreven voorbereiding te hebben doorgemaakt alvorens preparaten worden gemaakt. Een fluorochroom methode verdient de voorkeur als screening; een positief preparaat dient altijd bevestigd te worden met een Ziehl-Neelsen. Bij elke kleuring zal een positieve en negatieve controle moeten worden meegenomen. Bij de uitslag zal ook een schatting van de hoeveelheid aanwezige mycobacteriën gerapporteerd moeten worden, zonder dat dit van invloed mag zijn op het isolatiebeleid. Het heeft de voorkeur om direct twee preparaten te maken, een voor de fluorescentie kleuring en de tweede voor een eventuele Ziehl-Neelsen bij een positief fluorescentie resultaat. Elk materiaal met een positief microscopisch onderzoek zal met een moleculaire test onderzocht moeten worden voor identificatie van *M. tuberculosis* of een atypische mycobacterie.*

2.1.6. Kweek

Voor mycobacteriële kweek zijn 3 soorten media: egg based, vloeibaar en agar-based. De CDC en ASM richtlijnen stellen dat voor kweek op *M. tuberculosis* complex tenminste 1 vloeibaar medium en 1 vast medium moet worden gebruikt (2). De egg based media hebben als voordeel dat de media resistent zijn tegen uitdroging, dat toxische bestanddelen worden geneutraliseerd en dat de groei van de meeste mycobacteriën wordt gestimuleerd. Het meest bekende medium is Löwenstein-Jensen dat bestaat uit eibestanddelen, zouten, glycerol, aardappelmeel en malachiet groen. Door toevoeging van 0.4% pyruvaat is het ook geschikt voor isolatie van *M. bovis*. Op de agar based media groeien de mycobacteriën in het algemeen sneller. Middlebrook 7H10 en 7H11 bevatten malachiet groen in een lagere concentratie dan in LJ om commensale flora te remmen. Middlebrook 7H11 bevat 0.1% caseïne hydrolysaat waardoor INH-resistente mycobacteriën in de groei worden gestimuleerd (2) Zowel de egg based als agar based media kunnen door toevoeging van antibiotica en antifungale middelen selectiever gemaakt worden voor isolatie van *M. tuberculosis* uit gecontamineerd materiaal. Op dit moment zijn er 4 commerciële vloeibare systemen beschikbaar: BACTEC, MB/BacT, MGIT en Septi-check. Allerlei toevoeging met antibiotica (PANTA) zijn beschikbaar om groei van contaminanten te remmen.

Omdat de groei van mycobacteriële isolaten en in het bijzonder die van *M. tuberculosis* op vaste media 3 tot 4 weken in beslag kan nemen, wordt aanbevolen om bij de primaire enting ook een vloeibaar medium te gebruiken voor een snellere isolatie. Om zeldzame isolaten die wel op een vast medium maar niet in een vloeibaar medium groeien niet te missen, blijft een vast medium vooralsnog geïndiceerd (37,38). Kweken op vaste bodems zijn verder aan te bevelen omdat men op deze bodems de koloniemorfologie te beoordelen is en de eventuele aan- of afwezigheid van contaminatie gezien kan worden. De tijd tot detectie van kweken in de diverse vloeibare media zoals BACTEC 9000MB (Becton en Dickenson; 28-32) en MGIT (Becton en Dickenson; 33, 34), ESP Culture System II (Trek Diagnostic Systems; 45-47) en MB/BacT (bioMerieux; 41-48) verschilt in de gepubliceerde evaluaties onderling niet significant. In de meeste studies is de gemiddelde tijd tot detectie van *M. tuberculosis* met de verschillende continue monitoringstechnieken 14 dagen of minder. De Septi-Chek MB (biphasic) zit wat tijd tot detectie betreft tussen vaste media en vloeibare media in, maar het gebruik van uitsluitend de Septi-Chek is te prefereren boven het gebruik van alleen een vast medium (35, 36). Naast een snellere detectie is ook de opbrengst van vloeibare media groter (37, 39, 40). Een nadeel van de vloeibare kweeksystemen is dat contaminaties met niet mycobacteriën vaker voorkomen dan op vaste media, en niet onderscheiden kunnen worden aan de hand van het groeiaspect. Bij kweken op vaste bodems kan wel een indruk verkregen worden over de reinheid van de kweek en over een mogelijke dubbelinfectie.

In tabel 1 (R. van Doorn, proefschrift (252) is een overzicht van de belangrijkste vergelijkende studie naar vaste en (verschillende) vloeibare media. Uit dit overzicht blijkt ook dat de BACTEC 460TB in de meeste studies de hoogste opbrengst heeft, maar dit systeem wordt in Nederland niet gebruikt omdat het radioactieve stoffen bevat.

Table 1: Major studies with commercial (semi-) automated culture systems for the rapid detection of *M. tuberculosis* (naar ref. 252)

Study	Number of specimens	% +ve ^a	Systems	RECOVERY RATE			TIME TO DETECTION			
				IN DAYS			IN DAYS			
				MTB ^b	MOTT ^c	all	^{1.} <i>MTB^B</i>			
			ZN ^d +ve ^a	ZN ^d – ve ^e	MOTT ^c	all				
Chew <i>et al.</i> 1998 (49)	603	12.8	MGIT	92.0		93.0	22.0			22.0
			BACTEC 460 TB	97.0		95.0	14.0			14.0
			LJ	95.0		87.0	27.0			27.0
			Middlebrook 7H11	76.0			27.3			
			BACTEC 460 TB	90.0	50.0	75.0	15.2			12.5
			Solid media	79.0	67.0	69.0				
Pfyffer <i>et al.</i> 1997 (43)	3095	14.6	BACTEC 9000	83.5	58.7	75.0	12.2	18.1	15.1	15.9
			BACTEC 460 TB	91.9	76.1	86.5	9.3	15.6	17.3	15.4
			Solid media	85.5	33.6	67.6	28.4	28.5	31.3	27.2
Piersimoni <i>et al.</i> 2001 (50)	1766	10.1	MB/BacT/Alert 3D	91.3	51.6	78.8	11.5	19.9	19.6	
			BACTEC 460 TB	97.8	67.7	87.1	8.3	16.8	16.6	
			LJ	78.3	47.1	64.2	11.7	21.3	27.8	
Rohner <i>et al.</i> 1997 (51)	1078	6.7	MB/BacT/Alert 3D	93.6	16.6	86.3				17.5
			BACTEC 460 TB		33.3	91.8				14.3
			Solid media	84.1	50.0	79.5				
Somoskovi <i>et al.</i> 2000	377	15.0	MGIT 960	96.4	100.0	96.0	12.6	15.8	13.0	

(52)						5			2
			BACTEC 460 TB	92.7	100.0	93.0	13.8	17.7	16.8
			LJ	81.8	50.0	80.7	20.1	42.2	36.2
Tortoli <i>et al.</i> 1998 (45)	2673	8.2	ESP Culture System II	85.3	70.0	79.0	19.0		9.3
			BACTEC 460 TB	97.7	77.0	89.0	18.6		17.8
			LJ	82.9	37.8	64.4	28.6		27.8
Tortoli <i>et al.</i> 1999 (53)	2567	9.2	MGIT 960	88.0	61.2	80.0	14.3		13.3
			BACTEC 460 TB	92.0	71.6	85.0	14.9		14.8
			LJ	74.0	64.0	71.0	25.0		25.7
Williams-Bouyer <i>et al.</i> 2000 (46)	3151	7.3	MGIT 960	84.6	66.4	63.9	12.8		13.1
			ESP Culture System II	73.8	68.0	71.2	18.7		16.9
			Middlebrook 7H11	87.7	55.2	61.8	19.2		19.2
Van Griethuysen <i>et al.</i> 1996 (54)	2005	10.1	BACTEC 9000	96.7	79.5	91.6	7.5	12.6	8.7
			Septi-check AFB	81.5	76.9	80.2	14.2	12.1	13.6
			LJ	83.5	57.0	79.9	10.7	18.9	12.2

^a+ve = positive, ^bMTB = *Mycobacterium tuberculosis*, ^cMOTT = *Mycobacteria Other Than M. tuberculosis*, ^dZN = Ziehl-Neelsen, ^e-ve = negative

Omdat de incubatietijd van mycobacteriële kweken lang is, verdient het aanbeveling om te zorgen dat de kwaliteit van de media (wat betreft het groeivermogen van Mycobacteriën) gecontroleerd en gegarandeerd is door de leverancier. Bij het zelfstandig bereiden van voedingsbodems is het van belang om kwalitatief en kwantitatief te controleren met langzaam groeiende mycobacteriële controle stammen. Idealiter worden twee verschillende typen vaste voedingsbodems gebruikt, omdat hierdoor de kans op het gebruik van kwalitatief onvoldoende voedingsbodems wordt verkleind. De in de literatuur meest genoemde voedingsbodems zijn Coletsos met oseïne, 7H10 of 7H11, Ogawa en Löwenstein. Vanwege de incidentele isolatie van *M. bovis* is het aan te bevelen om Löwenstein met pyruvaat te gebruiken. Sommige MOTTs, zoals *M. avium* groeien ook veel beter op Löwenstein met pyruvaat, dan op Löwenstein medium. Löwenstein met pyruvaat kan ook vervangen worden door Coletsos met oseïne voor de isolatie van *M. bovis*.

De ervaringen van de werkgroepleden geven aan dat: (advies niveau 4)

- De koloniemorfologie goed waarneembaar is op 7H10 of 7H11 medium.
- De groei van sommige MOTTs beter is op Coletsos met oseïne.
- De kwaliteit van Ogawamedium (van de firma Oxoid) constant goed is.
- Vooral de bereiding van Löwensteinmedium is uiterst gecompliceerd. Ook is de kwaliteit van de biologische componenten zoals eieren nogal eens wisselend. De ervaringen met het bereiden van Löwenstein vanuit commercieel verkrijgbare poedervorm zijn veelal zeer teleurstellend.

Binnenkort zullen er Europese richtlijnen gelden aangaande de kwaliteitsborging van voedingsbodems die gebruikt worden in de microbiologie. Dit geldt ook voor homemade media. Dit lijkt een overweging te zijn om media bij grotere commerciële firma's te bestellen die kunnen voldoen aan de huidige kwaliteitseisen. De kwaliteit van afzonderlijke batches medium kunnen dramatisch verschillen.

Bij het kiezen van een geautomatiseerd vloeibaar kweekstelsel zijn naast opbrengst en tijd tot detectie een aantal andere belangrijke aspecten zoals instrumentaria, media, toe te voegen supplementen, en ander materiaal. Andere factoren zijn voorbereiding en "shelf-life" van supplementen, foutpositieve percentage (dat wil zeggen het percentage kweken dat door de machine wordt aangemerkt als "positief" en geen mycobacteriën blijken te bevatten), capaciteit van de machine en benodigde ruimte.

Ondanks de voordelen van een continu monitoringssystemen, zijn deze duur en een laboratorium met een "laag" volume aan kweken zou de voorkeur kunnen geven aan een manueel vloeibaar kweekstelsel zoals: BBL Septi-Chek AFB of het manuele MGIT systeem. Verder is een automatisch signaal niet altijd synoniem aan een daadwerkelijk positieve kweek.

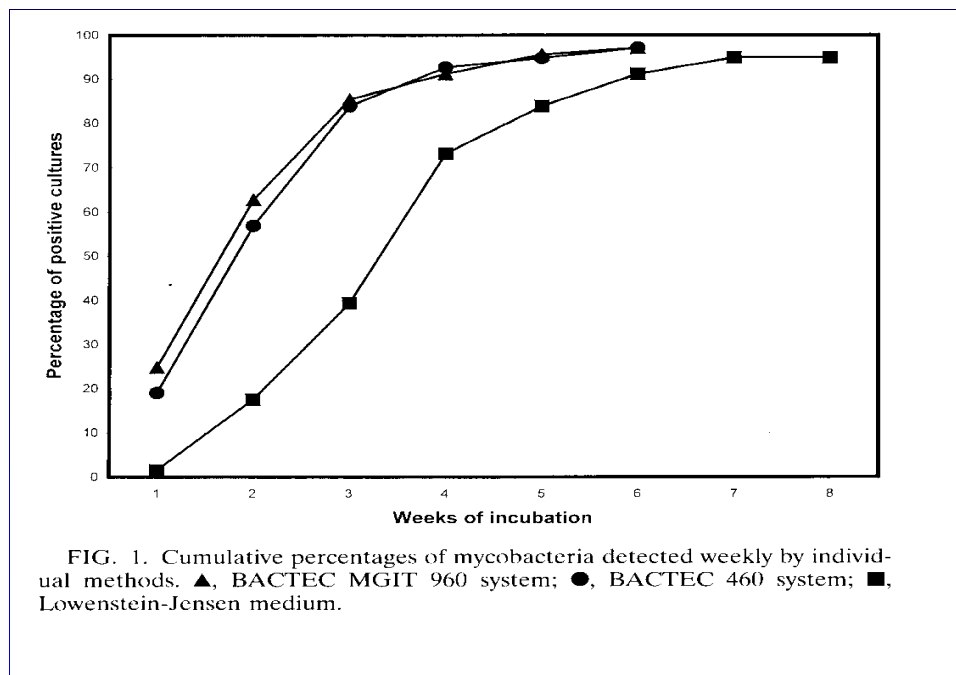


FIG. 1. Cumulative percentages of mycobacteria detected weekly by individual methods. ▲, BACTEC MGIT 960 system; ●, BACTEC 460 system; ■, Lowenstein-Jensen medium.

Tortoli et al JCM Nov 99 pg. 3578

Incubatie van de vaste media gedurende tenminste 1 week in 5-10% CO₂ zou stimulatie van de groei van mycobacteriën geven (2). In dat geval dienen buizen horizontaal geïncubeerd te worden, zodat het oppervlak van het medium voldoende in aanraking komt met de CO₂. De werkgroep heeft echter de bewijsvoering voor deze aanbeveling niet in de literatuur terug kunnen vinden. In de meeste studies wordt aangeraden de media 6-8 weken te incuberen (2).

Aanbeveling 3a (niveau 1):

*Het voorbehandelde materiaal wordt in één vloeibaar medium en op één vaste voedingsbodem geënt. De werkgroep raadt aan hiervan 1 van de twee media met antibiotica te gebruiken voor mycobacteriële kweek van materialen die mogelijk niet goed gedecontamineerd zijn. De vloeibare media worden in een automatische aflezer geplaatst, of afgelezen met het oog na 7 dagen, en daarna minimaal 1 x per week. Na drie dagen kan bij een eerste aflezing al mogelijke contaminatie herkend worden. De aflezing is wekelijks en bij voorkeur gedurende 8 weken. Als het oorspronkelijke ZN-preparaat positief was, zal de incubatie verlengd moeten worden met minimaal 4 weken en zal met speciale groeiomstandigheden rekening moeten worden gehouden. Als er groei wordt waargenomen zal een ZN-kleuring van verdachte kolonies de zuurvastheid moeten aantonen en wordt een moleculair biologische techniek aanbevolen om onderscheid te kunnen maken tussen *M. tuberculosis complex* en MOTT.*

Aanbeveling 3b (niveau 4):

Omdat de incubatietijd van mycobacteriële kweken lang is, verdient het aanbeveling om te zorgen dat de kwaliteit van de media (wat betreft het groeivermogen van Mycobacteriën) gecontroleerd en gegarandeerd is door de leverancier. Bij het zelfstandig bereiden van voedingsbodems is het van belang om kwalitatief en kwantitatief te controleren met langzaam groeiende mycobacteriële controle stammen. Idealiter worden twee verschillende typen vaste voedingsbodems gebruikt, omdat hierdoor de kans op het gebruik van kwalitatief onvoldoende voedingsbodems wordt verkleind.

2.1.7. Moleculaire detectie

Voor het specifiek aantonen en identificeren van mycobacteriële nucleïnezuuren wordt gebruik gemaakt van een NAT.

Deze technieken gebruiken een aantal geselecteerde specifieke stukjes DNA/RNA (targets) om *M. tuberculosis* in patiëntenmonsters aan te tonen. Om een optimaal resultaat van de NAT te verkrijgen is het in de eerste plaats van belang dat de tijd tussen afname van het patiëntenmateriaal en het verwerken ervan zo kort mogelijk is. Hoewel niet bekend is hoe lang patiëntenmateriaal opgeslagen kan worden voor moleculaire diagnostiek naar mycobacteriële infecties, adviseren wij het materiaal niet langer dan 1 week bij 4 °C te bewaren. *Nucleïnezuuren en met name RNA zijn relatief instabiele moleculen. Toch blijkt in de praktijk dat ondanks behandeling met gerichte tuberculostatica nog weken ribosomaal RNA kan worden aangetoond in luchtwegmateriaal (persoonlijke mededeling Vlaspolder). De sensitiviteit wordt verder beïnvloed door de DNA-extractie methode (56), de PCR parameters en de methoden die gebruikt worden voor het detecteren en identificeren van het PCR product (57). Door bijvoorbeeld op het PCR product een tweede PCR uit te voeren met een andere set aan primers, de "nested PCR", kan de gevoeligheid verhoogd worden (58). Ook neemt de sensitiviteit toe bij gebruik van primers voor een "target" sequentie die aanwezig is in verschillende kopieën. Bij in-house ontwikkelde assays wordt als target voor het aantonen van het *M. tuberculosis complex* IS6110 vaak gebruikt omdat dit insertie-element (veelal) in meerdere kopieën voorkomt in het genoom van het *M. tuberculosis complex*

**Er zijn nu artikelen bekend waarin wordt beschreven dat er isolaten zijn van *M. tuberculosis*

waarbij het IS6110 element ontbreekt (59-63). Andere targets zoals bijvoorbeeld 16S rDNA, sod, 32Kda and dnaJ kunnen ook worden gebruikt voor het detecteren van mycobacteriën op het species-niveau bijvoorbeeld target *mpt40* voor *M. tuberculosis* (64) of de afwezigheid van IS1561 voor *M. microti* (65). Het *mpt40* gen is niet geschikt in Nederland, omdat 8% van de stammen in Nederland dit gen mist (Dr. D. van Soolingen, persoonlijke mededeling)

Van 1 kopie van een uniek stukje mycobacterieel DNA kunnen door 40 cycli na amplificatie, 10^{12} kopieën (amplicons) worden gevormd, met behulp van twee complementaire oligonucleotiden (primers). Om aan te tonen dat een fragment geamplificeerd is zijn vele verschillende methoden beschikbaar. Veruit de eenvoudigste is agarose-gelelectroforese waarbij de gevormde fragmenten op grootte worden gescheiden en zichtbaar worden gemaakt met behulp van een specifiek aan dubbelstrengs DNA bindende stof (Ethidium bromide of SYBR-green). (Cave: hierbij kan ook een ander fragment van gelijke grootte zijn geamplificeerd.) Een specifiekere methode is het gebruik maken van een derde complementaire oligonucleotide (probe) die ook specifiek aan het gevormde amplicon bindt, en waaraan een label is gebonden. Deze methode kan zowel na als tijdens (Real-time) de amplificatie reactie worden toegepast. Er bestaan vele verschillende soorten probes en er zijn verschillende manieren om probes te labelen en te detecteren (bv. enzymatisch, fluorescent, radioactief, electrochemiluminescent etc.). De specificiteit kan nog verder verbeterd worden door tijdens de amplificatiereactie gebruik te maken van gelabelde nucleotiden of primers met behulp waarvan na de amplificatiereactie de gevormde amplicons geïsoleerd kunnen worden alvorens de probe toe te voegen. Andere post-amplificatie detectietechnieken (waarbij dus het geamplificeerde DNA zichtbaar wordt gemaakt) zijn directe sequentie analyse (66), analyse van restrictie fragment lengte polymorfisme patronen of single-strand conformation polymorphism (SSCP). Op dit moment zijn er twee commerciële amplificatietechnieken die door de FDA zijn goedgekeurd op ZN-positief patiëntenmateriaal: de AMTD test (amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test, Gen-Probe, San Diego, Ca) en de COBAS Amplicor *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostic system, Basel, Switzerland. De AMTD test is ook voor ZN-negatief materiaal uit de luchtwegen door de FDA goedgekeurd. De COBAS Amplicor heeft het 16S DNA als target, dat via een conventionele PCR met gebruik van dUTP-UNG geamplificeerd wordt waarna hybridisatie met een enzymatisch gelabelde probe plaatsvindt. De AMTD gebruikt ook 16S rRNA als target. Amplificatie vindt isotherm plaats door middel van Transcription Mediated Amplification (TMA) gevolgd door hybridisatie met acridinium-ester gelabelde probes. Hoewel de sensitiviteit en specificiteit elkaar niet veel ontlopen, is de amplicortest (Cobas) volledig geautomatiseerd en heeft deze een interne controle om inhibitie van de reactie aan te kunnen tonen. Een derde geautomatiseerd detectiesysteem is de Ligase-Chain reactie (LCx, Abbott laboratories). De LCx amplificeert een deel van het gen dat codeert voor een 38-KD eiwit dat specifiek is voor *M. tuberculosis* (67). De LCx is nu niet meer verkrijgbaar. Een vierde, veelbelovend, commercieel systeem is BDProbeTec (Becton Dickinson). Dit systeem gebruikt "single strand displacement amplification" (isotherm) en real-time detectie van zowel target DNA (IS6110 en fragment 16S rRNA) als een interne amplificatie controle waarbij fluorescerende energie transfer (ET) als detectie wordt gebruikt (69-71). De test is semi-automatisch, heeft een iets langere doorlooptijd (3,5 uur) dan de andere testen maar lijkt vooral bij extrapulmonale tuberculose een hogere opbrengst te hebben dan de andere testen. Tabel 1 bevat de belangrijkste studies waarbij de sensitiviteit, specificiteit, PPV en NPV berekend zijn.

Aantal onderzochte	test	sensitiviteit	specificiteit	PPV	NPV	Jaar/referentie
---------------------------	-------------	----------------------	----------------------	------------	------------	------------------------

materialen						
273	AMTDII	92.8	99.4	98.5	97	1998/68
	LCx	75.7	98.8	96.4	90.5	
296	AMTDII	85.7	100	100	90.4	2000/71
	Amplicor	94.2	100	100	96.0	
1681*	Amplicor	66.3	99.7	94.4	97.7	1998/72
	IS6110	91.1	99.8	97.9	99.4	
755	Amplicor	92.4	100	100	96.5	1998/73
9173*	Amplicor	82.5	99.8	94.3	99.4	2003/74
411*	BDProbeTec	93.5	99.7	-	-	2003/70
	Amplicor	93.5	100	-	-	
515*	BDProbeTec	93.4	99.9	-	-	2002/78
	AMTDII	80.6	99.6	-	-	
205	BDProbeTec	92.7	96	97	90	2002/69
152	Amplicor	69.2	100	100	94	
	BDProbeTec	76.9	93.7	71.4	95.2	2004/Kim
101 (pleura)	BDProbeTec	88.9	92.4	53.3	98.9	1004/83
	Amplicor	33.3	100	100	93.9	
94	BDProbeTec	96	100	-	-	2004/84
	AMTD-II	96.1	97.1	-	-	

Tabel 2. Resultaten 4 verschillende amplificatie technieken vergelijken met cultures voor de detectie van tuberculose in respiratoire en niet-respiratoire patiëntenmaterialen

* respiratoire en niet-respiratoire patiëntenmaterialen

Uit de tabel blijkt voor respiratoire samples de sensitiviteit te schommelen tussen de **75.7% en 92.8% en de specificiteit tussen 98.8% en 100%**. De meeste van deze studies maken ook een onderscheid tussen het gebruik van deze test op Ziehl-Neelsen positief en ZN-negatief materiaal. Op ZN negatief materiaal is de sensitiviteit duidelijker lager en varieert van 56.5% (72) tot 85.7% (67, 68). Omdat de NPV bij deze ZN-negatieve materialen duidelijk lager is (92.7% tot 99.5%) wordt aanbevolen om de kweek niet te vervangen door een amplificatie methode, maar nog steeds te blijven verrichten. Een recente meta-analyse van 50 studies naar de waarde van de PCR bij ZN-negatief materiaal (75) uit de luchtwegen geeft een zeer grote spreiding van de sensitiviteit (9-100%) en specificiteit (25-100%). Deze meta-analyse laat zien dat de meeste studies geen goede controles hebben gebruikt; slechts 35 van de 50 studies hadden een kweek als controle. Wel lijkt de PCR een hogere sensitiviteit te hebben op per bronchoscopie verkregen ZN-negatief materiaal dan op sputum. Studies die na 1995 zijn verricht met dUTP-UNG in niet-commerciële testen of de Amplicortest hadden een hogere specificiteit maar lagere sensitiviteit

Op dit moment is er een aantal laboratoria in Nederland bezig met de ontwikkeling van een real-time PCR voor de diagnostiek van mycobacteriële infecties. Enkele van deze laboratoria werken samen en hebben een consensus gevonden voor target, primers en probes. Andere laboratoria hebben al een target gekozen en de real-time PCR in de routine-diagnostiek geïntroduceerd. Afhankelijk van de gekozen targets zullen de real-time PCR's ook geschikt zijn voor andere mycobacteriën dan alleen *M. tuberculosis* (85). Zoals aangetoond is voor microscopie (ZN) en kweek (76,77, 79-81), geldt ook voor de NAT dat herhaald uitvoeren op nieuw patiëntenmateriaal de diagnostische opbrengst vergroot. In een studie van Al Zahrani (82) bij 500 patiënten werd gevonden dat de sensitiviteit van ZN, kweek en PCR toenam van 64%, 70% en 89 % bij 1 monster tot 91%, 99% en 99% voor drie monsters.

Aanbeveling 4a (niveau 1)

ZN-positief sputum kan met de AMTD test (amplified Mycobacterium tuberculosis direct test, Gen-Probe, San Diego, Ca) of de COBAS Amplicor M. tuberculosis test (Roche Diagnostic system, Basel, Switzerland) onderzocht moeten worden op de aanwezigheid van M. tuberculosis complex. Een laboratorium kan ook een in-house ontwikkelde PCR gebruiken, mits gevalideerd en op schrift vastgesteld volgens de geldende certificatie regels.

Aanbeveling 4b (niveau 4).

De werkgroep vindt dat bij materiaal afkomstig van een patiënt waarbij een sterk vermoeden bestaat op het hebben van tuberculose een negatief resultaat van zowel de ZN als bij de amplificatiemethode niet mag worden gebruikt om tuberculose uit te sluiten.

2.2. Pleuravocht

2.2.1. Inleiding

Pleuritis tuberculosa is in >90% van de gevallen eenzijdig zonder aantasting van andere organen of lymfeklieren, gaat soms gepaard met pulmonale tuberculose en kan ook onderdeel zijn van gedissemineerde tuberculose (met name bij co-infectie met HIV). Chemisch en hematologisch onderzoek van pleuravocht afkomstig van pleuritis tuberculosa laat de volgende karakteristieken zien: >50% lymfocyten (in begin vaak neutrofiele), weinig mesothelcellen, <5% eosinofielen, proteïne van 50 ± 10 g/l, LDH: 500-1500 U/L, glucose: iets lager dan serum concentratie en een pH van meestal 7.3-7.4, De waarde van markers zoals adenosine deaminase en interferon- γ is niet duidelijk (86-88).

2.2.1.1. Specifieke diagnostiek

De definitieve diagnose wordt gesteld door een positieve kweek van pleuravocht of van een pleurabiop. Echter, ook een verkazende granulomateuze ontsteking van de pleura zonder positieve kweek of positieve microscopie maar die goed reageert op een therapie met tuberculostatica, wordt in het algemeen als bewijs voor pleuritis tuberculosa geaccepteerd. De werkgroep is van mening, dat in Nederland altijd een definitieve diagnose met positieve kweek dan wel positief signaal in een amplificatie methode moet worden nagestreefd. N.B.: Slechts een uitzondering daarop zou kunnen zijn dat in een gezinssituatie waarbij transmissie heeft plaatsgevonden met positieve Mantoux omslagen en een zich ontwikkelende pleuritis aanwezig bij de niet index-patiënt pleuradiagnose achterwege zou kunnen blijven.

2.2.2. Afname en transport

In enkele oude studies wordt aangetoond dat het percentage positieve kweken toeneemt door grote hoeveelheid pleuravocht (100-500 ml) te centrifugeren, door meerdere pleurapuncties te verrichten en door inoculatie van het pleuravocht in cavia's (89,90). In deze studies werden echter alleen maar conventionele kweekmedia en proefdieren gebruikt. Recente prospectieve studies laten zien, dat andere factoren belangrijker zijn voor de opbrengst van de kweek, namelijk de plaats van inoculatie (bedside of in laboratorium), gebruik van transportmedium en kweekmedia. Drie prospectieve studies vergeleken bedside inoculatie met laboratorium inoculatie van pleuravocht, gebruik makend van verschillende hoeveelheden pleuravocht en verschillende kweekmedia. Samenvattend bleek bedside

inoculatie superieur te zijn aan laboratorium inoculatie indien vloeibare media zoals Bactec werden gebruikt (91,92,96). Een alternatief voor transport van patientenmateriaal van kliniek naar het laboratorium is het gebruik van gehepariniseerde containers, waardoor clotting met mogelijke trapping van mycobacteria wordt vermeden (96).

2.2.3. Kleuring

De sensitiviteit van ZN van pleuravocht is laag. Uit studies met HIV-negatieve patiënten bleek dat 0-8% te zijn en 6-18% voor patiënten met HIV co-infectie (93-95).

2.2.4. Kweek

De sensitiviteit van kweken met conventionele vaste media zoals LJ in prospectieve studies bleek maximaal 23 % te zijn (91-93), oplopend tot 43% in HIV-seropositieve patienten (92,93).

Vloeibare kweekmedia blijken gevoeliger te zijn dan vaste media zoals LJ en de kweek in vloeibare media wordt ook sneller positief. Hierbij wordt een sensitiviteit van 43%-46% bereikt, oplopend tot 75% in een groep van 109 HIV-seropositieve patienten (91, 92, 96, 104). De grote prospectieve studies komen vooral uit ontwikkelingslanden.

2.2.5. Moleculaire detectie

De resultaten van enkele studies waarin amplificatie methoden van pleuravocht met ZN wordt vergeleken met conventionele kweek zijn nog te tegenstrijdig, om duidelijke conclusies te kunnen trekken (97-99)

2.3. Pleurabiopt

2.3.1. Inleiding

Als pleurabiopten beschikbaar zijn, zullen deze niet alleen met kleuring en kweek op de aanwezigheid van mycobacteriën onderzocht kunnen worden, maar ook met histologisch onderzoek. Granulomateuze ontsteking met verkazende necrose in het pleurabiopt wordt ook als sterke aanwijzing voor tuberculose. Altijd wordt ook de kliniek en een goede response op therapie hierbij betrokken. In de Nederlandse situatie zal altijd een positieve kweek nagestreefd moeten worden. De sensitiviteit van histologisch onderzoek in pleurabiopten was in prospectieve studies 55-85% (92-94,104,107), en in retrospectieve studies 45%-80% (87,102,105). Er waren geen verschillen in sensitiviteit tussen HIV seropositieve vs. HIV seronegatieve patiënten (92-94).

2.3.2. Afname

De sensitiviteit van pleurabiopten voor de diagnostiek van tuberculose neemt niet toe als biopten onder zicht worden genomen (thoracoscopie) in vergelijking met "blind genomen biopten" volgens de Abrams biopsy technique (100) waarbij in ieder geval meer dan 2 specimen beschikbaar moeten zijn (101,102). Echter, indien in de oudere leeftijdsgroep (>50 jaar) de voorafkans op maligniteit groter is dan op tuberculose, hebben thoracoscopisch verkregen biopten de voorkeur omdat maligniteiten hierin beter zichtbaar zijn (102,103):

2.3.3. Kleuring

De sensitiviteit van ZN bleek in prospectieve studies niet hoger te zijn dan 5%-12% (93, 94,104), in retrospectieve studies 17- 26% (87,105). Bij HIV-co-infectie bleek bij prospectief onderzoek de ZN kleuring 19-20% (93, 94) en retrospectief 44-69% te bedragen (95,106)

2.3.4. Kweek

In een prospectief vergelijkend onderzoek hadden vloeibare kweekmedia een significant hogere opbrengst dan vaste media, zowel bij patiënten zonder als ook met HIV-co-infectie, 56% vs 21% en 81% vs 56% (92). In andere prospectieve studies was de kweekopbrengst met diverse vloeibare media bij patiënten zonder verdenking op HIV-infectie 67-80% (91,104,107).

2.3.5. Moleculaire detectie

De moleculaire diagnostiek van *M. tuberculosis* in pleurabiopten liet in een serie van 28 patiënten met pleuritis tuberculosa en een positieve kweek een sensitiviteit zien van 100%. In vergelijking met de resultaten van histologisch onderzoek en klinische symptomen was de sensitiviteit 89% en de specificiteit 100% (108).

Aanbeveling 5 (niveau 2)

Bij de diagnostiek van pleuritis op tuberculose moet ook een chemische analyse en een hematologisch onderzoek van het pleuravocht worden betrokken.

Naast afname van vocht voor direct microscopisch onderzoek, wordt directe bedside inoculatie van pleuravocht in vloeibaar medium aanbevolen. Als alternatief kan transport naar het laboratorium plaatsvinden in een gehepariniseerde container. (Bij een negatieve ZN, een negatief amplificatieresultaat en een ontbrekende alternatieve diagnose, zal onderzoek van een pleurabiopt overwogen moeten worden voordat de definitieve kweekuitslagen bekend zijn. Tenminste 2 pleurabiopten, blind of via thoracoscopie verkregen, zullen onderzocht moeten worden met histologie, amplificatie methode, ZN en kweek.

2.4. Lymfklieren

2.4.1. Inleiding

Lymphadenitis tuberculosa wordt meestal gediagnosticeerd in de hals (60-80%) en is vaak unilateraal (90%). Naast perifere lokalisaties, kan lymfkliertuberculose ook uitsluitend in mesenteriale klieren of in het mediastinum voorkomen. Bij HIV-co-infectie is kliertuberculose

vaker bilateraal, in meerdere klierstations en onderdeel van gedissemineerde tuberculose met gelijktijdige lokalisatie in andere organen zoals longen (109-112). De grote prospectieve studies van lymfadenitis tuberculosa komen uit gebieden waar een hoge TB prevalentie is, zoals India of Afrikaanse landen. Studies van lymphadenitis tuberculosa in de Westerse landen zijn kleiner en zijn meestal retrospectief. De werkgroep is zich ervan bewust, dat gegevens uit de TBC endemische gebieden met de nodige voorzichtigheid dienen te worden geëxtrapoleerd naar landen met lage prevalentie zoals Nederland. Echter, omdat TBC (inclusief lymfadenitis tuberculosa) in Nederland steeds meer een ziekte is van immigranten uit deze endemische gebieden, heeft de werkgroep goed uitgevoerde gepubliceerde studies uit ontwikkelingslanden wel bij de analyse betrokken. Hierbij is ook van belang, dat een toenemend aantal immigranten met TBC ook een HIV-infectie zullen hebben met specifieke klinische en diagnostische kenmerken. Studies waarbij moleculaire detectie niet vergeleken zijn met kweek zijn niet geanalyseerd.

2.4.2. Afname

Voor de diagnose van tuberculeuze lymphadenitis wordt FNA (fine needle aspiration = dunne naald aspiraat) niet alleen in TB endemische landen (111,117,119-125), maar ook in Westerse landen (115,116,126-129) inmiddels als diagnostische methode van eerste keus beschouwd. Dit geldt vooral voor patiënten die afkomstig zijn uit TB endemische gebieden en HIV-seropositieve patiënten. De kans op een positief auramine/ZN preparaat is 16-34% (113-115, 117) en op een positieve kweek 56-62% (113,114). In 26-55% van de patiënten wordt een granulomateuze ontsteking met verkazing gevonden (109,117). De aanwezigheid van uitsluitend granulomen zonder verkazing bleek in een onderzoek in de U.S.A. een positief voorspellende waarde van 65% te hebben; in 35% van de gevallen werd de granulomateuze ontsteking veroorzaakt door een andere ziekte (115). Een recente Nederlandse gepubliceerde aanbeveling over diagnostiek van halskliertuberculose adviseert daarom ook serologisch onderzoek te verrichten naar andere ziekten zoals toxoplasmose en kattenkrabziekte (129). Bij negatieve bevindingen zal een excisiebiopsie moeten worden genomen (129). In de literatuur wordt de FNA als een veilige procedure beschouwd; er is geen enkele onderbouwing voor de veronderstelling dat FNA een verhoogde kans op fistelvorming geeft als de patiënt voor tuberculose wordt behandeld. In een excisie-biopsie is een grotere kans op een positief ZN/auraminepreparaat (37-69%), een positieve kweek (86-100%) en op het aantonen van granulomateuze ontsteking met necrose (77-86%) dan in een FNA biopsie (111,113,114, 117,118).

2.4.3. Transport

Een dunne naaldaspiraats/ biopsie wordt verricht met een 19 of 21 gauge naald en zowel naar het microbiologisch laboratorium als ook PA lab gebracht voor verdere verwerking. Het gedeelte voor het microbiologisch lab moet ongefixeerd worden aangeleverd. Bij transport naar het microbiologisch laboratorium dient voorkomen te worden dat materiaal uitdroogt. Belangrijk is, dat de interne logistiek zowel met de patholoog anatoom als ook de arts-microbioloog goed is geregeld.

2.4.4. Moleculaire detectie

Hoewel de commerciële amplificatietechnieken niet door de FDA goedgekeurd zijn voor toepassing op patiëntenmaterialen anders dan sputum of bronchusspoelsel, zijn er wel enkele studies die zowel over commerciële als over in house amplificatie technieken gunstige resultaten rapporteren. Een vergelijking van de PCR- IS6110 met de Cobas Amplicor op 43 lymfeklierbiopsien van patiënten met lymphadenitis tuberculosa, gaf een

sensitiviteit en specificiteit van 87.5 % en 100% voor een in house-assay en 45.% met 91.3% voor de Cobas (131). Vooral inhibitie werd vaker met de Cobas (19.5%) dan met in house assay (4.8%) waargenomen; een voorbehandeling van patiëntenmateriaal met N-acetyl-L-cysteine-NaOH beïnvloedde de sensitiviteit en specificiteit niet (131). Ook bij andere studies wordt steeds gerapporteerd dat optimale cellysis met de commerciële systemen vaak niet mogelijk is en dat er een hoog percentage inhibitie wordt waargenomen. Een vergelijking van twee extractiemethoden door Honore et al. liet zien dat DNA isolatie met cetyltrimethylammonium bromide betere resultaten opleverde dan de proteïnase K behandeling (132). Voor de Amplicortest is ook aangetoond dat silica-membranen (Qiamp, Quiagen, Heidelberg, Germany) effectief waren in het verwijderen van PCR remming (133). Een andere veel extra gebruikte voorbehandeling bij NAT op extrapulmonaal materiaal is de silica-extractie van Boom.(250) Een interessante en mogelijk veelbelovende bevinding is gerapporteerd door Piersimoni die bij extrapulmonale tuberculose een hogere sensitiviteit vond van de BDProbeTec (92.3) dan de AMTDII test (74.3%) (78). Door middel van de AMTD werden 86 lymfeklier materialen parallel getest met de conventionele kweek (vloeibaar en vaste media), waarbij een gevoeligheid van 96% en specificiteit van 100% werd gevonden. De Auramine /ZN positiviteit bedroeg 56% (Persoonlijke mededeling Vlaspolder)

Aanbeveling 6 (niveau 2)

Voor de diagnostiek op verdenking van lymfkliertuberculose wordt FNA als eerste diagnosticum aanbevolen omdat deze methode in een derde van de gevallen direct tot een snelle diagnose leidt, makkelijk uitvoerbaar is en weinig complicaties kent. De commerciële PCR testen hebben nog een te lage sensitiviteit om deze in de diagnostiek van lymphadenitis op te nemen, maar met sommige in-house ontwikkelde PCR's zijn goede en snelle resultaten bereikt. Indien deze laatste wordt gebruikt, dient deze gevalideerd te zijn. Als met FNA geen microbiologische of histologische diagnose kan worden gesteld, is een volgende optie een excisie-biopsie.

2.5. Maaginhoud

2.5.1. Inleiding

Onderzoek van maagsap wordt aangeraden bij verdenking op pulmonale tuberculose als onderzoek van sputum of bronchoalveolaire lavage niet mogelijk is. De nuchtere maaginhoud zal 's ochtends via hevelen van 20-30 ml fysiologisch zout bij voorkeur in 5-10 ml Na₂CO₃ buffer opgevangen moeten worden. Het materiaal moet binnen 4 uur op het laboratorium zijn voor bewerking als er geen buffer wordt gebruikt. Ook bij immuungecompromiteerde patiënten met verdenking op pulmonale tuberculose die geen sputum opgegeven is onderzoek van maagsap nuttig (135). In plaats van een nuchtere maaginhoud, kan ook een zogenaamde stringtest met een capsule in het duodenum verricht worden, zoals beschreven is bij HIV-seropositieve patienten (245). Recent zijn aanwijzingen verkregen dat bij kinderen met pulmonale tuberculose sputuminductie een hogere opbrengst heeft dan nuchtere maaginhoud (246).

2.5.2. Afname

De nuchtere maaginhoud zal 's ochtends via hevelen van 20-30 ml fysiologisch zout bij voorkeur in 5-10 ml Na₂CO₃ buffer opgevangen moeten worden. Hoewel saprophytaire

mycobacteriën in de maag kunnen worden aangetroffen, is dit in minder dan 1% van de positieve ZN-preparaten het geval (134).

2.5.3. Transport

Het materiaal moet binnen 4 uur op het laboratorium zijn als er geen buffer wordt gebruikt.

2.5.4. Kleuring

De sensitiviteit van het ZN-preparaat is ongeveer 33% en de specificiteit is 99% (136).

2.5.5. Moleculaire detectie

Bij een positief preparaat beveelt de werkgroep aan een *M. tuberculosis* complex-specifieke amplificatie uit te voeren

Aanbeveling 7 (niveau 4)

*Microbiologisch onderzoek (ZN en kweek) van nuchter maagsap wordt bij verdenking op pulmonale tuberculose aangeraden als geen sputum of BAL beschikbaar is. De werkgroep raadt aan op maagsap ook een *M. tuberculosis* complex-specifieke amplificatie te doen*

2.6. Pericardvocht

2.6.1. Inleiding

Voor de diagnose pericarditis tuberculosa lijkt de combinatie histologisch en microbiologisch onderzoek van pericardvocht en/of pericardbiopt het meest aangewezen (137). Bij 16 patiënten met pericarditis tuberculosa waarbij microbiologisch onderzoek werd verricht, was de ZN van het pericardvocht bij 5 van 12 patiënten positief, de kweek in 10 van 13 en werd bij de 3 patiënten de diagnose alleen gesteld op een positieve kweek van een pericardbiopt (138). Rooney et al. vonden bij 35 patiënten met pericarditis tuberculosa in 50% het vocht positief en in 83% het pericardweefsel (139). In een kleine studie bij 7 patiënten was in zes het pericardvocht kweek positief en in zeven patiënten het pericardweefsel (140).

2.6.2. Moleculaire detectie

Een al wat gedateerde en retrospectieve studie bij patiënten met tuberculeuze pericarditis studie geeft een sensitiviteit van de IS6110 PCR van 80% op biopten en slechts van 13% op pericardvocht (141).

Aanbeveling 8 (niveau 3)

Bij het vermoeden op pericarditis tuberculosa kan microscopisch onderzoek, kweek en een NAT van het verkregen pericardvocht aangewezen zijn. Voor de diagnostiek van pericarditis tuberculosa is onderzoek van pericardweefsel gevoeliger dan van pericardvocht. Het verschil is niet zo groot dat dit het aandringen op een pericardbiopt rechtvaardigt.

2.7. Peritoneum

2.7.1. Inleiding

Bij diagnostiek van peritonitis tuberculosa moet rekening worden gehouden met het gelijktijdig bestaan van andere vormen van tuberculose. De peritonitis kan ontstaan bij een pulmonale vorm, bij een intestinale vorm of als complicatie bij een urogenitale tuberculose.

2.7.2. Afname

In een review van Chow van meer dan 1000 patiënten met peritonitis tuberculosa komen de auteurs tot de conclusie dat een gerichte peritoneumbiopsie het meest gevoelig is (142). In de studie van Muneef bij 46 patiënten met peritonitis tuberculosa levert microbiologisch onderzoek van ascites in 33% de diagnose terwijl dit in een weefselbiopt 68% bedraagt (143).

Aanbeveling 9a (niveau 2).

Voor de diagnostiek van peritonitis tuberculosa is een gerichte biopsie van het peritoneum voor microbiologisch en histologisch onderzoek het meest sensitief .

Aanbeveling 9b (niveau 4)

Als bij het vermoeden op tuberculeuze peritonitis ascites wordt afgenomen, beveelt de werkgroep aan ongeveer 5-10 ml af te nemen aan het bed van de patiënt en dit direct in een vloeibaar kweekmedium voor mycobacteriën te enten.

2.8. Darmmateriaal

2.8.1. Inleiding

Tuberculose kan in de gehele tractus digestivus gelokaliseerd zijn. In een review van Horvath blijkt er wel een voorkeurslokalisatie in ruim 75% van de gevallen te bestaan voor het ileocoecaal gebied (144). Intestinale tuberculose gaat in 20% gepaard met een actieve pulmonale tuberculose. Diagnose wordt gewoonlijk via endoscopie gesteld, waarbij de kans op het aantonen van mycobacterien (positieve ZN, positieve kweek of positieve amplificatie) toeneemt met het nemen van meerdere en diepe biopten* (145). Een belangrijk voordeel is tijdswinst bij gebruik van een amplificatiemethode. Belangrijk is de differentiatie van intestinale tuberculose met de ziekte van Crohn. Onderscheid op basis van het histopathologisch beeld is meestal kan niet worden gemaakt. Een amplificatie methode blijkt bij retrospectief gebruik bij 69 patiënten met ileocoecaal tuberculose of Crohn een sensitiviteit van 64.1% en specificiteit van 100% te hebben (146). Balamuragan et al. (2006) hebben met een moleculaire techniek op faeces *M. tuberculosis complex* aangetoond (253).

*De biopsie moet tot in de submucosa reiken en hierbij is van belang dat de biopten worden genomen van de ulcusbodem en –randen.

Aanbeveling 10 (niveau 2)

Voor de diagnostiek van tuberculose van de tractus digestivus zijn meerdere endoscopisch verkregen gerichte bipten uit de diepe lagen van de darmwand noodzakelijk. Naast histopathologisch onderzoek, ZN kleuring en kweek is toepassing van een amplificatiemethode op het weefselbiopt aan te raden.

2.9. Urine

2.9.1. Inleiding

Urogenitale tuberculose kan onderdeel zijn van een gedissemineerde tuberculose, maar manifesteert zich meestal als een endogene reactivatie van tuberculose (147-149). Ongeveer 80% van de patiënten met urogenitale tuberculose hebben urogenitale klachten met in 15-35% ook koorts. Twintig procent van de patiënten is asymptomatisch. Van patiënten met urogenitale tuberculose heeft 57-70% een afwijkende thoraxfoto passend bij (doorgemaakte) pulmonale TB en heeft ongeveer 25% anamnestic pulmonale of extrapulmonale TB doorgemaakt (147-149).

2.9.2. Urine onderzoek

Algemeen urineonderzoek laat in 34-84% leucocyturie en/of hematurie zien. Bij gedissemineerde TB kan het urinesediment normaal zijn (147,148).

2.9.3. Afname

Met ochtendurine wordt een hogere sensitiviteit van de kweek bereikt dan met 24 uren verzamelurine (150). Een 24-uren verzamelurine verhoogt ook de kans op contaminatie (151). Hoewel goede studies ontbreken, wordt geadviseerd drie aparte ochtendurines in te sturen, omdat hierdoor een hogere opbrengst van de microscopie en kweek bereikt kan worden (147,151,152). Tenminste 48 uur voor afname van urine mag de patiënt geen antibiotica hebben gebruikt die de groei van mycobacteriën kunnen remmen.

2.9.4. Transport

Indien urine niet direct naar het laboratorium gebracht kan worden, dient het in de koelkast worden bewaard.

2.9.5. Kleuring

De sensitiviteit van het directe Ziehl-Neelsen preparaat van urine bij patiënten met positieve TBC-kweek was 48% en 52% (148,153) met een specificiteit van 97% (153). In een grote retrospectieve studie van 173 patiënten was de directe ZN kleuring van het sediment van 3 keer 24 uren verzamelurine zelfs vaker positief dan de kweek (73% vs. 63%), maar helaas werd de specificiteit hierbij niet vermeld (152). Andere studies vermelden uitsluitend kweekresultaten (147,149).

2.9.6. Kweek

De urinekweek is in 67% tot 90% positief bij een zeer sterke verdenking op urogenitale tuberculose (147,149,152). Bij de overige patiënten wordt de diagnose gesteld op basis van positieve TB kweeken van sputum, en/of combinatie van suspecte histologie van bijvoorbeeld blaas of epididymis, beeldvormend onderzoek van de urinewegen, positieve Mantoux test en goede reactie op therapie. In 5-30% van patiënten met urogenitale tuberculose bestaat er een bacteriële co-infectie (148,152) waardoor een aanzienlijke vertraging van de diagnose TB kan ontstaan (149).

2.9.7. Moleculaire detectie

De sensitiviteit en specificiteit van een PCR gericht op *IS 6110* was 96% and 98% respectievelijk in vergelijking met een kweek van *M. tuberculosis* uit urine in een groep van 1000 patiënten met een sterke verdenking op urogenitale tuberculose (153). Ook Sechi en van Vollenhoven vonden vrijwel identieke sensitiviteit van de PCR techniek vergeleken met de Bactec kweek van urine (154,155). In de studie van Hemal et al. (156) bij 42 patiënten met een sterke klinische verdenking op urogenitale tuberculose, was de PCR aanzienlijk gevoeliger (81%) dan de kweek (31%).

Aanbeveling 11a (niveau 1)

Voor de diagnostiek van urogenitale tuberculose dient driemaal een ochtendurine onderzocht te worden met auramine/ZN kleuring en gekweekt op de aanwezigheid van mycobacteriën.

Aanbeveling 11b (niveau 4.)

Bij een sterke klinische verdenking van urogenitale tuberculose raadt de werkgroep aan ook moleculaire diagnostiek van de urine toe te passen, omdat deze een vergelijkbare sensitiviteit heeft als de kweek en tot een veel snellere diagnose kan leiden.

2.10. Tuberculose van meningen en het centraal zenuwstelsel.

2.10.1. Inleiding

Tuberculeuze meningitis ontstaat meestal ten gevolge van een ruptuur van een subependymaal tuberculoom naar de subarachnoïdale ruimte en minder vaak als complicatie van hematogene verspreiding. De hematogene verspreiding heeft in het stadium van het primair complex plaats gehad. De meningitis presenteert zich als een basale meningitis met een breed klinisch spectrum. Het klinisch beeld wordt veroorzaakt door de gevolgen van een necrotiserende vasculitis/endarteriitis waardoor infarcering en anoxie met weefselversterf optreedt in het verzorgingsgebied. In ongeveer 75% is er tegelijkertijd extrameningeale tuberculose aanwezig (157), meestal een miliaire tuberculose. In Nederland was volgens cijfers van KNCV Tuberculosefonds in 50% van 159 gevallen van tuberculeuze meningitis ook een andere vorm van pulmonale of extrapulmonale TB aanwezig. De mortaliteit is hoog bij kinderen onder de leeftijd van 5 jaar (20%), bij patiënten ouder dan 50 jaar (60%) en bij patiënten bij wie de symptomen langer dan 2 maanden bestaan (80%). De prognose wordt bepaald door de leeftijd van de patiënt, duur van het bestaan van de symptomen en de

neurologische afwijkingen (157-160). De ernst van de neurologische afwijkingen wordt ingedeeld in 3 stadia, waarbij vanaf stadium 2 wordt geadviseerd ook corticosteroïden aan de behandeling toe te voegen.

In de periode 1993 tot 2003 werd in Nederland tuberculeuze meningitis 159 maal gediagnosticeerd. Dit is 1 % van alle vormen van TB (NTR-KNCV, persoonlijke mededeling P. van Gerven). De incidentie was relatief het hoogst bij kinderen 0-4 jaar. In de USA is tuberculeuze meningitis beschreven als 5 –10% van de klinische TB populatie (Rieder ARRD 1990) en Tandon (Handbook of Clin. Neurology) beschrijft het percentage tuberculeuze meningitis in ontwikkelingslanden 7-12% van het totaal aantal tuberculosegevallen. In principe wordt in verband met de hoge mortaliteit geadviseerd met antituberculeuze behandeling te beginnen bij een sterke verdenking, maar indien mogelijk ná het afnemen van liquor voor diagnostiek. Ook samples afgenomen na het starten van de antituberculeuze therapie binnen 5 dagen hebben aanvullende waarde voor de diagnostiek dmv kleuring, kweek, moleculaire technieken en klinisch chemische parameters van de liquor (157, 158, 161).

Voor het stellen van de diagnose tuberculeuze meningitis neemt de liquor een centrale plaats in. Een verhoogde openingsdruk wordt slechts zelden aangetroffen. Naast microbiologisch onderzoek zal ook chemisch en hematologisch onderzoek steun kunnen geven aan de diagnose, hoewel een volstrekt normaal beeld van hematologische en chemische parameters van de liquor ook is beschreven (162). Het celgetal in de liquor varieert van 0 tot 1500/mm³, het eiwitgehalte is meestal licht verhoogd en het glucosegehalte kan verlaagd zijn, hoewel in een studie dit slechts in 16% van de patiënten met tuberculeuze meningitis werd aangetroffen (157). De cellen zijn meestal lymfocytair, maar in het beginstadium van de meningitis kan dit polynucleair zijn.

2.10.2. Afname

Geadviseerd wordt om minimaal 6 ml liquor af te nemen (157,161). In het onderzoek van Thwaites et al. was er een significant verschil van microbiologische opbrengst tussen liquoren van 4 ml. of minder en liquoren van 5 ml. of meer (161). Er is geen onderzoek gedaan naar het nut van “bed-side” beënting van liquoren rechtstreeks in vloeibare aankweekmedia, zoals bij pleuravocht. Wel blijkt uit het onderzoek van Thwaites dat herhaald onderzoek van liquor, ook na het starten van de therapie de opbrengst van microscopie (met 10%), kweek en PCR (met 42%) vergroot (161). Vooral de combinatie van kleuring en moleculaire diagnostiek bereikt dan een sensitiviteit van meer dan 80%. Hoewel *M. tuberculosis* door zijn zogenaamde cordfactor kan samenklonteren in liquor en een stolsel kan veroorzaken, wordt hierover in recente literatuur niets meer vermeld. Wel raadt de werkgroep aan om afgenomen liquor te inspecteren op de aanwezigheid van een stolsel en dit eventueel apart te onderzoeken.

2.10.3. Transport

Onderzoek van liquor op de aanwezigheid van zuurvaste staven is een cito-onderzoek waarbij het materiaal na afname binnen 1 uur op het laboratorium moet zijn voor bewerking. Er zijn geen gegevens bekend over een juiste bewaartemperatuur en maximale bewaarperiode, zodat de werkgroep aanraadt het onderzoek zo snel mogelijk te verrichten.

2.10.4. Kleuring

De liquor zal eerst macroscopisch onderzocht moeten worden op de aanwezigheid van stolsels. Eventuele stolsels zullen apart onderzocht moeten worden. De liquor zal met tenminste 3.000 x g gedurende 15 minuten gecentrifugeerd moeten worden waarna van het sediment een auraminekleuring wordt gemaakt. Bij een zeer troebele liquor kan een voorbehandeling met SDS-NaOH nodig zijn om de cellen te lyseren en de beoordeling van het preparaat te vergemakkelijken. De literatuur over de opbrengst van de microscopie varieert sterk waarbij een sensitiviteit wordt gemeld tussen 2 en 91% (157,161,163). Kennedy et al. vonden in een groep van 52 patiënten met tuberculeuze meningitis in het eerste liquormonster een sensitiviteit van 37% van het ZN dat steeg naar 87% bij liquoren die 4 maal werden verkregen en onderzocht (157).

2.10.5. Kweek

Niet-voorbehandeld sediment en het resterende supernatant zullen op vaste media en in vloeibare media beënt worden. Helaas bestaat er geen literatuur over een eventuele meeropbrengst van directe enting van 5-10 ml liquor in vloeibare kweekmedia. Als het mogelijk is om drie liquoren te onderzoeken op de aanwezigheid van zuurvaste staven, vindt de werkgroep het te overwegen om één liquor zo snel mogelijk na afname in zijn geheel te gebruiken voor kweek in een vloeibaar medium. De opbrengst van liquoren die langer dan 5 dagen na het de start van de therapie zijn afgenomen, zijn meestal al negatief in de kweek tenzij er sprake is van resistentie en een hoge lading van zuurvaste staven in de liquor.

2.10.6. Moleculaire detectie

Voor de diagnostiek van tuberculeuze meningitis blijkt de PCR en betere sensitiviteit te hebben dan de ZN-kleuring (164). De sensitiviteit schommelt tussen de 55.5% en 93.8% (tabel 2) wat beduidend hoger is dan de 10% van een ZN-kleuring. De LCX is niet meer verkrijgbaar (167). In enkele studies wordt melding gemaakt dat de sensitiviteit van de ZN tot 50% of meer toeneemt als er grotere hoeveelheden liquor worden afgenomen en onderzocht (161). Een recente meta-analyse (164) toonde een sensitiviteit van de amplificatietest van 55% (CI 46-66%). In de meta-analyse waren de resultaten van de commerciële testen aanmerkelijk beter dan in-house PCR's. De sensitiviteit van de AMTD test kan nog verder toenemen als er een voorbehandeling van de liquor met SDS-NaOH plaatsvindt en de amplificatietijd wordt verlengd van 2 naar 3 uur (161,165) Na het starten van een antituberculeuze therapie daalt de opbrengst van de ZN en kweek snel, maar neemt de cumulatieve sensitiviteit van ZN en AMTD test toe tot 83% als er binnen 15 dagen nog tenminste tweemaal liquor wordt onderzocht (161).

Tabel 2. Moleculaire diagnostiek voor *M. tuberculosis* op liquor.

Test	Aantal samples	Standaard	Sensitiviteit	Specificiteit	PPV	NPV	Jaar/referentie
AMTD	311	Kweek	93.8%	99.3%	-	-	2002/166
PCR IS6110	131	Kweek	75%	94%	-	-	2000/168
Amplicor	83	Kweek, kliniek, en	60%	100%	-	-	1998/169

		Liquorafwijkingen					
BD-ProbeTec	101	kweek	76.9%	98.8	-	-	2004/170
AMTD	341	kweek	53%	100%	100%	79%	2004/161

Aanbeveling 12 (niveau 2)

Voor een optimale diagnostiek van verdenking op tuberculeuze meningitis is tenminste 5 ml. liquor nodig en dient het onderzoek bij voorkeur op meerdere monsters te worden uitgevoerd tot 5 dagen na de start van therapie. Voor de diagnostiek van verdenking op tuberculeuze meningitis dient altijd moleculaire diagnostiek verricht te worden, naast de gangbare microscopie en kweek. De resultaten van de moleculaire diagnostiek kunnen echter niet gebruikt worden om tuberculeuze meningitis uit te sluiten.

2.11. Miliare en gedissemineerde tuberculose

2.11.1 Inleiding

De termen miliare- en gedissemineerde tuberculose worden ten onrechte als synoniem gebruikt. Miliare tuberculose betreft het radiologische thoraxbeeld (miliem=gerstekorrel). Bij gedissemineerde tuberculose kan een miliair longbeeld gevonden worden, maar dat hoeft niet persé.

Beide vormen van tuberculose kunnen binnen enkele maanden na besmetting optreden en ook later door endogene reactivatie bij immuungecompromitteerde patiënten (bijvoorbeeld ten gevolge van immunosuppressieve therapie of aandoeningen zoals HIV-infectie.). Volgens de gegevens van het Nederlands Tuberculose Register (NTR), werd in de periode 1993-2003 in Nederland van 16.447 gevallen van tuberculose in 384 (2.3%) miliare tuberculose gediagnosticeerd. Lang niet altijd wordt hierbij het klassieke beeld van miliare tbc op de thoraxfoto gezien (tuberculosehaardjes van gerstekorrelformaat <2mm). De patiënt kan ziek zijn met tachypneu, niet productieve hoest en meestal negatieve ZN/kweek van het sputum. In een aantal gevallen wordt de sputumkweek positief. Doordat gedissemineerde tbc in korte tijd een fataal beloop kan hebben, moet binnen enkele dagen de diagnostiek zijn ingezet en met de behandeling zijn gestart. Uit Amerikaanse statistieken blijkt, dat van alle geobduceerde patiënten in de U.S.A. met miliare TB als doodsoorzaak, in 20% van de gevallen geen klinische verdenking op tuberculose bestond (217). Recentere gegevens uit Finland laten zien, dat van de patiënten met post mortem diagnose miliare TB, niet meer dan 50% voor het overlijden behandeld werden met tuberculostatica. Zonder het klassieke radiologische miliare longbeeld werd zelfs maar 25% voor de dood behandeld (218). Uit post mortem onderzoek blijkt, dat in 80-100 % de gedissemineerde gevallen gelokaliseerd is in de longen, lever en milt, in 60% van de gevallen in de nieren en bij maar liefst 25-75% in beenmerg (219, 220). Bij HIV-patiënten is bekend dat lymfkliertuberculose vaak onderdeel is van gedissemineerde tuberculose (112). Tevens is de kans op een positieve bloedkweek in geval van HIV-co-infectie bij sterk verlaagd aantal CD4 cellen (<100/microL) 50% (221).

2.11.2. Afname

Sputum, vocht van bronchoalveolaire lavage, transbronchiale biopten, -of nuchtere maaginhoud (bij afwijkende thorax foto zonder opgeven van sputum), specifieke bloedkweek en ochtendurine wordt volgens de beschreven richtlijnen ingezet. Bij vergrote perifere klieren wordt ook dunne naald aspiratie van de klier, gevolgd door beenmergaspiratie of leverbiopsie uitgevoerd bij niet verkrijgen van een snelle diagnose. Beenmerg dient ongefixeerd naar het microbiologisch laboratorium verstuurd te worden, en ander deel gaat als uitstrijk naar de pathologie. Verkregen leverweefsel gaat ongefixeerd in een steriele droge container voor de microbiologie en een ander deel in formaline voor histologisch onderzoek. Goede afstemming met de clinicus, arts-microbioloog en patholoog is hierbij van essentieel belang, om snelle verwerking van de afgenomen materialen te garanderen en te bepalen of spoed diagnostiek nodig is.

2.11.3. Transport

Alle materialen moeten direct naar betreffende laboratoria gaan voor spoedbewerking.

2.11.4. Kleuring

De sensitiviteit van het directe Ziehl-Neelsen preparaat bij patiënten die zowel leverbiopsie als ook beenmergaspiratie hebben ondergaan was in een aantal studies gemiddeld 40% (lever) en 25% (beenmerg). Granulomen werden hierbij in respectievelijk 88% en 67% gezien en verkazing in respectievelijk 45% en 42% (222). Bij HIV-seropositieve patiënten met febris e.c.i. en of *M. tuberculosis* of *M.avium* infecties/isolaties bleek het leverbiopt vaker positief te zijn (75%) dan bij beenmerg (25%). (222.) Pacios (251) vergeleek de kweekopbrengsten van de bij dezelfde patiënt afgenomen bloedkweek en beenmerg voor zowel *M. tuberculosis* en MAC, waarbij tenminste een van de kweken positief was. De sensitiviteit van beide kweken was voor *M.tuberculosis* identiek, namelijk 66.7%. Voor MAC was de bloedkweek echter sensitiever dan de beenmergkweek, 100% versus 57.1%.

2.11.5. kweek

De tbc kweken blijven de gouden standaard voor de definitieve diagnose. In de literatuur wordt de nadruk gelegd op snelle en adequate afname van meerdere materialen en snelle diagnostiek middels directe kleuring en moleculaire detectie, ondersteund met histopathologische onderzoek. Volgens de Nederlandse gegevens van het NTR blijkt, dat bij diagnostiek van miliaire tuberculose geen hogere kweekopbrengst dan 77,3% wordt bereikt (248).

2.11.6. Moleculaire detectie

Op moleculaire diagnostiek van de verschillende materialen wordt elders ingegaan. Specifiek voor miliaire/gedissemineerde tuberculose is moleculaire detectie van beenmerg zinvol gebleken. Bij Lombard bleek de moleculaire detectie van beenmerg sensitiever te zijn dan de kweek (42 vs 26%) (224), anderen vonden retrospectief (op paraffine coupes) bij patiënten met gedissemineerde tbc en granulomen in lever of beenmerg in 50% van de gevallen een positief resultaat verkregen door middel van moleculaire detectie (225)

Aanbeveling 13 (niveau 3)

Diagnostiek van verdenking op gedissemineerde tuberculose dient snel uitgevoerd te worden. Meerdere materialen moeten gelijktijdig worden ingezet om de kans op snelle diagnose te vergroten: sputum, BAL-vocht of nuchtere maaginhoud, ochtend-urine. Deze materialen dienen in aanmerking te komen voor directe kleuring kweek en moleculaire

detectie volgens protocol. Bij eerste negatieve resultaten dient direct weefseldiagnostiek te volgen, bij voorkeur beenmergaspiratie en/of leverbiopsie. Bij vergrote perifere klieren wordt een dunne naaldaspiratie aanbevolen. Moleculaire detectie heeft bij beenmerg biopsie de voorkeur. Indien moleculaire detectie niet voorhanden dan is een lever biopsie de voorkeur i.v.m. grotere kans op positieve directe kleuring en histopathologische kenmerken.

Aanbeveling 14 (niveau 2)

Bij een verdenking van extrapulmonale tuberculose dient altijd onderzoek plaats te vinden naar pulmonale tuberculose (besmettelijkheid). In Nederland werd in de periode 1993-2003 bij 8% van 16.386 patiënten gelijktijdig een pulmonale en een extrapulmonale vorm gediagnosticeerd.

2.12. Formaline gefixeerd materiaal

De enige methoden om bacteriën aan te tonen zijn door microscopie en door moleculaire technieken. Materiaal dat gefixeerd is met formaline is vanwege de gedode micro organismen niet meer geschikt voor kweek. Bij de beoordeling van gefixeerd histologisch materiaal blijkt dat de ZN kleuring voor microscopie vervangen kan worden door een DNA amplificatie vanwege de grotere sensitiviteit van de laatst genoemde techniek (229-238).

Aanbeveling 15 (niveau 1)

Voor de diagnostiek van tuberculose op formaline gefixeerd materiaal, heeft een DNA amplificatie techniek de voorkeur boven een ZN gekleurd preparaat.

3. Identificatie van isolaten

Voor de identificatie van mycobacteriën kan na een extractieprocedure uit het vloeibaar medium of van een gegroeide kolonie het mycobacterieel DNA of RNA gebruikt worden. De AccuProbe (Gen-Probe) heeft ribosomaal RNA als target en identificeert met gesynthetiseerde DNA van ca. 25 bp *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. avium* complex, *M. gordonae* en *M. kansasii* (171). De methode kan voor het aantonen van *M. tuberculosis* fout positieve resultaten geven met *M. celatum* en *M. terrae* (172). De detectiegrens is ongeveer 10^6 CFU/ml. De test werkt snel waardoor binnen 60 minuten een identificatie bekend is, maar is slechts voor een beperkt aantal species beschikbaar. Een ander commercieel systeem voor identificatie van mycobacteriën is de INNO-LipA test (Innogenetics, Gent, België) die gebruik maakt van reverse hybridisatie met probes gecoat op een membraan die gericht zijn tegen de species specifieke sequenties in 16S-23S spacer gebied. Deze test is geschikt voor *M. tuberculosis* complex, *M. avium* complex, *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. xenopii* en het *M. chelonae- abscessus* complex. Bij testen op een panel van 157 isolaten (met o.a 37 referentiestammen) bleek de test een specificiteit te hebben van 99.4% en was alleen de *M. gordonae* negatief (173). Recent is de INNO-LipA test uitgebreid waardoor nu 16 species herkend kunnen worden (174). Het voordeel van deze test is ook de inclusie van een probe specifiek voor het genus *Mycobacterium*, zodat er altijd zekerheid bestaat of het isolaat een mycobacterie is. Nadeel van de test is dat het aflezen subjectief is er vaak een hybridisatie met meerdere probes is. Alternatieven voor identificatie zijn nog de sequentie analyse van

16S rDNA of ITS, detectie van IS6110, of PCR- REA van *hsp65* gen. In 2004 is ook een op 23S rRNA gen gebaseerd systeem op de markt gekomen waarmee 13 species onderscheiden kunnen worden (GenoType Mycobacterium, Hain Diagnostika, Nehren, Germany). Deze test komt goed overeen met de resultaten van AccuProbe (GenProbe, San Diego, CA, USA), Innolipa en 16S rDNA sequencing (175,176).

Aanbeveling 16 (niveau 1)

Voor identificatie van mycobacteriën is geen plaats meer door middel van conventionele biochemische bepalingen. Voor de herkenning van het M. tuberculosis complex voldoen de specifieke in house testen, mits gevalideerd, commerciële testen van Gen-Probe, Innogenetics en Hain Diagnostika uitstekend en geeft alleen Hain Diagnostika een specificatie binnen het M. tuberculosis complex.

4. Gevoeligheidsbepalingen

4.1. Fenotypische gevoeligheidsbepalingen

Ongeveer de helft van de laboratoria in Nederland verricht mycobacteriële gevoeligheidsbepalingen (enquête 2001) met een grote verscheidenheid aan testen. Eén van de meest gebruikte methoden is een éénpuntsbepaling in vloeibaar medium; bijvoorbeeld MGIT, BACTEC. Hierbij wordt de groei van mycobacteriën gemeten bij een breekpuntconcentratie van een tuberculostaticum. Groei geeft in dit geval resistentie aan. Andere laboratoria meten de groei van mycobacteriën bij een bepaalde concentratie tuberculostaticum in een vast medium zoals 7H10. Vooral bij resistentiebepalingen is de kwaliteit van belang. Het betreft immers de therapiebegeleiding en resistentieproblematiek is zeer gecompliceerd. Idealiter zouden controles gebruikt moeten worden om continue te meten of de test goed presteert.

Bij het RIVM wordt van alle *M. tuberculosis* complex isolaten het resistentieprofiel bepaald met een minimaal remmende concentratie methode in 7H10 medium volgens een agardilutie. Hierbij wordt op kwantitatieve wijze (proportional) gemeten bij welke concentratie van tuberculostatica de groei van mycobacteriën geremd wordt. De MIC is die concentratie waarbij de groei van meer dan 99% van het inoculum geremd wordt. Er wordt op drie niveaus aan kwaliteitscontrole gedaan bij deze bepaling. In de eerste lijn worden controlestammen meegenomen met bekende MIC-waarden. Als tweedelijnscontroles worden op geblindeerde wijze isolaten uitgewisseld met een ander streeklaboratorium. Als derdelijnscontrole wordt deelgenomen aan het ringonderzoek van de WHO. In het kader daarvan ontvangt het RIVM regelmatig 10 geblindeerde, duplo monsters, die ook in andere supranationale laboratoria worden onderworpen aan resistentieonderzoek om de prestatie te testen.

Aanbeveling 17 (niveau 4)

Het verkrijgen van een snelle uitslag van een gevalideerde resistentiebepaling, is voor de behandeling van tuberculose essentieel. Daarom raadt de werkgroep aan om de stammen direct bij het waarnemen van zichtbare groei naar het laboratorium voor Mycobacteriële diagnostiek van het RIVM te zenden. De werkgroep beseft dat er nog een aantal praktische problemen zijn die hierbij opgelost moeten worden. De werkgroep vraagt zich af of het nog wel zinvol is uitgebreide MIC bepalingen in het eigen laboratorium te verrichten.

4.2. Genetische gevoeligheidsbepalingen.

Hoewel standaard gevoeligheidsbepalingen (MIC waarden) van mycobacteriën centraal in het RIVM volgens WHO richtlijnen worden uitgevoerd, bestaat er behoefte aan snellere informatie. Thans duurt het gemiddeld 6-8 weken voordat de gevoeligheid bekend is. Vooral het toenemen van multi-drug resistente *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) heeft geleid tot de ontwikkeling van moleculair biologische testen die INH en rifampicine resistentie detecteren. Omdat rifampicine resistentie vaak samen voorkomt met INH resistentie en resistentie voor rifampicine relatief eenvoudig aan te tonen is in een 81bp groot gebied in het *rpoB* gen, heeft dit geleid tot de ontwikkeling van twee commerciële systemen die deze mutaties herkennen. Van rifampicine resistente *M. tuberculosis* heeft 95% een mutatie in dit 81bp gebied. De mutaties zijn te detecteren met sequencing, heteroduplex analyse en PCR-SSCP. De INNO-LiPA Rif.TB (Innogenetics, Zwijndrecht, Belgium) is een solid-phase reverse hybridisatie-test waarbij de target geamplificeerd wordt met biotine gelabelde primers en de hybridisatie plaatsvindt met op membraan geïmmobiliseerde probes (177). Vooral de temperatuur is hierbij zeer kritisch om de puntmutaties te kunnen detecteren. De Mismatch Detect II (Ambion) is gebaseerd op het vermogen van dubbelstrengs RNA digestie met RNase A te weerstaan (178). In een vergelijkende studie van deze twee testen met 16 rifampicine resistente isolaten had de INNO-LIPA een 100% specificiteit en de Mismatch 93.8% (179). De testen zijn ook aanmerkelijk eenvoudiger dan de PCR-SSCP. Recent zijn er ook enkele studies verschenen waarbij in een real-time format met molecular beacons de resistentie van *M. tuberculosis* voor rifampicine op isolaten en ook in patiëntenmateriaal kan worden aangetoond (180,181). Het nadeel van de bovenbeschreven testen is dat alleen DNA sequentie analyse alle mutaties kan detecteren en de blot gerelateerde methoden gebaseerd zijn op alleen de meest voorkomende mutaties. In Nederland is ongeveer 7% van *M. tuberculosis* isolaten resistent tegen INH (182). INH resistentie berust in 53% op puntmutaties in het katalase-peroxidase gen (*katG*) en in 10-15% op mutaties in het *inhA* gen. Vooral de puntmutaties in codon 315 van *katG* leiden tot hoge MIC waarden van INH; in Nederland had 85% van de *katG* mutanten met MIC ≥ 2 in codon 315 een mutatie (183). Deze mutatie kan aangetoond worden met PCR restrictie-enzyme-analyse van *katG* gen, met sequencing of met real-time PCR. Er zijn ook inmiddels real-time PCR's voor de herkenning van deze mutatie (vaak gecombineerd met *rpoB* mutaties) direct in patiëntenmateriaal beschreven (184-186). Voor ethambutol resistentie worden de mutaties in het *embB* gen in kaart gebracht en zijn ook al real-time PCR's ontwikkeld (187,188)

Aanbeveling 18 (niveau 4)

Microbiologische laboratoria met voldoende moleculaire faciliteiten zullen met commerciële testen of met sequencing de meest voorkomende resistenties voor rifampicine en INH kunnen detecteren. De werkgroep dringt aan op bevestiging van de verkregen resultaten door een referentielaboratorium (RIVM)

5. Laboratorium kruis-contaminaties

Foutpositieve kweken kwamen in Nederland regelmatig voor, zoals bleek uit een studie van het RIVM in 2000 (226)

Er kunnen fouten in de diagnostiek ontstaan tijdens het afnemen van het materiaal, door het verwisselen van monsters, maar ook door kruiscontaminaties (LKC's) in het laboratorium. Een duidelijke aanwijzing voor het optreden van een LKC is het positief bevinden van sequentiële kweken. Een probleem hierbij is dat de kweken, hoewel ingezet op dezelfde dag, toch na verschillende incubatietijden positief kunnen worden.

Er zijn op eenvoudige wijze maatregelen te nemen om LKC's te voorkomen.

Het is van belang om alle buffers die gebruikt worden tijdens het kweken of andere laboratoriumprocedures in zo klein mogelijk volumina uit te vullen, zodat er geen grotere hoeveelheden gecontamineerd kunnen raken. In het veiligheidskabinet dienen zo weinig mogelijk materialen aanwezig te zijn teneinde het stroompatroon van de lucht niet te verstoren. Tevens dienen er geen verschillende werkzaamheden in hetzelfde veiligheidskabinet gecombineerd te worden zonder tussentijdse decontaminatie. Bij vermoedelijke kruiscontaminaties is het te overwegen om in een vroeg stadium (zelfs voordat de kweek positief is) een LKC uit te sluiten. Dit kan gedaan worden door op het (voorbehandelde) patiëntenmateriaal als ook van het gemaakte preparaat, auramine of ZN, een spoligotypering te verrichten. Ook kweekpositieve materialen met een negatieve ZN of auramine dienen in LKC verdachte gevallen zo snel mogelijk te worden onderzocht om LKC uit te sluiten (227). Spoligotypering is de enige multi copy target PCR voor het bepalen van een fingerprint van *M. tuberculosis* complex bacteriën in patiëntenmaterialen en een vloeibaar medium (228). Het verkregen spoligopatroom van bacteriën in het preparaat of het patiëntenmateriaal is dan te vergelijken met dat van de gekweekte stam. De mogelijkheid tot retrospectieve controle op mogelijke LKCs wordt vooral mogelijk gemaakt door delen van de (voorbehandelde) materialen te bewaren.

Tijdens de secundaire diagnostiek van tuberculose wordt een IS6110 RFLP patroon bepaald om transmissie van tuberculose te onderzoeken. Indien twee stammen hetzelfde DNA patroon hebben en binnen een tijdsbestek van één week zijn geïsoleerd in eenzelfde laboratorium is dit een sterke aanwijzing voor een kruiscontaminatie. U krijgt hiervan bericht van het RIVM.

6. Kwaliteitscontrole

De volgende controles worden geïncorporeerd in een PCR-reactie: controle op remming, controle op de PCR reagentia, controle op de DNA extractie methode en het monitoren van de gevoeligheid van de amplificatie. Het gebruik van een gekwantificeerde hoeveelheid DNA of RNA voor de controle in de amplificatie en DNA extractie is een aanvullende eis als de PCR wordt gebruikt voor diagnostische doeleinden, zoals voor de detectie van het *M. tuberculosis* complex (226-231). De toevoeging van een geringe hoeveelheid *M. tuberculosis* DNA, synthetic DNA or cloned *M. smegmatis* als positieve controle, wordt algemeen toegepast bij in-house assays (229,230). Alleen bij de commerciële COBAS-test is een interne controle onderdeel van de test. Het belang van gekwantificeerde DNA of RNA hoeveelheden als controle blijkt uit een onderzoek dat een groot verschil tussen diverse laboratoria in de sensitiviteit en specificiteit van de PCR's liet zien. Noordhoek et al. (234) beschreef in 1994 een aanzienlijke interlaboratoriumvariatie in specificiteit en sensitiviteit. Het percentage gevonden foutpositieve samples varieerde van 3% tot 77%! Een analyse uit 1996 (235) gaf aan dat slechts 5 van de 30 deelnemende laboratoria correct de aan- of afwezigheid van *M. tuberculosis* in 20 sputa vaststelden, maar hierbij moet vermeld worden dat er ook samples waren met een lage concentratie van mycobacteriën (100 bacteriën).

7. Veiligheidseisen

7.1. Inperkingsniveau mycobacteriële diagnostiek

Alle handelingen met patiëntenmateriaal dat vitale mycobacteriën zou kunnen bevatten, zoals van het *Mycobacterium tuberculosis* complex en *Mycobacterium ulcerans* dient uitgevoerd te worden in een ruimte met een BSL 2 veiligheidsinperkingsniveau. Daar waar het gaat om het werken met cultures van bovengenoemde micro-organismen dient men gebruik te maken van een laboratorium dat voldoet aan een veiligheidsinperkings-niveau BSL

3 (arbeidsomstandighedenbesluit in zake biologische agentia, hoofdstuk 4, afdeling 9, stb. 1999, 451 en Europese richtlijn 90/679/eeg).

BSL 3 houdt o.a. in dat:

1. Er een beperkte toegang is tot deze ruimte voor uitsluitend gekwalificeerd personeel.
2. Er een autoclaaf in het gebouw aanwezig dient te zijn waarin zich de BSL3 ruimte bevindt.
3. Er een onderdruk in de laboratoriumruimte gehandhaafd dient te worden.
4. De afgezogen lucht gefilterd dient te worden.
5. Het laboratorium middels een sluis van andere ruimten dient te zijn gescheiden.

8. Taakverdeling tuberculose laboratorium-diagnostiek.

Uit een internationale audit die in mei 2003 gehouden werd in Nederland is gebleken dat voor een Westers land met een lage incidentie van tuberculose de laboratorium service in Nederland niet op het verwachte peil is. De organisatie, regulatie, implementatie van richtlijnen en de bioveiligheid zijn niet op het niveau van internationale aanbevelingen.

Op dit moment zijn er nog zo'n 45 laboratoria die zich bezig houden met de diagnostiek van tuberculose. Het aantal kweken varieert van 100 tot 10.000 en het gemiddelde aantal is 1700. Waren er ten tijde van de laboratoriumenquête van 2002 vrijwel geen laboratoria die werkten onder de vereiste veiligheidscondities (BSL3- zie hierboven), thans zijn er meerdere laboratoria die een aanpassing ten aanzien van deze veiligheid hebben verricht danwel in 2006 dit zullen realiseren. De gebruikte benaderingen voor detectie van mycobacteriën variëren sterk wat betreft microscopie, kweek, moleculaire detectie, enz. Het inperkingsniveau is thans bij nog een aanzienlijk deel van de laboratoria niet op peil. In feite is er een gewenste (vereiste) gelaagdheid in de functies van diverse typen laboratoria in de laboratoriumdiagnostiek.

1. Laboratoria die geen BSL3 condities hebben en/of een beperkt aantal patiënten per jaar. Deze laboratoria zouden uitsluitend de logistiek van monsters op zich dienen te nemen. Onder BSL2 condities dienen de preparaten voor microscopie te worden vervaardigd.
2. Laboratoria met BSL3 condities. Hier zou gekweekt moeten kunnen worden op vast en vloeibaar medium en er zou een mogelijkheid moeten zijn voor het uitvoeren van moleculaire detectie van *M. tuberculosis* complex bacteriën. Eventueel zou er een indicatieve gevoeligheidsbepaling uitgevoerd kunnen worden voor bijvoorbeeld rifampicine met een moleculaire methode. Dit is vooral van belang bij vermoedelijke multi-resistentie. De behandeling kan dan in een vroeg stadium bijgesteld worden.
3. Het referentiecentrum. Op dit moment wordt er voor alle *M. tuberculosis* complex isolaten bij het RIVM (vooralsnog gratis) een identificatie, resistentiebepaling en een moleculaire epidemiologische typering uitgevoerd. Identificaties worden tweemaal per week uitgevoerd en teruggekoppeld aan het veld. In feite kan de identificatie op zeer vroeg-positieve kweken uitgevoerd worden. Van alle *M. tuberculosis* complex kweken wordt een uitgebreide resistentiebepaling gedaan, die gecontroleerd wordt op drie niveaus. Als eerstelijnscontrole worden stammen met een bekend resistentieprofiel meegenomen bij elke test. Als tweedelijnscontrole worden op geblindeerde wijze isolaten uitgewisseld met een streeklaboratorium. Als derdelijnscontrole wordt deelgenomen aan de proficiency studies van de WHO. Voor alle *M. tuberculosis* complex postieve kweken wordt een DNA fingerprintanalyse uitgevoerd. Deze

resultaten worden gebruikt voor bronopsporings- en contactonderzoek. Dit is van groot belang voor de (inter)nationale surveillance van transmissie. De micro-epidemie van MDR-TB van medio 2004, die destijds veel commotie veroorzaakte werd opgespoord via DNA fingerprintanalyse.

In de komende tijd zal onderzocht worden of het referentielaboratorium een grotere rol kan gaan spelen in de kwaliteitscontrole van perifere laboratoria.

Indien het laboratorium voor Mycobacteriële diagnostiek van het RIVM vanuit de overheid en met instemming van de NVMM en KNCV Tuberculosefonds officieel de rol van referentielaboratorium krijgt toebedeeld, waarbij tevens op rijkskosten, snelle resultaatverwerking gegarandeerd kan worden, is de werkgroep van mening dat men zich moet afvragen of het nog wel zinvol is de gevoeligheidsbepalingen in het eigen laboratorium te verrichten. Anderzijds is door implementatie van moleculaire technieken in de laboratoria het zeer wel mogelijk dat de laboratoria zelf steeds meer deze technieken gaan gebruiken voor mycobacteriële identificatie en gevoeligheid. Toch adviseert de werkgroep alle stammen voor typeringsonderzoek naar het Referentiecentrum te blijven zenden.

9. Communicatie tussen behandelaar, laboratorium en GGD

Het samenspel tussen behandelaar en laboratorium is bij tuberculose in sommige opzichten meer complex dan bij andere infectieziekten.

Allereerst wordt niet in alle ziekenhuizen het diagnostisch onderzoek naar *M. tuberculosis complex* in het eigen laboratorium uitgevoerd: in sommige gevallen gebeurt dit deels in het Streeklaboratorium of in een gespecialiseerd laboratorium (bijv. sommige snelle resistentiebepalingen), in andere gevallen wordt een deel van het onderzoek soms (resistentiebepaling) of altijd (RFLP) door het RIVM gedaan. Daarnaast is er behalve de hoofdbehandelaar altijd een medebehandelaar actief: de GGD. Voor de GGD zijn de laboratoriumuitslagen van belang voor het bepalen van de besmettelijkheid (ZN), het zeker stellen van de diagnose (kweek en typering), het bepalen van de profylactische behandeling van contacten (resistentiespectrum) en het vaststellen van transmissiewegen (RFLP). Soms is de arts tuberculosebestrijding of longarts van de GGD zelf hoofdbehandelaar.

Bovendien moet tuberculose als B-ziekte binnen 24 uur na het vaststellen van de diagnose (meestal is dit het besluit tot behandeling, al of niet op grond van microbiologische bevestiging) door de behandelend arts aan de GGD worden gemeld op grond van de Infectieziektenwet.

Het is van belang dat tussen deze partijen heldere communicatielijnen bestaan. Het op de juiste wijze aanbrengen van identificerende gegevens op elk klinisch monster volgens de aanwijzingen van het medisch-microbiologisch laboratorium, alsook het bijvoegen van klinische informatie, is natuurlijk een cruciale eerste stap. De centrale rol van het laboratorium waarnaar de behandelaar zijn klinische monsters instuurt, is daarmee een essentieel gegeven. De eerste melding door dit laboratorium aan de behandelaar van een uitslag die op tuberculose wijst dient altijd telefonisch te geschieden. Dit geldt ook voor de Streeklaboratoria die de diagnostiek voor andere laboratoria verzorgen en hun positieve uitslagen telefonisch door kunnen geven. Laboratoria die de identificatie en gevoeligheidsbepalingen verzorgen (zoals Streeklaboratorium en RIVM) melden hun bevindingen altijd rechtstreeks (telefonisch of via internet, doch altijd ook schriftelijk) aan het aanvragende laboratorium, dat de uitslagen vervolgens direct aan de behandelaar doorgeeft, zo nodig voorzien van een interpretatie (bijvoorbeeld bij verschillen tussen resistentiespectra).

Op veel plaatsen is het goed gebruik dat een kopie van een positieve uitslag betreffende tuberculose bij wijze van vooraankondiging naar de afdeling tuberculosebestrijding van de GGD wordt gestuurd, waarbij naam en adres van de patiënt worden weggelaten en alleen diens initialen, geboortedatum en geslacht worden vermeld, alsook de naam en het praktijkadres van de behandelend arts. (Dit past binnen het 'Modelconvenant voor de regionale samenwerking tussen de Gemeentelijke Gezondheidsdienst en het Microbiologisch Laboratorium', dat GGD Nederland en NVMM op 1 juli 2005 hebben gesloten.) Bovendien wordt op positieve uitslagen vermeld dat tuberculose een B-ziekte is, die binnen 24 uur na vaststelling door de behandelaar aan de GGD moet worden gemeld. De GGD kan vervolgens nagaan of van de betreffende behandelaar kort tevoren een tuberculosemelding is ontvangen en, als dat niet zo is, na enige tijd met de betreffende behandelaar contact opnemen. Een dergelijke melding is van groot belang voor het starten van bron- en contactonderzoek, maar wordt nogal eens met grote vertraging of in het geheel niet door de behandelaar gedaan.

Daarom zijn in sommige regio's specifiek op tuberculose gerichte convenanten* afgesloten tussen meldingsplichtige artsen (verenigd in stafconventen van ziekenhuizen), artsen-microbioloog en de GGD, waarin de arts-microbioloog, die immers formeel medebehandelaar is, wordt gemachtigd om namens de behandelend arts de melding van tuberculose aan de GGD te verzorgen. Het verdient aanbeveling vóór de melding eerst met de behandelaar af te stemmen, in hoeverre de diagnose tuberculose inderdaad waarschijnlijk is. Zo nodig kan de GGD vervolgens contact opnemen met de behandelaar, bijvoorbeeld als nadere klinische of epidemiologische informatie gewenst is. Mandateren van de wettelijke melding aan de ziekenhuishygiënist is niet wenselijk omdat deze niet standaard bij de individuele patiëntenzorg is betrokken. Een alternatieve meldingsweg is die door de 'tuberculosecoördinator' die in sommige ziekenhuizen is aangesteld. In bovengenoemde convenanten wordt geregeld dat de GGD de betrokken patiënt niet benadert, voordat deze door de behandelaar van de diagnose op de hoogte is gesteld. Ook is erin vastgelegd dat het medisch-microbiologisch laboratorium de laboratoriumuitslagen van elke tuberculosepatiënt in afschrift (dus niet geanonimiseerd) toestuurt aan de GGD, die immers eveneens medebehandelaar van de patiënt is. Daarmee is tegelijkertijd geregeld dat het RIVM gerechtigd is eventuele uitslagen van onderzoek bij patiënten uit de betreffende regio desgevraagd ook aan de GGD door te geven. Juist bij tuberculose immers zijn ook de latere laboratoriumuitslagen van groot belang voor de GGD, bijvoorbeeld om de profylactische behandeling van contacten in geval van een vastgestelde INH-resistentie aan te passen.

Omgekeerd ligt het voor de hand, dat behalve de hoofdbehandelaar ook de arts-microbioloog door de GGD op de hoogte gesteld wordt van de bevindingen bij het bron- en contactonderzoek.

Het voornemen is in de nieuwe Wet publieke gezondheid de laboratoria een nominatieve meldingsplicht op te leggen van alle A, B en C-ziekten, dus ook van tuberculose. Dit doet overigens niets af aan de meldingsplicht van de behandelend arts, zoals die nu al in de Infectieziektenwet is geregeld. Daarmee wordt beoogd de bestaande praktijk van vooraanmelding door het lab, die nu al op veel plaatsen langs bovenbeschreven (ingewikkelde) weg plaatsvindt, op een eenvoudige manier formeel te regelen.

Samengevat adviseert de werkgroep dus:

- het vaststellen en beschrijven van heldere communicatielijnen tussen behandelaar, medisch-microbiologisch laboratorium en GGD in elke regio;
- het bij voorkeur vastleggen van deze verhoudingen in een convenant, waarin de arts-microbioloog gemandateerd wordt om de eerste melding van tuberculose aan de GGD te doen en de rol van de GGD als medebehandelaar wordt geformaliseerd, in afwachting van een formele regeling in de nieuwe Wet publieke gezondheid.

*) voorbeeld convenant/machtiging: zie bijlage 1

10. Implementatie en geldigheidsduur

Door de werkgroep zal samen met de commissie Kwaliteit van de NVMM het traject van implementatie worden beschreven. Toetsing kan plaatsvinden aan de hand van aanbevelingen tijdens de visitaties van de laboratoria in opdracht van de visitatiecommissie van de NVMM. Deze richtlijn wordt ieder hoofd van een medisch microbiologisch laboratorium toegezonden. De geldingsduur van de richtlijn is beperkt. Tenminste ieder jaar zal de richtlijn dienen te worden geëvalueerd en zonodig bijgesteld. De commissie kwaliteit van de NVMM neemt hiertoe het initiatief.

11. Literatuur

1. Crevel R van, proefschrift 2003.
2. Gernoch PL, Enns RK, Saubolle MA and Wallace RJ. Laboratory Diagnosis of the mycobacterioses. Cumitech 16A, ASM press, 1994
3. Behandeling van (multi)resistente tuberculose. Wetenschappelijk Comité van BNWBT, 2001, Brussel.
4. Technical guide: sputum examination for tuberculosis by direct microscopy in low income countries. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, 5th edition, 2000.
5. Isenberg HD: Clinical microbiology procedures handbook. 2nd ed. ASM Press, c2004. (QW 25 C6415 2004).
6. Peterson EM et al. Comparison of direct and concentrated acid-fast smears to identify specimens culture positive for Mycobacterium spp. (1999) J Clin Microbiol. 37: 3564-3568
7. Wilkinson D and AW Sturm. Diagnosing tuberculosis in a resource poor setting: the value of sputum concentration. (1997) Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 91: 420-421
8. Scott CP et al. Comparison of C₁₈-Carboxypropylbetaine and Standard N-Acetyl-L-Cysteine-NaOH Processing of Respiratory Specimens for Increasing Tuberculosis Smear Sensitivity in Brazil. (2002) J. Clin. Microbiol. 40: 9 3219-3221
9. Thornton CG et al. Novel method for processing respiratory specimens for detection of mycobacteria by using C₁₈-Carboxypropyl betaine: blinded study. (1998) J.Clin. Microbiol. 36: 1996-2003
10. Thornton CG et al. In vitro comparison of NALC-NaOH, Tween 80, and C₁₈-carboxypropylbetaine for processing of specimens for recovery of mycobacteria. (1998) J Clin Microbiol 36:3558-3566
11. Thornton CG et al. Processing respiratory specimens with C₁₈-carboxypropylbetaine: development of a sediment resuspension buffer that contains lytic enzymes to reduce the contamination rate and lecithin to alleviate toxicity. (2002) J Clin Microbiol 40: 1783-1790
12. Garay JE. Analysis of a simplified concentration sputum smear technique for pulmonary tuberculosis diagnosis in rural hospitals. (2000) Tropical Doctor. 30: april 70-72
13. Manterola JM, Thornton CG, Padilla E, Lonca J, Corea I, Martinez E, Ausina V. Comparison of the sodium dodecyl sulfate-sodium hydroxide specimen processing method with the C₁₈-carboxypropylbetaine specimen processing method using the MB/BacT liquid culture system Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2003 Jan;22(1):35-42)
14. Scott CP, Dos Anjos Filho L, De Queiroz Mello FC, Thornton CG, Bishai WR, Fonseca LS, Kritski AL, Chaisson RE, Manabe YC. Comparison of C(18)-carboxypropylbetaine and standard N-acetyl-L-cysteine-NaOH processing of respiratory specimens for increasing tuberculosis smear sensitivity in Brazil. Clin Microbiol. 2002 Sep;40(9):3219-22.)
15. Smithwick RW, et al Use of Cetylpyridium Chloride and Sodium Chloride for decontamination of Sputum Specimens that are transported to the laboratory for the isolation of Mycobacterium tuberculosis. (1975) J Clin Microbiol. 1: 411-413
16. Banda HT, Harries AD, Boeree MJ, Nyirenda TE, Banerjee A, Salaniponi FM. Viability of stored sputum specimens for smear microscopy and culture Int J Tuberc Lung Dis. 2000 Mar;4(3):272-4).
17. Singh NP and SC Parija. The value of fluorescence microscopy of Auramine stained sputum smears for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. (1998) Southeast Asian J Trop Med Public Health: 29. 4. 860-863.
18. Somoskovi A et al. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. (2001) Chest:120. 1. 250-257.
19. Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli (1999) Int J Tuberc Lung Dis 3:1101-1105

20. Collins FM, Morrison NE, Dhople AM, Watson SR. Microscopic carried out on *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* suspension: a comparison of three staining procedures. (1980) *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 48: 402-407.
21. Gruft H. Evaluation of Mycobacteriology Laboratories: The Acid-Fast Smear (1978) *Health Lab Sci.* 1978 Oct;15(4):215-20.
22. Mathew S, Alexander C, Thyagarajan K, Krishnamurthy PV, Paramasivan CN. Evaluation of a cold staining method for acid-fast bacilli in sputum. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 1994 Jul-Sep;36(3):125-31.
23. M A Behr, S A Warren, H Salamon, P C Hopewell, A Ponce de Leon, C L Daley, P M Small Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999; 353: 444–49).
24. Hernandez-Garduno E, Cook V, Kunimoto D, Elwood RK, Black WA, FitzGerald JM Transmission of tuberculosis from smear negative patients: a molecular epidemiology study. *Thorax.* 2004 Apr;59(4):286-90).
25. Hafiz S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI. *J Clin Pathol* 1985 Sep;38(9):1073-6 Use of microwaves for acid and alcohol fast staining.. *Lancet* 1984 Nov 3;2(8410):1046
26. Kent, PT, GP Kubica. *Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory.* US Department Of Health and Human Services, CDC, Atlanta 1985)
27. De Boer, A.S., B. Blommerde, P.E.W. de Haas, M.M.G.G. Sebek, K.S.B. Lambrechts-van Wezenbeek, M. Dessens, and D. van Soolingen. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in the Netherlands (1993-2000): incidence, risk factors and consequences. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40:4004-9.
28. Anargyros P, Astill SJ, Sim IS: Comparison of improved BACTEC and Lowenstein-Jensen media for culture of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1990. 38:1288-1291.
29. Kirihara JM, Hillier SL, Coyle MS: Improved detection times for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis* with the BACTEC radiometric system. *J Clin Microbiol* 1985. 22 841-845.
30. Morgan MA, Horstmeier CD, DeYoung DR, et al : Comparison of a radiometric (BACTEC) and conventional culture media for recovery of mycobacteria from smear negative specimens. *J Clin Microbiol* 1983. 18: 364-368.
31. Park CH, Hixon DL, Ferguson CB, et al,: Rapid recovery of mycobacteria from clinical specimens using automated radiometric technique. *Am J Clin Pathol.* 1984. 81: 341-345.
32. Roberts GD, Goodman NL, Heifets L, et al: Evaluation of the BACTEC radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens . *J Clin Microbiol* 1983. 18: 689-696.
33. Hanna BA, Walters SB, Bonk SJ, et al: Recovery of mycobacteria from blood in *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)* and on Lowenstein-Jensen slant after lysis centrifugation . *J Clin Microbiol.* 1995. 33: 3315-3316.
34. Lue YA, Visot B, Brophy G: Rapid recovery of *Mycobacterium avium* complex (MAC) from blood specimens with *Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT)* [abstract U-149]. In Abstracts of 95th General Meeting of American Society for Microbiology , Washington DC, 1995, p 143.
35. Hoffner SE, Haile M, Kallenius G : A biphasic system for primary isolation of mycobacteria compared to solid medium and broth culture. *J Med Microbiol.* 1992. 37: 332-334.
36. Tortoli E, Mandler F, Bartolucci M, et al : Multicenter evaluation of a biphasic culture system for recovery of mycobacteria from clinical specimens . *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1993. 12 : 425-429.
37. Stager CE, Libonati JP, Siddiqi SH, et al : Role of solid media when used in conjunction with the BACTEC system for mycobacterial isolation and identification . *J Clin Microbiol* 1991. 29: 154-157.
38. Tenover FC, Crawford JT, Huebner RE, et al:The resurgence of tuberculosis: Is your laboratory ready ? *J Clin Microbiol .* 1993. 31: 767-770.

39. Heifets L: Rapid automated method (BACTEC system) in clinical mycobacteriology .
Seminars in Respiratory Medicine 1986. 1:242-249.
40. Middleton AM, Chadwick MV, Gaya H: Evaluation of a commercial radiometric system for primary isolation of mycobacteria over a 15-year period. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997. 16: 166-170.
41. Alcaide F, Benitez MA, Escriba JM, et al : Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB /BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA Accuprobe. J Clin Microbiol 2000. 38: 398- 401.
42. Hanna BA, Ebrahimzadeh A, Elliott LB, et al: Multicenter evaluation of the BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria. J Clin Microbiol . 1999. 37: 748-752.
43. Pfyffer GE, Cieslak C, Welscher HM, et al: Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB system and comparison with radiometric and solid culture systems. J Clin Microbiol 1997. 35: 2219-2234.
44. Sharp SE, Lemes M, Ehrlich SS, et al: A comparison of the BACTEC 9000 MB system and the Septi-chek AFB system for the detection of mycobacteria . Diagn Microbiol Infect Dis. 1997. 28: 69-74.
45. Tortoli E, Cichero P, Chirillo MG, et al : Multicenter comparison of ESP culture system II with BACTEC 460TB and with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from different clinical specimens ,including blood. J Clin Microbiol. 1998. 36:1378-1381.
46. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, et al: Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. J Clin Microbiol .2000. 38: 4167-4170.
47. Woods GI, Fish G, Plaunt M, et al: Clinical evaluation of Difco ESP Culture system II for growth and detection of mycobacteria. J Clin Microbiol .1997. 35: 121-124.
48. Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, et al: Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens . J Clin Microbiol. 2000. 37: 25-30.
49. Chew, W. K., R. M. Lasaitis, F. A. Schio, and G. L. Gilbert. 1998. Clinical evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of Mycobacterium species. J. Med. Microbiol. 47:821-7.
50. Piersimoni, C., C. Scarparo, A. Callegaro, C. P. Tosi, D. Nista, S. Bornigia, M. Scagnelli, A. Rigon, G. Ruggiero, and A. Goglio. 2001. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Lowenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. J. Clin. Microbiol. 39:651-7
51. Rohner, P., B. Ninet, C. Metral, S. Emler, and R. Auckenthaler. 1997. Evaluation of the MB/BacT system and comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. 35:3127-31
52. Somoskovi, A., C. Kodmon, A. Lantos, Z. Bartfai, L. Tamasi, J. Fuzy, and P. Magyar. 2000. Comparison of recoveries of mycobacterium tuberculosis using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Lowenstein-Jensen medium. J. Clin. Microbiol. 38:2395-7
53. Tortoli, E., P. Cichero, C. Piersimoni, M. T. Simonetti, G. Gesu, and D. Nista. 1999. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. J. Clin. Microbiol. 37:3578-82.
54. Griethuysen van, A. J., A. R. Jansz, and A. G. Buiting. 1996. Comparison of fluorescent BACTEC 9000 MB system, Septi-Chek AFB system, and Lowenstein-Jensen medium for detection of mycobacteria. J. Clin. Microbiol. 34:2391-4.
55. Drobniewski, F. A., M. Caws, A. Gibson, and D. Young. 2003. Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. Lancet Infect. Dis. 3:141-7
56. Antognoli, M. C., M. D. Salman, J. Triantis, J. Hernandez, and T. Keefe. 2001. A one-tube nested polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium bovis* in spiked milk samples: an evaluation of concentration and lytic techniques. J. Vet Diagn. Invest 13:111-116.

57. Sepkowitz, K. A., J. Raffalli, L. Riley, T. E. Kiehn, and D. Armstrong. 1995. Tuberculosis in the AIDS era. *Clin.Microbiol.Rev.* 8:180-199
58. Gori, A., F. Franzetti, G. Marchetti, L. Catozzi, and M. Corbellino. 1996. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by mtp40 nested PCR. *J.Clin.Microbiol.* 34:2866-2867
59. Das, S., S. L. Chan, B. W. Allen, D. A. Mitchison, and D. B. Lowrie. 1993. Application of DNA fingerprinting with IS986 to sequential mycobacterial isolates obtained from pulmonary tuberculosis patients in Hong Kong before, during and after short-course chemotherapy. *Tuber.Lung Dis* 74:47-51
60. Sahadevan, R., S. Narayanan, C. N. Paramasivan, R. Prabhakar, and P. R. Narayanan. 1995. Restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, India, by use of direct-repeat probe. *J.Clin.Microbiol.* 33:3037-3039
61. Thierry, D., P. Chavarot, G. Marchal, K. T. Le Thi, M. L. Ho, N. L. Nguyen, N. V. Le, S. Ledru, F. Fumoux, and J. L. Guesdon. 1995. *Mycobacterium tuberculosis* strains unidentified using the IS6110 probe can be detected by oligonucleotides derived from the Mt308 sequence. *Res.Microbiol.* 146:325-328.
62. van Soolingen, D., P. W. Hermans, P. E. de Haas, D. R. Soll, and J. D. van Embden. 1991. 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. *J.Clin.Microbiol.* 29:2578-2586
63. Yuen, L. K., B. C. Ross, K. M. Jackson, and B. Dwyer. 1993. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J.Clin.Microbiol.* 31:1615-1618.
64. Herrera, E. A. and M. Segovia. 1996. Evaluation of mtp40 genomic fragment amplification for specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens [see comments]. *J.Clin.Microbiol.* 34:1108-1113
65. Gordon, S. V., B. Heym, J. Parkhill, B. Barrell, and S. T. Cole. 1999. New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology* 145 (Pt 4):881-892.
66. Rogall, T., T. Flohr, and E. C. Bottger. 1990. Differentiation of *Mycobacterium* species by direct sequencing of amplified DNA. *J.Gen.Microbiol.* 136 (Pt 9):1915-1920.
67. Tortoli E, Lavinia F, Simonetti MT. Evaluation of a commercial ligase chain reaction kit (Abbott LCx) for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2424–6.
68. Piersimoni C, Callegaro A, Scarparo C, et al..Comparitive evaluation of the new Gen-Probe *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test and the semiautomated Abbott LCx *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3601–04.
69. Barrett A, Magee JG, Freeman R. An evaluation of the BD ProbeTec ET system for the direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory samples *J Med Microbiol* 2002. 51: 895-898
70. Iinuma Y., Senda K, Fujihara N, Saito T, Takakura S, Shimojima M, Kudo T, Ichiyama S. Comparison of the BDProbeTec ET System with the Cobas Amplicor PCR for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in Respiratory Samples. *Eur J Clin Microbiol* 2003: 22:368-371
71. Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, et al. Comparison of enhanced *Mycobacterium tuberculosis* amplified direct test with COBAS AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and extrapulmonary specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1559–62.
72. Eing BR, Becker A, Sohna A, Ringelmann R. Comparison of Roche Cobas Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* assay with in-house and culture for detection of M. tuberculosis. *J Microbiol* 1998; 36: 2023–29.

73. Gamboa F, Manterola JM, Lonca J, et al. Comparative evaluation of two commercial assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 151–57.
74. Levidiotou S, Vrioni G, Galanakis E, Gesouli E, Pappa C, Stefanou D. Four-year experience of use of the Cobas Amplicor system for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory and nonrespiratory specimens in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Jun;22(6):349-56
75. Sarmiento OL, Weigle KA, Alexander J, Weber DJ, Miller WC. Assessment by meta-analysis of PCR for diagnosis of smear-negative pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2003;41:3233-40
76. Cascina, A., A. Fietta, and L. Casali. 2000. Is a large number of sputum specimens necessary for the bacteriological diagnosis of tuberculosis? *J.Clin.Microbiol.* 38:466
77. Nelson, S. M., M. A. Deike, and C. P. Cartwright. 1998. Value of examining multiple sputum specimens in the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *J.Clin.Microbiol.* 36:467-469
78. Piersimoni C, Scarparo C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Nista D, and Bornigia S. Performance Assessment of Two Commercial Amplification Assays for Direct Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Respiratory and Extrapulmonary Specimens. *J Clin Microbiol* 2002 40: 4138-4142.
79. Finch, D.; Beaty, C.D. The utility of a single sputum specimen in the diagnosis of tuberculosis. Comparison between HIV-infected and non-HIV-infected patients. *Chest*, 1997, 1174-1179.
80. Stone, B.L.; Burman, W.J.; Hildred, M.V.; Jarboe, E.A.; Reves, R.R.; Wilson, M.L. The diagnostic yield of acid-fast-bacillus smear-positive sputum specimens. 1997, *J. Clin. Microbiol.*, 1030-1031.
81. Wu ZL, Wang AQ. Diagnostic yield of repeated smear microscopy examinations among patients suspected of pulmonary TB in Shandong province of China. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2000 Nov;4(11):1086-7.
82. Al Zahrani K, Al Jahdali H, Poirier L, Rene P, Menzies D. Yield of smear, culture and amplification tests from repeated sputum induction for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001 Sep;5(9):855-60
83. Kim SY, Park YJ, Kang SJ, Kim BK, Kang CS. Comparison of the BDProbeTec ET system with the roche COBAS AMPLICOR System for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in the respiratory and pleural fluid specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004 May;49(1):13-8.
84. Visca P, De Mori P, Festa A, Montrone ML, Amicosante M, Pucillo LP. Evaluation of the BDProbeTec strand displacement amplification assay in comparison with the AMTD II direct test for rapid diagnosis of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect*. 2004 Apr;10(4):332-4.
85. Bruijnesteijn Van Coppenraet ES, Lindeboom JA, Prins JM, Peeters MF, Claas EC, Kuijper EJ. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children. *J Clin Microbiol*. 2004 Jun;42(6):2644-50
86. Valdés L, San José E, Alvarez MD, Sarandeses A, Pose A, Chomón B, Alvarez-Dobano JM, Salgueiro M, Suárez JRR. Diagnosis of tuberculous pleurisy using the biologic parameters adenosine deaminase, lysozyme, and interferon gamma. *Chest* 1993; 103:458-465.
87. Valdés L, Alvarez D, San José E, Penela P, Valle JM, Garcia-Pazos JM, Suárez J, Pose A. Tuberculous pleurisy. *Arch Intern Med* 1998; 158:2017-2021.
88. Van Keimpema ARJ, Slaats EH, Wagenaar JPM. Adenosine deaminase activity, not diagnostic for tuberculous pleurisy. *Eur J Respir Dis* 1987; 71:15-18.
89. Sibley JC. A study of tuberculous pleurisy with effusion. *Am Rev Tuberc* 1950; 62: 314-23.
90. Barber LM et al. Glucose level in pleural fluid as a diagnostic aid. *Dis.Chest* 1957: 31:680-687.

91. Maartens G et al. Tuberculous pleural effusions: increased culture yield with bedside inoculation of pleural fluid and poor diagnostic value of adenosine deaminase. *Thorax* 1991;46:96-99.
92. Luzze H. et al. Evaluation of suspected tuberculous pleurisy: clinical and diagnostic findings in HIV-1-pos. and HIV-neg. adults in Uganda. *Int J Tuberc Dis* 2001; 5:746-753.
93. Richter C, Perenboom R, Swai ABM, Kitinya J, Chande H, Kazema RR, Chuwa LM, Mwakyusa DH, Maselle SY. Diagnosis of tuberculosis in patients with pleural effusion in an area of HIV infection and limited diagnostic facilities. *Tropical and Geographical Medicine* 1994; 46:293-297.
94. Heyderman RS, Makunike R, Muza T, Odwee M, Kadzirange G, Manyemba J, Muchedzi C, Ndemera B, Gomo ZAR, Gwanzura LKZ, Mason PR. Pleural tuberculosis in Harare, Zimbabwe: the relationship between human immunodeficiency virus, CD4 lymphocyte count, granuloma formation and disseminated disease. *Tropical Medicine and International Health* 1998; 3:14-20.
95. Relkin F, Aranda CP, Garay SM, Smith R, Berkowitz KA, Rom WN. Pleural tuberculosis and HIV infection. *Chest* 1994; 105:1338-41.
96. Cheng AFB et al. Improved recovery rate of mycobacterium tuberculosis from pleural aspirates: bedside inoculation, heparinized containers and liquid culture media. *Scand J Infect Dis* 1999; 31:485-487.
97. Mitarai S, Shishido H, Kurashima A, Tamura A, Nagai H. Comparative study of Amplicor Mycobacterium PCR and conventional methods for the diagnosis of pleuritis caused by mycobacterial infection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4:871-874.
98. De Wit D, Maartens G, Steyn L. A comparative study of the polymerase chain reaction and conventional procedures for the diagnosis of tuberculous pleural effusion. *Tubercle and Lung Disease* 1992; 73:262-267.
99. Nagesh BS, Seghal S, Jindal SK, Arora SK. Evaluation of polymerase chain reaction for detection of Mycobacterium tuberculosis in pleural fluid. *Chest* 2001; 119:1737-41
100. Kirsch CM, Kroe DM, Jensen WA, Kagawa FT, Wehner JH, Campagna AC. A modified Abram needle biopsy technique. *Chest* 1995;108:982-86.
101. Emad A. Diagnostic value of closed percutaneous pleural biopsy versus pleuroscopy in suspected malignant pleural effusion or tuberculous pleurisy in a region with a high incidence of tuberculosis: a comparative, age-dependent study. *Respir.Med* 1998;92:488-92.
102. Kirsch CM. The optimal number of pleural biopsy specimen for a diagnosis of tuberculous pleurisy. *Chest* 1997;112:702-706.
103. Menzies R, Charbonneau M. Thoracoscopy for the diagnosis of pleural diseases. *Ann Intern Med* 1991; 114:271-76
104. Levine H, Metzger W, Lacera D, Kay L. Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. *Ann Intern Med* 1970; 126:269-271.
105. Antoniskis D, Amin K, Barnes PF. Pleuritis as a manifestation of reactivation tuberculosis. *The American Journal of Medicine* 1990; 89:447-450
106. Frye MD, Pozsik CJ, Sahn SA. Tuberculous pleurisy is more common in AIDS than in non-AIDS patients with tuberculosis. *Chest* 1997; 112:393-397.
107. Scerbo J, Keltz H, Stone DJ. A prospective study of closed pleural biopsies. *Jama* 1971; 218:377-380.
108. Takagi N, Hasegawa Y, Ichiyama S, Shibagaki T, Shimokata K. Polymerase chain reaction of pleural biopsy specimens for rapid diagnosis of tuberculous pleuritis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998; 2:338-341.
109. Shriner KA, Mathisen GE, Goetz MB. Comparison of mycobacterial lymphadenitis among persons infected with human immunodeficiency virus and seronegative controls. *Clin Infect Dis* 1992; 15:601.
110. Shafer RW, Kim DS, Weiss JP, Quale JM. Extrapulmonary tuberculosis in patients with human immunodeficiency virus infection. *Medicine* 1991;70:384.

111. Bem C. Human immunodeficiency virus-positive tuberculous lymphadenitis in Central Africa: clinical presentation of 157 cases. *Int J Tuberc Dis* 1997; 1:215-219.
112. Perenboom RM, Richter C, Swai ABM, Kitinya J, Mtoni I, Chande H, Kazama RR. Clinical features of HIV seropositive and HIV seronegative patients with tuberculous Lymphadenitis in Dar es Salaam. *Tubercle and Lung Disease* 1995. 76:401-406.
113. Lee KC, Thami TA, Lalwani AK, Schecter G. Contemporary management of cervical tuberculosis. *Laryngoscope* 1992;102:60-64
114. NG WF, Kung ITM. Pathology of tuberculous lymphadenitis: A fine needle approach. *Journal of the Hong Kong Medical Association* 1990. 42:18-21.
115. Ellison E, Lapuerta P, Martin SE. Fine needle aspiration diagnosis of mycobacterial lymphadenitis. *Acta Cytologica*1999; 43:153-157.
116. Shriner KA, Mathisen GE, Goetz MB. Comparison of mycobacterial lymphadenitis among persons infected with human immunodeficiency virus and seronegative controls. *Clinical Infectious Diseases* 1992; 15:601-605.
117. Perenboom RM, Richter C, Swai ABM, Kitinya J, Mtoni I, Chande H, Kazama RR, Mwakyusa DH, Maselle SY. Diagnosis of tuberculous lymphadenitis in an area of HIV infection and limited diagnostic facilities. *Tropical and Geographical medicine* 1994;46:288-292.
118. Bekedam HJ, Boree M, Kamenya A, Liomba G, Ngwira B, Subramanyam VR, Harries AD. Tuberculous lymphadenitis, a diagnostic problem in areas of high prevalence of HIV and tuberculosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1997; 91:294-297.
119. Prasoon D. Acid-fast-bacilli in fine needle aspiration smears from tuberculous lymphadenitis. *Acta cytologica* 2000; 44:297-300.
120. Radhika S, Gupta SK, Chakrabarti A, Rajwanshi A, Joshi K. Role of culture for mycobacteria in fine-needle aspiration diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Diagn Cytopathol* 1989; 5:260-262.
121. Gupta SK, Chugh TD, Sheikh ZA, Al-Rubah NAR. Cytodiagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Acta Cytologica* 1993; 37:329-332.
122. Nataraj GG, Kurup SS, Pandit AA, Mehta PP. Correlation of fine needle aspiration cytology, smear and culture in tuberculous lymphadenitis: a prospective study. *Postgrad Med* 2002; 48:113-116.
123. Bezabih M, Mariam DW, Selassie SG. Fine needle aspiration cytology of suspected tuberculous lymphadenitis. *Cytopathology* 2002; 13:284-290.
124. Aggarwal P, Wali P, Singh S, Handa R, Wig N, Biswas A. A clinico-bacteriological study of peripheral lymphadenitis. *JAPI* 2001; 49:808-812.
125. Handa U, Palta A, Mohan H, Punia RPS. Fine needle aspiration diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Tropical Doctor* 2002; 32:147-149.
126. Geldmacher H, Taube C, Kroeger C, Magnussen H, Kirsten DK. Assessment of lymph node tuberculosis in Northern Germany. *Chest* 2002; 121:1177-1182.
127. Finfer M, Perchick K, Burstein BE. Fine needle aspiration biopsy diagnosis of tuberculous lymphadenitis in patients with and without the acquired immune deficiency syndrome. *Acta cytologica*1991; 35:325-332.
128. Artenstein AW, Kim JH, Williams WJ, Chung RCY. Isolated peripheral tuberculous lymphadenitis in adults: current clinical and diagnostic issues. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 20:876-882.
129. Van Loenhout-Rooyackers JH, Richter C. De diagnostiek en behandeling van halskliertuberculose. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000; 144: 2243-2247.
130. Goel MM, Ranjan V, Dhole TN, Srivastava AN, Mehrotra A, Kushwaha MRS, Jain A. Polymerase chain reaction vs. conventional diagnosis in fine needle aspirates of tuberculous lymph nodes. *Acta Cytol* 2001; 45:333-340.
131. Rimek D, Tyagi S, Kappe R. Performance of an IS6110-based PCR assay and the COBAS AMPLICOR MTB PCR system for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA in human lymph node samples. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug;40(8):3089-92

132. Honore-Bouakline S, Vincensini JP, Giacuzzo V, Lagrange PH, Herrmann JL Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: impact of sample preparation and DNA extraction. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2323-9
133. Boddingtonhaus B, Wichelhaus TA, Brade V, Bittner T. Removal of PCR inhibitors by silica membranes: evaluating the Amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit. *J Clin Microbiol.* 2001 Oct;39(10):3750-2
134. Klotz SA and R.L. Penn. Acid-fast staining of urine and gastric contents is an excellent indicator of myobacterial disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* 136 (1987), pp. 1197–1198
135. John GT, R. Juneja, U. Mukundan, A. Date, L. Vincent, C.K. Jacob and J.C. Shastry. Gastric aspiration for diagnosis of pulmonary tuberculosis in adult renal allograft recipients. *Transplantation* 61 (1996), pp. 972–973
136. Berean and F.J. Roberts. The reliability of acid fast stained smears of gastric aspirates specimens. *Tubercle* 69 (1988), pp. 205–208.
137. Trautner BW, Darouiche RO. Tuberculous pericarditis: optimal diagnosis and management. *Clin Infect Dis.* 2001 Oct 1;33(7):954-61
138. Fowler NO, Manitas GT. Infectious pericarditis. *Prog Cardiovasc Dis* 1973; 16:323–36.
139. Rooney JJ, Crocco JA, Lyons HA. Tuberculous pericarditis. *Ann Intern Med* 1970; 72:73–8.
140. Quale JM, Lipschik GY, Heurich AE. Management of tuberculous pericarditis. *Ann Thorac Surg* 1987; 43:653–5.
141. Cegielski JP, Devlin BH, Morris AJ, Kitinya JN, Pulipaka UP, Lema LE, Lwakatara J, Reller LB. Comparison of PCR, culture, and histopathology for diagnosis of tuberculous pericarditis. *J Clin Microbiol.* 1997 Dec;35(12):3254-7
142. Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. *Am J Surg.* 2003 Jun;185(6):567-73
143. Muneef MA, Memish Z, Mahmoud SA, Sadoon SA, Bannatyne R, Khan Y. Tuberculosis in the belly: a review of forty-six cases involving the gastrointestinal tract and peritoneum. *Scand J Gastroenterol.* 2001 May;36(5):528-32
144. Horvath KD, Whelan RL. Intestinal tuberculosis: return of an old disease. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93:692-696.Review.
145. Kim KM, Lee A, Choi KY, Lee KY, Kwak JJ. Intestinal tuberculosis: clinicopathological analysis and diagnosis by endoscopic biopsy. *Am J Gastroenterol.* 1998; 93:606-609.
146. Gan HT, Chen YQ, Ouyang Q, Bu H, Yang XY. Differentiation between intestinal tuberculosis and Crohn's disease in endoscopic biopsy specimens by polymerase chain reaction. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97:1446-51.
147. Simon HB, Weinstein AJ, Pasternak MS, Swartz MN, Kunz LJ. Genitourinary tuberculosis,review. *The Amer Jorn of Med* 1977; 63:410-420.
148. Garcia-Rodriguez JA, Sánchez JEG, Bellido JLM, Martinez IM, Hernández JT, Gorostazu JF, Avisrrior MU. Genitourinary tuberculosis in Spain: review of 81 cases. *Clin Infect Dis* 1994; 18:557-561.
149. Christensen WI. Genitourinary tuberculosis: Review of 102 cases. *Medicine* 1974; 53:379-390.
150. Kenney M, Loechel AB, LovelockFJ. Urine cultures in tuberculosis. *Amer.Rev.Resp.Dis.*1960;82:564.
151. Brühl P, Walpert J. Aktuelle epidemiologie, diagnostiek en therapie der Urogenitaltuberculose. *Dtsch.med.Wschr.*1994; 119:1121-1125.
152. Gokce G, Kilicarslan H, Ayan S, Tas F, Akar R, Kaya K, Gultekin EY. Genitourinary tuberculosis: A review of 174 cases. *Scand J Infect Dis* 2002; 34:338-340.
153. Moussa OM, Eraky I, El-Far MA, Osman HG, Gho MA. Rapid diagnosis of genitourinary tuberculosis polynerase chain reaction and non-radioactive DNA hybridization. *J Urol.* 2000; 164:584-588.
154. Sechi LA, Pinna MP, Sanna A, Pirina P, Ginesu F, Saba F, Aceti A, Turrini F, Zanetti S, Fadda G. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR analysis of urine and other

- clinical samples from AIDS and non-HIV-infected patients. *Mol Cell Probes* 1997; 11:281-285.
155. Van Vollenhoven P, Heyns CF, de Beer PM, Whitak van Heldenm PD, Victor T. Polymerase chain reaction in the diagnosis of urinary tract tuberculosis. *Urol Res.* 1996; 24:107-111.
 156. Hemal AK, Gupta NP, Rajeev TP, Kumar R, Dar L, Seth P. Polymerase chain reaction in clinically suspected genitourinary tuberculosis: comparison with intravenous urography, bladder biopsy, and urine acid fast bacilli culture. *Urology.* 2000 Oct 1;56(4):570-4
 157. Kennedy DH, Fallon RJ. Tuberculous meningitis. *JAMA* 1979;241;264-8
 158. Hosoglu S, Geyik MF, Balik I, Aygen B, Erol S, Aygencel TG, Mert A, Saltoglu N, Dokmetas I, Felek S, Sunbul M, Irmak H, Aydin K, Kokoglu OF, Ucmak H, Altindis M, Loeb M. Predictors of outcome in patients with tuberculous meningitis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:64-70.
 159. Farinha NJ, Razali KA, Holzel H, Morgan G, Novelli VM. Tuberculosis of the central nervous system in children: a 20-year survey. *J Infect.* 2000;41:61-8.
 160. Verdon R, Chevret S, Laissy JP, Wolff M. Tuberculous meningitis in adults: review of 48 cases. *Clin Infect Dis.* 1996;22:982-8.
 161. Thwaites GE, Caws M, Chau TT, Dung NT, Campbell JI, Phu NH, Hien TT, White NJ, Farrar JJ. Comparison of conventional bacteriology with nucleic acid amplification (amplified mycobacterium direct test) for diagnosis of tuberculous meningitis before and after inception of antituberculosis chemotherapy. *J Clin Microbiol.* 2004;42:996-1002
 162. Daif A, Obeid T, Yaqub B, AbdulJabbar M. Unusual presentation of tuberculous meningitis. *Clin Neurol Neurosurg.* 1992;94(1):1-5.
 163. Hooker JA, Muhindi DW, Amayo EO, Mc'ligeyo SO, Bhatt KM, Odhiambo JA. Diagnostic utility of cerebrospinal fluid studies in patients with clinically suspected tuberculous meningitis *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003 Aug;7(8):787-96
 164. Pai M, Flores LL, Pai N, Hubbard A, Riley LW, Colford JM Jr. Diagnostic accuracy of nucleic acid amplification tests for tuberculous meningitis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2003;3:633-43.
 165. Pfyffer GE, Kissling P, Jahn EM, Welscher HM, Salfinger M, Weber R. Diagnostic performance of amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test with CSF, other respiratory, and non-respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996;34:834-41.
 166. Chedore P, Jamieson FB. Rapid molecular diagnosis of tuberculous meningitis using the Gen-probe Amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test in a large Canadian public health laboratory. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2002;6:913-9
 167. Rajo MC, Perez Del Molina ML, Lado Lado FL, Lopez MJ, Prieto E, Pardo F. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis by ligase chain reaction amplification. *Scand J Infect Dis.* 2002;34 ;14-6.
 168. Caws M, Wilson SM, Clough C, Drobniowski F. Role of IS6110-targeted PCR, culture, biochemical, clinical, and immunological criteria for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3150-5.
 169. Bonington A, Strang JI, Klapper PE, Hood SV, Rubombora W, Penny M, Willers R, Wilkins EG. Use of Roche AMPLICOR *Mycobacterium tuberculosis* PCR in early diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 1998;36:1251-4.
 170. Johansen IS, Lundgren B, Tabak F, Petrini B, Hosoglu S, Saltoglu N, Thomsen VO. Improved sensitivity of nucleic acid amplification for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:3036-40
 171. Lebrun L, Espinasse F, Poveda JD, Vincent-Levy-Frebault V. Evaluation of non-radioactive DNAprobes for identification of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2476-78.
 172. Butler, WR, SP O'connor, MA Yakrus and WM Gross. 1994. Cross-reactivity of genetic probe for detection of *Mycobacterium tuberculosis* with newly described species *Mycobacterium celatum*. *J Clin Microbiol* 32:536-538

173. Suffys PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, Campos CE, Barreto AM, Portaels F, Rigouts L, Wouters G, Jannes G, van Reybroeck G, Mijs W, Vanderborght B J Clin Microbiol. Rapid identification of Mycobacteria to the species level using INNO-LiPA Mycobacteria, a reverse hybridization assay 2001;39:4477-82.
174. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. J Clin Microbiol. 2003;41:4418-20
175. Padilla E, Gonzalez V, Manterola JM, Perez A, Quesada MD, Gordillo S, Vilaplana C, Pallares MA, Molinos S, Sanchez MD, Ausina V. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA Mycobacteria and genotype Mycobacterium assays for identification of Mycobacterium species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with Mycobacterial strains. Clin Microbiol. 2004;42:3083-8.
176. Sarkola A, Makinen J, Marjamaki M, Marttila HJ, Viljanen MK, Soini H. Prospective evaluation of the GenoType assay for routine identification of mycobacteria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:642-5.
177. Cooksey, R. C., G. P. Morlock, S. Glickman, and J. T. Crawford. 1997. Evaluation of a line probe assay kit for characterization of *rpoB* mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from New York City. J. Clin. Microbiol. 35:1281-1283
178. Nash, K. A., A. Gaytan, and C. B. Inderlied. 1997. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by means of a rapid, simple, and specific RNA/RNA mismatch assay. J. Infect. Dis. 176:533-5
179. Simon A. Watterson, Stuart M. Wilson, Malcolm D. Yates, and Francis A. Drobniowski. Comparison of Three Molecular Assays for Rapid Detection of Rifampin Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* J. Clin. Microbiol 1998; 36: 1969-1973
180. El-Hajj HH, Marras SA, Tyagi S, Kramer FR, Alland D. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. J Clin Microbiol. 2001 Nov;39(11):4131-7
181. Garcia de Viedma D, del Sol Diaz Infantes M, Lasala F, Chaves F, Alcala L, Bouza E. New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):988-95
182. van Soolingen, D., P. E. de Haas, H. R. van Doorn, E. Kuijper, H. Rinder, and M. W. Borgdorff. 2000. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. J. Infect. Dis. 182:1788–1790.
183. Espasa, M., J. M. Gonzales, F. Alcaide, J. Lonca, X.-M. Manterola, E. Verdu, and P. Coll. 2002. Use of real-time PCR for detection in clinical samples genetic polymorphisms causing resistance to isoniazid and rifampin in *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Infect. 8(S1):O131.
184. S H. Rogier van Doorn, Eric C. J. Claas, Kate E. Templeton, Adri G. M. van der Zanden, Arianne te Koppele Vije, Menno D. de Jong, Jacob Dankert and Ed J. Kuijper. Detection in *Mycobacterium tuberculosis* of a Point Mutation Associated with High Level Isoniazid Resistance Directly in Clinical Samples Using Real-time PCR Technology with 3'-Minor Groove Binder-DNA Probes. J Clin Microbiol 2003;41;4630-5.
185. Marin M, de Viedma DG, Ruiz-Serrano MJ, Bouza E. Rapid Direct Detection of Multiple Rifampin and Isoniazid Resistance Mutations in Mycobacterium tuberculosis in Respiratory Samples by Real-Time PCR. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:4293-300
186. Lin SY, Probert W, Lo M, Desmond E. Rapid detection of isoniazid and rifampin resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis complex from cultures or smear-positive sputa by use of molecular beacons. J Clin Microbiol. 2004;42:4204-8.
187. Lee AS, Othman SN, Ho YM, Wong SY. Novel Mutations within the embB Gene in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2004;8:4447-9.

188. Maeda S, Tamaru A, Imai S, Hase A, Kobayashi K. Dual-Probe Assay for Rapid Detection of Drug-Resistant Mycobacterium tuberculosis by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.* 2004;42:5277-5285.
189. VRGT. Tuberculoregister België 1999.
190. Sudre P, ten Dam G, Kochi A. Tuberculosis : a global overview of the situation today. *WHO Bull.* 1992 ; 70 (2) : 149-159.
191. Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. *WHO Bull.* 1994 ; 72 (2) : 213-220.
192. Raviglione MC, Sudre P, Rieder HL, Spinaci S, Kochi A. Secular trends of tuberculosis in Western Europe. *WHO Bull.* 1993 ; 71 (3/4) : 297-306.
193. Drobniowski F, Pablos-Mendez A, Raviglione MC. Epidemiology of tuberculosis in the world. *Seminars in Resp Crit Care Med* 1997 ; 18 (5) : 419-429.
194. Surveillance of tuberculosis in Europe. Report on tuberculosis cases notified in 1997. *Euro TB (CESES/KNCV)* September 1999.
195. Beck-Sagué C, Dooley S, Hutton M, Otten J, Breeden A, Crawford J, Pitchenik A, Woodley C, Cauthen G, Jarvis W. Hospital outbreak of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis infections. *JAMA* 1992 ; 268 (10) : 1280-1286.
196. Edlin B, Tokars J, Grieco M, Crawford J, Williams J, Sordillo E, Ong K, Kilburn J, Dooley S, Castro K, Jarvis W, Holmberg S. An outbreak of multidrug-resistant tuberculosis among hospitalized patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992 ; 326 (23) : 1514-1521.
197. Centers for Disease Control. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis at a hospital New York City, 1991. *MMWR* 1993; 42 (22) : 432-434.
198. Dooley S, Jarvis W, Martone W, Snider D. Multidrug-resistant tuberculosis. *Ann Int Med* 1992 ; 117 (3) : 257-259.
199. Valway S, Greifinger R, Papania M, Kilburn J, Woodley C, DiFerdinando G, Dooley S. Multidrug-resistant tuberculosis in the New York State prison system, 1990-1991. *J Inf Dis* 1994 ; 170 : 151-156.
200. Valway S, Richards S, Kovacovich J, Greifinger R, Crawford J, Dooley S. Outbreak of multidrug-resistant tuberculosis in a New York state prison, 1991. *Am J Epid* 1994 ; 140 (2) : 113-122.
201. Centers for Disease Control. Transmission of multidrug-resistant tuberculosis from an HIV-positive client in a residential substance-abuse treatment facility - Michigan. *MMWR* 1991; 40 : 129-131.
202. PHLIS Communicable Disease Surveillance Centre. Outbreak of hospital acquired multidrug resistant tuberculosis. *CDR Weekly* 1995 ; 5 (34).
203. Bouvet E, Casalino E, Mendoza-Sassi G, et al. Nosocomial outbreak of multidrug resistant Mycobacterium bovis among HIV-infected patients. A case control study. *AIDS* 1993 ; 7 : 1453-1460.
204. Angarano G, Carbonara S, Costa D, Gori A, et al. Drug-resistant tuberculosis in human immunodeficiency virus infected persons in Italy. *Int J Tuberc Lung Dis* 1998 ; 2 (4) : 303-311.
205. Fujiwara PI, Fine Sherman L. Multidrug-resistant tuberculosis : many paths, same truth. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997 ; 1 (4) : 297-298.
206. Breatch AS, de Reiter A, et al. An outbreak of multi-resistant tuberculosis in a London teaching hospital. *J Hosp Infect* 1998 ; 22 (39) : 111-117.
207. Frieden T, Sterling T, Pablos-Mendez A, Kilburn J, Cauthen G, Dooley S. The emergence of drug-resistant tuberculosis in New York City. *N Engl J Med* 1993 ; 328 (8) : 521-526.
208. Riley L. Drug-resistant tuberculosis. *Clin Inf Dis* 1993 ; 17 : 442-446.
209. Frieden T, Fujiwara P, Washko P, Hamburg M. Tuberculosis in New York City – turning the tide. *N Engl J Med* 1995 ; 333 : 229-233.
210. Reyes H, Coninx R. Pitfalls of tuberculosis programmes in prisons. *BMJ* 1997 ; 315 : 1447-1450.

211. Drobniewski F. Tuberculosis in prisons – forgotten plague. *Lancet* 1995 ; 346 : 948-949.
212. Cohn L, Bustreo F, Raviglione M. Drug-resistant tuberculosis : review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project. *Clin Inf Dis* 1997 ; 24 : 121-130.
213. Chaulet P, Raviglione M, Bustreo F. Epidemiology, control and treatment of multi-drug-resistant tuberculosis. *Drugs* 1996 ; 52 : 103-108.
214. WHO/UIATLD working group on antituberculosis drug resistance surveillance. Antituberculosis drug resistance: is it worth measuring ? *Monaldi Arch Chest Dis* 1996 ; 51 (4) : 299-302.
215. Pablos-Mendez A, Raviglione M, Laszlo A, et al. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994- 1997. *N Engl J Med* 1998 ; 338 (23) : 1641-1649.
216. Kim SJ, Hong YP. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *Tubercle and Lung Disease* 1992 ; 73 : 219-224
217. Rieder HL, Kelly GD, Bloch AB, Cauthen GM, Snider DE. Tuberculosis at death in the United States. *Chest* 1991; 100:678-91
218. Vasankari T, Liippo K, Tala E. Overt and cryptic miliary tuberculosis misdiagnosed until autopsy *Scand J Infect Dis*. 2003; 35:794-6
219. Gelb AF, Leffler C, Brewin A, Mascatello V, Lyons HA. Miliary tuberculosis. *Am. Rev. Respir. Dis* 1973; 108:1327-33.
220. Slavin RE, Walsh TJ, Pollock AD. Late generalized tuberculosis: a clinical pathological analysis and comparison of 100 cases in the pre-antibiotic and antibiotic eras. *Medicine* 1980: 59:352-66.
221. Jones BE, Young SM, Antoniskis D, Davidson PT, Kramer F, Barnes PF Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 148:1292-97.
222. Maartens G, Wilcox PA, Benetar SR. Miliary tuberculosis: rapid diagnosis, hematologic abnormalities and outcome in 109 treated adults. *Am J Med* 1990; 89:291-6.
223. Prego V, Glatt AE, Roy V, Thelmo W, Dinksoy H, Raufman JP. Comparative yield of blood culture for fungi and mycobacteria in liver biopsy, and bone marrow biopsy in the diagnosis of fever of undetermined origin in human immunodeficiency virus- infected patients. *Arch Intern Med* 1990; 150:333-36.
224. Lombard EH, Victor T, Jordaan A, van Helden PD. The detection of *Mycobacterium tuberculosis* in bone marrow aspirate using the polymerase chain reaction. *Tuberc Lung Dis* 1994; 75: 65-69. Erratum in *Tuberc Lung Dis* 1995; 76:471.
225. Mert A, Bilir M, Tabak F, Ozaras R, Ozturk R, Senturk H, Aki H, Seyhan N, Karayel T, Aktuglu Y. Miliary tuberculosis: clinical manifestations, diagnosis and outcome in 38 adults. *Respirology* 2001; 6:217-24.
226. De Boer, A.S., B. Blommerde, P.E.W. de Haas, M.M.G.G. Sebek, K.S.B. Lambrechts-van Wezenbeek, M. Dessens, and D. van Soolingen. False-positive *Mycobacterium tuberculosis* cultures in 44 laboratories in the Netherlands (1993-2000): incidence, risk factors and consequences. *J. Clin. Microbiol.* 2002. 40:4004-4009.
227. Ramos MC, H Soini, GC Roscanni, M Jaques, MC Villares and JM Musser. 1999. Extensive cross contamination of specimen with *Mycobacterium tuberculosis* in a reference laboratory.
228. AGM van der Zanden. 2002. Spoligotyping, a tool in epidemiology, diagnosis and control of tuberculosis.
229. Risson-Noel, A., B. Gicquel, D. Lecossier, V. Levy-Frebault, X. Nassif, and A. J. Hance. 1989. Rapid diagnosis of tuberculosis by amplification of mycobacterial DNA in clinical samples. *lancet* 2:1069-1071
230. Hermans, P. W., A. R. Schuitema, D. van Soolingen, C. P. Verstynen, E. M. Bik, J. E. Thole, A. H. Kolk, and J. D. van Embden. 1990. Specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains by polymerase chain reaction. *J.Clin.Microbiol.* 28:1204-1213.

- 231.** Portillo, P., L. A. Murillo, and M. E. Patarroyo. 1991. Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J.Clin.Microbiol.* 29:2163-2168
- 232.** Kolk, A. H., A. R. Schuitema, S. Kuijper, J. van Leeuwen, P. W. Hermans, J. D. van Embden, and R. A. Hartskeerl. 1992. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a nonradioactive detection system. *J.Clin.Microbiol.* 30:2567-2575
- 233.** Nolte, F. S., B. Metchock, J. E. McGowan, Jr., A. Edwards, O. Okwumabua, C. Thurmond, P. S. Mitchell, B. Plikaytis, and T. Shinnick. 1993. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by polymerase chain reaction and DNA hybridization. *J.Clin.Microbiol.* 31:1777-1782.
- 234.** Noordhoek, G. T., A. H. Kolk, G. Bjune, D. Catty, J. W. Dale, P. E. Fine, P. Godfrey-Faussett, S. N. Cho, T. Shinnick, and S. B. Svenson. 1994. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. 32:277-284
- 235.** Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. , *J Clin Microbiol* 1996 ; 34:2522. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol.* 1996 Oct;34(10):2522-5.
- 236.** M. van der Zanden, T. Bosje, F.G.C. Heilmann, D. van Soolingen. Nosocomial transmission of tuberculosis to a nurse demonstrated by means of spoligotyping of a formalin-fixed bronchial biopsy. 2001. *The Netherlands Journal of Medicine.* 59: 152-157.
- 237.** Do Youn Park, Jee Yeon Kim, Kyung Un Choi, Jin Sook Lee, Chang Hun Lee, Mee Young Sol, Kang Suek Suh. Comparison of polymerase chain reaction with histopathologic features for diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded histologic specimens. 2003. *Arch Pathol Lab Med.* 127:326-330.
- 238.** Jackson Y.W. Li, Stephen T.H. Lo and Chi-Shing Ng. Molecular detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. 2000. *Diagnostic Molecular Pathology.* 2: 67-74.
- 239.** Hajjme Fukunaga, Tomoyuki Murakami, Toshikazu Gondo, Kazou Sugi and Tokuhiro Ishihara. Sensitivity of acid-fast staining for *Mycobacterium tuberculosis* in formalin fixed tissue. 2002. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.* 166:994-997.
- 240.** Eric Selva, Veronique Hofman, Frederick Berto, Sandra Musso, Laurent Castillo, Jose Santini, Pierre Dellamonica and Paul Hofman. The value of polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* in granulomas isolated by laser capture microdissection. 2004. *Pathology.* 77-81.
- 241.** Der-Cherng Tarng, Wei-Juin Su, Tung-Po Huang. PCR diagnosis on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues with acid-fast stain and culture negativity in chronic dialysis patients of cervico-mediastinal tuberculous lymphadenitis. 1998. *Nephrol dial transplant*
- 242.** Pa-Fan Hsiao, Chin-Yuan Tzen, Hsiu-Chin Chen, Hsin-Yi Su. Polymerase chain reaction based detection of *Mycobacterium tuberculosis* in tissues showing granulomatous inflammation without demonstrable acid-fast bacilli. 2003. *International Journal of Dermatology.* 42: 281-286.
- 243.** Juan Ruiz-Manzano, Joxe-Mari Manterola, Fredy Gamboa, Ana Calatrava, Eduardo Monso, Carlos Martinez, Vicente Ausina. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in paraffin-embedded pleural biopsy specimens by commercial ribosomal RNA and DNA amplifications kits. 2000. *Chest.* 118:648-655.
- 244.** AGM van der Zanden, AH Hoentjen, FGC Heilmann, EF Weltevreden, L Schouls and JDA van Embden. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in strained microscopic preparations. 1998. *J. Clin. Pathol.:Mol. Pathol.* 51:209-214
- 245** Daniel Vargas, Luis García, Robert H Gilman, Carlton Evans, Eduardo Ticona, Marcos Navincopa, Robert F Luo, Luz Caviedes, Clemens Hong, Rod Escombe and David A J Moore. Diagnosis of sputum-scarce HIV-associated pulmonary tuberculosis in Lima, Peru . *Lancet* 2005;364; 150-152

- 246** Heather J Zar, David Hanslo, Patricia Apolles, George Swingler and Gregory Hussey. Induced sputum versus gastric lavage for microbiological confirmation of pulmonary tuberculosis in infants and young children: a prospective study. *Lancet* 2005; 364: 130-134
- 247** Wallace R, Cohen AS. Tuberculous arthritis. A report of 2 cases with review of biopsy and synovial fluid findings. *The American Journal of Medicine* 1976: 277-282.
- 248** Iseman MD. *A clinician's guide to tuberculosis, 2000* by Lippincott Williams & Wilkins).
- 249** Chin DP, Hopwell PC, Yajko DM, Vittinghoff E, Horsburgh CR Jr, Hadley WK, Stone EN, Nassos PS, Ostroff SM, Jacobson MA, et al. Mycobacterium avium complex in the respiratory or gastrointestinal tract on the risk of M.avium complex bacteremia in patients with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis.* 1994; 169:289-95.
- 250** Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol.* 1990 Mar;28(3):495-503.
- 251** Pacios E, Alcalá L, Ruiz-Serrano MJ, Viedema DG, Rodriguez-Cr ixems M, Marin-Arriaza M, Berenguer J and Bouza E. Evaluation of bone marrow and blood cultures for the recovery of mycobacteria in the diagnosis of disseminated mycobacterial infections. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:734-7.
- 252** H.R. van Doorn, *Rapid Diagnosis and Drug Resistance of Mycobacterium tuberculosis.* Thesis, Universiteit van Amsterdam, 13 mei 2005.
- 253** Balamuragan et al. *J. Clin microbiol.* 2006: 44 1884-6

22. Lijst van aanbevelingen

Aanbeveling 1 (blz 19) (niveau 2)

Voorbehandeling 2% NALC- 2% NaOH van respiratoir materiaal is noodzakelijk voor onderzoek naar de aanwezigheid van mycobacteriën. Dit geldt niet alleen voor een kweek, maar ook voor microscopie en moleculaire technieken.

Aanbeveling 2 (blz 23) (niveau 1)

*Het patiëntenmateriaal dient de eerder beschreven voorbereiding te hebben doorgemaakt alvorens preparaten worden gemaakt. Een fluorochroom methode verdient de voorkeur als screening; een positief preparaat dient altijd bevestigd te worden met een Ziehl-Neelsen. Bij elke kleuring zal een positieve en negatieve controle moeten worden meegenomen. Bij de uitslag zal ook een schatting van de hoeveelheid aanwezige mycobacteriën gerapporteerd moeten worden, zonder dat dit van invloed mag zijn op het isolatiebeleid. Het heeft de voorkeur om direct twee preparaten te maken, een voor de fluorescentie kleuring en de tweede voor een eventuele Ziehl-Neelsen bij een positief fluorescentie resultaat. Elk materiaal met een positief microscopisch onderzoek zal met een moleculaire test onderzocht moeten worden voor identificatie van *M. tuberculosis* of een atypische mycobacterie.*

Aanbeveling 3a (blz 26) (niveau 1):

*Het voorbehandelde materiaal wordt in één vloeibaar medium en op één vaste voedingbodem geënt. De werkgroep raadt aan hiervan 1 van de twee media met antibiotica te gebruiken voor mycobacteriële kweek van materialen die mogelijk niet goed gedecontamineerd zijn. De vloeibare media worden in een automatische aflezer geplaatst, of afgelezen met het oog na 7 dagen, en daarna minimaal 1 x per week. Na drie dagen kan bij een eerste aflezing al mogelijke contaminatie herkend worden. De aflezing is wekelijks en bij voorkeur gedurende 8 weken. Als het oorspronkelijke ZN-preparaat positief was, zal de incubatie verlengd moeten worden met minimaal 4 weken en zal met speciale groeiomstandigheden rekening moeten worden gehouden. Als er groei wordt waargenomen zal een ZN-kleuring van verdachte kolonies de zuurvastheid moeten aantonen en wordt een moleculair biologische techniek aanbevolen om onderscheid te kunnen maken tussen *M. tuberculosis complex* en MOTT.*

Aanbeveling 3b (blz 26) (niveau 4):

Omdat de incubatietijd van mycobacteriële kweken lang is, verdient het aanbeveling om te zorgen dat de kwaliteit van de media (wat betreft het groeivermogen van Mycobacteriën) gecontroleerd en gegarandeerd is door de leverancier. Bij het zelfstandig bereiden van voedingsbodems is het van belang om kwalitatief en kwantitatief te controleren met langzaam groeiende mycobacteriële controle stammen. Idealiter worden twee verschillende typen vaste voedingbodems gebruikt, omdat hierdoor de kans op het gebruik van kwalitatief onvoldoende voedingsbodems wordt verkleind.

Aanbeveling 4a (blz 29) (niveau 1)

ZN-positief sputum kan met de AMTD test (amplified Mycobacterium tuberculosis direct test, Gen-Probe, San Diego, Ca) of de COBAS Amplicor M. tuberculosis test (Roche Diagnostic system, Basel, Switzerland) onderzocht moeten worden op de aanwezigheid van M. tuberculosis complex. Een laboratorium kan ook een in-house ontwikkelde PCR gebruiken, mits gevalideerd en op schrift vastgesteld volgens de geldende certificatie regels.

Aanbeveling 4b (blz 29) (niveau 4).

De werkgroep vindt dat bij materiaal afkomstig van een patiënt waarbij een sterk vermoeden bestaat op het hebben van tuberculose een negatief resultaat van zowel de ZN als bij de amplificatiemethode niet mag worden gebruikt om tuberculose uit te sluiten.

Aanbeveling 5 (blz 31) (niveau 2)

Bij de diagnostiek van verdenking op pleuritis op tuberculose moet ook een chemische analyse en een hematologisch onderzoek van het pleuravocht worden betrokken. Naast afname van vocht voor direct microscopisch onderzoek, wordt directe bedside inoculatie van pleuravocht in vloeibaar medium aanbevolen. Als alternatief kan transport naar het laboratorium plaatsvinden in een gehepariniseerde container. (Bij een negatief ZN, een negatief amplificatieresultaat en een ontbrekende alternatieve diagnose, zal onderzoek van een pleurabiopt overwogen moeten worden voordat de definitieve kweekuitslagen bekend zijn. Tenminste 2 pleurabiopten, blind of via thoracoscopie verkregen, zullen onderzocht moeten worden met histologie, amplificatie methode, ZN en kweek.

Aanbeveling 6 (blz 33) (niveau 2)

Voor de diagnostiek op verdenking van lymfkliertuberculose wordt FNA als eerste diagnosticum aanbevolen omdat deze methode in een derde van de gevallen direct tot een snelle diagnose leidt, makkelijk uitvoerbaar is en weinig complicaties kent. De commerciële PCR testen hebben nog een te lage sensitiviteit om deze in de diagnostiek van lymphadenitis op te nemen, maar met sommige in-house ontwikkelde PCR's zijn goede en snelle resultaten bereikt. Indien deze laatste wordt gebruikt, dient deze gevalideerd te zijn. Als met FNA geen microbiologische of histologische diagnose kan worden gesteld, is de volgende optie een excisie-biopsie.

Aanbeveling 7 (blz 34) (niveau 4)

Microbiologisch onderzoek (ZN en kweek) van nuchter maagsap wordt bij verdenking op pulmonale tuberculose aangeraden als geen sputum of BAL beschikbaar is. De werkgroep raadt aan op maagsap ook een M. tuberculosis complex-specifieke amplificatie te doen

Aanbeveling 8 (blz 35) (niveau 3)

Bij het vermoeden op pericarditis tuberculosa kan microscopisch onderzoek, kweek en een NAT van het verkregen pericardvocht aangewezen zijn. Voor de diagnostiek van pericarditis tuberculosa is onderzoek van pericardweefsel gevoeliger dan van pericardvocht. Het verschil is niet zo groot dat dit het aandringen op een pericardbiopsie rechtvaardigt.

Aanbeveling 9a (blz 35) (niveau 2).

Voor de diagnostiek van peritonitis tuberculosa is een gerichte biopsie van het peritoneum voor microbiologisch en histologisch onderzoek het meest sensitief.

Aanbeveling 9b (Blz 35) (niveau 4)

Als bij het vermoeden op tuberculeuze peritonitis ascites wordt afgenomen, beveelt de werkgroep aan ongeveer 5-10 ml af te nemen aan het bed van de patiënt en dit direct in een vloeibaar kweekmedium voor mycobacteriën te enten.

Aanbeveling 10 (blz 36) (niveau 2)

Voor de diagnostiek van tuberculose van de tractus digestivus zijn meerdere endoscopisch verkregen gerichte biopten uit de diepe lagen van de darmwand noodzakelijk. Naast histopathologisch onderzoek, ZN kleuring en kweek is toepassing van een amplificatiemethode op het weefselbiopsie aan te raden.

Aanbeveling 11a (blz 37) (niveau 1)

Voor de diagnostiek van urogenitale tuberculose dient driemaal een ochtendurine onderzocht te worden met auramine/ZN kleuring en gekweekt op de aanwezigheid van mycobacteriën.

Aanbeveling 11b (blz 37) (niveau 4)

Bij een sterke klinische verdenking van urogenitale tuberculose raadt de werkgroep aan ook moleculaire diagnostiek van de urine toe te passen, omdat deze een vergelijkbare sensitiviteit heeft als de kweek en tot een veel snellere diagnose kan leiden.

Aanbeveling 12 (blz 40) (niveau 2)

Voor een optimale diagnostiek van verdenking op tuberculeuze meningitis is tenminste 5 ml. liquor nodig en dient het onderzoek bij voorkeur op meerdere monsters te worden uitgevoerd tot 5 dagen na de start van therapie. Voor de diagnostiek van verdenking op tuberculeuze meningitis dient altijd moleculaire diagnostiek verricht te worden, naast de gangbare microscopie en kweek. De resultaten van de moleculaire diagnostiek kunnen echter niet gebruikt worden om tuberculeuze meningitis uit te sluiten.

Aanbeveling 13 (blz 41) (niveau 3)

Diagnostiek op gedissemineerde tuberculose dient snel uitgevoerd te worden. Meerdere materialen moeten gelijktijdig worden ingezet om de kans op snelle diagnose te vergroten: sputum, BAL-vocht of nuchtere maaginhoud, ochtend-urine. Deze materialen dienen in aanmerking te komen voor directe kleuring kweek en moleculaire detectie volgens protocol. Bij eerste negatieve resultaten dient direct weefseldiagnostiek te volgen, bij voorkeur

beenmergaspiratie en/of leverbiopsie. Bij vergrote perifere klieren wordt een dunne naaldaspiratie aanbevolen. Moleculaire detectie heeft bij beenmerg biopt de voorkeur. Indien moleculaire detectie niet voorhanden dan is heeft een lever biopt de voorkeur i.v.m. grotere kans op positieve directe kleuring en histopathologische kenmerken.

Aanbeveling 14 (blz 42) (niveau 2)

Bij een verdenking van extrapulmonale tuberculose dient altijd onderzoek plaats te vinden naar pulmonale tuberculose (besmettelijkheid). In Nederland werd in de periode 1993-2003 bij 8% van 16.386 patiënten gelijktijdig een pulmonale en een extrapulmonale vorm gediagnosticeerd.

Aanbeveling 15 (blz 42) (niveau 1)

Voor de diagnostiek van tuberculose op formaline gefixeerd materiaal, heeft een DNA amplificatie techniek de voorkeur boven een ZN gekleurd preparaat.

Aanbeveling 16 (blz 43) (niveau 1)

Voor identificatie van mycobacteriën is geen plaats meer door middel van conventionele biochemische bepalingen. Voor de herkenning van het M. tuberculosis complex voldoen de commerciële testen van Gen-Probe, Innogenetics en Hain Diagnostika uitstekend en geeft alleen Hain Diagnostika een specificatie binnen het M. tuberculosis complex.

Aanbeveling 17 (blz 44) (niveau 4)

Het verkrijgen van een snelle uitslag van een gevalideerde resistentiebepaling, is voor de behandeling van tuberculose essentieel. Daarom raadt de werkgroep aan om de stammen direct bij het waarnemen van zichtbare groei naar het laboratorium voor Mycobacteriele diagnostiek van het RIVM te zenden. De werkgroep beseft dat er nog een aantal praktische problemen zijn die hierbij opgelost moeten worden. De werkgroep vraagt zich af of het nog wel zinvol is uitgebreide MIC bepalingen in het eigen laboratorium te verrichten.

Aanbeveling 18 (blz 44) (niveau 4)

Microbiologische laboratoria met voldoende moleculaire faciliteiten zullen met commerciële testen of met sequencing de meest voorkomende resistenties voor rifampicine en INH kunnen detecteren. De werkgroep dringt aan op bevestiging van de verkregen resultaten door een referentielaboratorium (RIVM)

BIJLAGE I.

Machtiging / convenant

inzake melding als bedoeld in artikel 4 van de Infectieziektenwet.

De ondergetekenden :

- I. de heer <naam>, voorzitter van de medische staf van het <naam> Ziekenhuis, gevestigd te <adres, postcode, plaats>, handelend ter uitvoering van het besluit van de algemene vergadering van de medische staf van <datum> namens de artsen werkzaam in het <naam> Ziekenhuis, hierna te noemen: de behandelend arts

of de heer <naam>, voorzitter van de huisartsen groep (HAGRO) <naam>, gevestigd te <adres, postcode, plaats>, handelend ter uitvoering van het besluit van de HAGRO <naam>, namens de bij de HAGRO aangesloten artsen, hierna te noemen: de behandelend arts

en

- II. <naam>, directeur van het microbiologisch laboratorium <naam>, gevestigd <adres, postcode, plaats>, hierna te noemen: het laboratorium (eventueel beschikkingsbevoegdheid omschrijven)

en

- III. _____, directeur van de GGD _____, gevestigd _____, hierna te noemen: de GGD,

overwegende dat :

- a. de Infectieziektenwet voorziet in maatregelen om de gezondheid van de bevolking te beschermen tegen Infectieziekten;
- b. de Infectieziektenwet een aantal infectieziekten met name noemt, waarvan de behandelend arts de vaststelling of het vermoeden daarvan verplicht moet melden aan de GGD;
- c. de ziekteverwekkers van bedoelde Infectieziekten doorgaans worden vastgesteld door het laboratorium, dat in opdracht van de behandelend arts een onderzoek heeft verricht als bedoeld in artikel 1, lid d van de Infectieziektenwet;
- d. ondergetekenden het daarom uit praktisch oogpunt wenselijk achten, dat het laboratorium ook een vooraanmelding van de infectieziekte aan de GGD namens de behandelend arts verzorgt,

komen het volgende overeen :

1. De behandelend arts machtigt het laboratorium om namens hem/haar meldingen te doen aan de GGD, als bedoeld in hoofdstuk II van de Infectieziektenwet.
2. Het laboratorium doet de melding naar aanleiding van het resultaat van een in opdracht van de behandelend arts door het laboratorium verricht microbiologisch onderzoek, van stoffen die door de behandelend arts ten behoeve van onderzoek van het lichaam van diens patiënt zijn afgescheiden.
3. De melding door het laboratorium betreft de navolgende identificerende gegevens: de naam, adres, woonplaats en geboortedatum van de patiënt; de naam en het praktijkadres van de behandelend arts; de datum van aanvraag van het onderzoek, alsmede de naam van de ziekteverwekker.
4. Omdat het laboratorium niet alle voor melding en voor de verdere begeleiding van betrokkene relevante gegevens aan de GGD als medebehandelaar kan melden, zal de GGD naar aanleiding van de melding door het laboratorium contact opnemen met de behandelend arts, met het verzoek om aanvullende informatie over de patiënt.
5. De GGD en de behandelend arts bespreken ook welke aanvullende maatregelen er vanuit epidemiologisch gezichtspunt nodig zijn voor de bestrijding van de ziekte.
6. De GGD neemt als medebehandelaar nooit contact op met een patiënt, voordat de behandelend arts in de gelegenheid is gesteld de patiënt over de diagnose in te lichten of als blijkt dat er anderszins bezwaar bestaat tegen verder onderzoek of maatregelen.
7. De behandelend arts blijft achteraf verantwoordelijk voor het doen van de melding en voor het verstrekken van aanvullende voor de melding relevante gegevens aan de GGD, alsmede voor het onmiddellijk doen van een melding bij vermoeden van ziekten in groep A als bedoeld in de Infectieziektenwet, dan wel het doen van de melding in gevallen waarbij de arts dit noodzakelijk acht.
8. Indien het laboratorium een melding doet, stelt het de behandelend arts daarvan binnen 24 uur in kennis.
9. Deze machtiging biedt partijen verder geen vrijwaring van eventuele aanspraken of sancties die mogelijk zouden voortvloeien uit het feit dat zij jegens elkaar of derden nalatig zijn geweest in het vermoeden, vaststellen of melden van een infectieziekte.

Aldus in drievoud opgemaakt te _____, op <datum>

arts

laboratorium

GGD

Bijlage II: (Multi) resistentie tegen tuberculostatica

(Multi)-resistentie tegen tuberculostatica is wel mondiaal belangrijk, maar geen groot probleem in België en Nederland (189). Ongeveer 1% van de *M.tuberculosis* isolaten in Nederland wordt geclassificeerd als multiresistent, d.w.z. tenminste resistent tegen INH en rifampicine. In Oost-Europa en in tal van ontwikkelingslanden daarentegen neemt het aantal multiresistente tuberculosegevallen sinds enkele jaren op alarmerende wijze toe. Een nauwe samenwerking tussen longartsen, internisten-infectioloog, artsen-microbioloog is van primordiaal belang om door het tijdig instellen van een adequate therapie ook de verspreiding van multiresistente tuberculose te voorkomen.

Naar ramingen van de WHO in 1992 (190), was in 1990 een derde van de wereldbevolking besmet met de tuberkelbacil; werden er jaarlijks 8 miljoen mensen ziek (van wie 95 % in de ontwikkelingslanden) en stierven er tussen de 2 en 3 miljoen aan de gevolgen van tuberculose. Sindsdien is de toestand verslechterd. Volgens de WHO, zal het aantal nieuwe tb gevallen in het jaar 2005 stijgen tot meer dan 10 miljoen en het aantal sterfgevallen tot 3,5 miljoen per jaar (191). De ontwikkelingslanden zullen het ergst getroffen worden, vooral grote gedeelten van Afrika en Azië, waar de AIDS-epidemie steeds verder toeneemt (191). In de Westerse wereld is de incidentie van tuberculose in de loop van de 20ste eeuw gedaald, behalve tijdens de oorlogsjaren. In de periode '80-'90 is evenwel in tal van geïndustrialiseerde landen een trendbreuk ingetreden: het aantal nieuwe tuberculosegevallen is er gelijk gebleven of zelfs toegenomen. Deze nieuwe situatie kan o.a. worden verklaard door het stijgend aantal immigranten uit landen met een hoge tuberculoseprevalentie, door de verpaupering in bepaalde stadswijken (192,193), door de AIDS-epidemie en hier en daar ook door de ontmanteling van de tuberculosebestrijdingsdiensten. In de voormalige Oostbloklanden en vooral in de vroegere Sovjet Unie is het aantal tuberculosepatiënten de laatste jaren sterk toegenomen (192): in 1997 lag de incidentie er rond de 50/100.000, terwijl ze in de meeste Westerse landen minder dan 20/100.000 bedroeg (194). In Nederland wordt zoals in de meeste Westerse landen de huidige tuberculose-incidentie beïnvloed door de situatie in de ontwikkelingslanden en in Oost-Europa (189). Vanwege de toegenomen migratie.

(Multi)-resistente tuberculose is geen nieuw fenomeen. De laatste jaren hebben enkele gebeurtenissen er wel de volle aandacht op gevestigd. Tussen 1988 en 1991 zijn in talrijke ziekenhuizen in de USA micro-epidemieën van MDR TB ontstaan, waarbij overwegend HIV-positieve patiënten, maar ook enkele personeelsleden getroffen werden (195-198). Bij de HIV-geïnfecteden lag de mortaliteit bijzonder hoog: 70-90 % (198). De late diagnosestelling en het gebrek aan afdoende isolatie van de MDR patiënten werden verantwoordelijk gesteld voor de snelle uitbreiding van de ziekte (198). Ook in andere instellingen binnen de USA, zoals gevangenissen (199, 200), centra voor druggebruikers (201), onthaalcentra voor daklozen en op sommige plaatsen in Europa en Zuid-Amerika (202-206) hebben zich de laatste jaren, voornamelijk bij aids-patiënten, dergelijke MDR TB epidemieën voorgedaan. In 1991 werd in New York City bij 33 % van de aldaar geregistreerde tuberculosepatiënten bacteriële resistentie aangetroffen tegen minstens één tuberculostaticum en bij 19 % tegen zowel INH als RMP (207). Het was de vergevorderde ontmanteling van de tuberculose bewakingsstructuren die de situatie uit de hand had doen lopen (205, 207, 208). Door drastische maatregelen (vooral betere patiëntenbewaking, o.m. door het systematisch toepassen van DOT) konden sindsdien de incidentie van tuberculose en de ontwikkeling en verspreiding van MDR kiemen opnieuw ingedamd worden (209). In vele landen is het de toename van MDR gevallen in penitentiaire instellingen (waar de tuberculoseprevalentie 5 tot

10 en soms zelfs 50 maal hoger ligt dan het nationaal gemiddelde) (210), die de aandacht van de verantwoordelijke instanties en van talrijke niet-gouvernementele organisaties op dit onrustwekkend probleem gevestigd heeft. Vooral in de ex-Sovjet Unie is de toestand in de gevangenissen tijdens het laatste decennium bijzonder alarmerend geworden. Een studie van het Rode Kruis in het Centraal Penitentiair Hospitaal van Bakoe (Azerbeidzjan) toonde aan dat 89 % van de in perifere gevangenissen met eerstelijnsmiddelen behandelde patiënten positief bleven en resistentie hadden ontwikkeld (24 % waren MDR) (210). In 1990-1991 werd ook in New York in 32 % van de onderzochte tuberkelbacterie-stammen bij gevangenen MDR vastgesteld (211). Cohn (212) heeft 63 studies over MDR, die gepubliceerd werden tussen 1985 en 1994, geanalyseerd en aangetoond dat de prevalentie van MR het grootst is in landen of regio's die geen DOTS toepassen (meestal Derde Wereldlanden) of waar de bevoorrading van antituberculeuze middelen ontoereikend is (212-214). Het probleem heeft dus te maken met de kwaliteit van het tuberculosebestrijdingsprogramma. Immigratie uit die gebieden is in veel Westerse landen een van de oorzaken van MDR (215).

De mechanismen waardoor bacteriële resistentie tegen tuberculostatica ontstaat zijn dezelfde in het geval van mono-, poly- of multiresistentie. Steeds gaat het om de selectie en vermenigvuldiging van spontane mutanten ten gevolge van therapiefouten. Een correct behandelingsregime en het toepassen van DOT volstaan om de meest frequente oorzaken van (multi)-resistentie uit te schakelen. Bacteriële resistentie ontstaat langzaam en werkt eigenlijk als een soort tijdbom. Een inadequate behandeling leidt tot resistentie die pas na meerdere weken, maanden of zelfs jaren tot uiting kan komen. Een contactbesmetting met resistente kiemen kan vele jaren later evolueren tot een besmettelijke longtuberculose, die op haar beurt het resistentiepatroon zal overdragen. Uit ieder geval van secundaire resistentie volgt telkens weer na een zekere tijdsperiode primaire resistentie. Bij HIV-geïnfecteerden zijn de latentietijden zowel voor het ontstaan van secundaire als van primaire resistentie aanmerkelijk korter. Daar waar efficiënte tuberculosebestrijding toegepast wordt, neemt eerst het aantal verworven en pas later ook het aantal primaire resistenties af (216). Alleen door op ononderbroken wijze overal ter wereld adequate chemotherapie toegankelijk te maken voor alle tuberculosepatiënten, zal men kunnen verhinderen dat de verspreiding van (multi)-resistentie een epidemiologische situatie doet ontstaan die nog erger is dan die van vóór het antibiotisch tijdperk.

In de afgelopen jaren is het niveau van resistentie van *M. tuberculosis* in Nederland vrijwel onveranderd gebleven. Resistentie tegen tenminste één tuberculostaticum wordt in ongeveer 14% van de isolaten gevonden, terwijl multi-resistentie (gedefinieerd als resistentie tegen tenminste INH en rifampicine) wordt gevonden bij ongeveer 1% van de tuberculose patiënten. Transmissie van MDR-TB bleef in Nederland tot nu toe beperkt tot enkelvoudige overdrachten een klein deel van de gevallen. Begin 2004 werd voor de eerste keer transmissie gevonden van een multi-resistente stam vanuit een illegale Oost-Europese bron naar negen Nederlandse personen. Hiervan ontwikkelden twee personen een actieve tuberculose. (Persoonlijke mededeling)