

NVMM Richtlijnen

Mycobacteriële Laboratoriumdiagnostiek

2015

Deze richtlijnen zijn een uitgave van de
Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM)

Ontwerp en layout:
Arnold Herrewegh, AWegh Graphics,
Driebergen-Rijsenburg

Inhoudsopgave	<u>3</u>
Voorwoord	<u>10</u>
Hoofdstuk 1 - Inleiding	<u>12</u>
Algemene inleiding	<u>12</u>
Werkwijze van de werkgroep	<u>13</u>
Financiële belangenverstrengeling/onafhankelijkheid werkgroepleden	<u>14</u>
Doelgroepen	<u>15</u>
Hoofdstuk 2 - Materiaal	<u>17</u>
Patiëntmaterialen voor diagnostiek van mycobacteriële infectie	<u>17</u>
Hoofdstuk 3 - Microscopie	<u>20</u>
Uitgangsvraag	<u>20</u>
Inleiding	<u>20</u>
Zoekvragen	<u>20</u>
Selectiecriteria literatuur	<u>21</u>
Samenvatting van de literatuur	<u>21</u>
1. Welke kleurmethode heeft de voorkeur?	<u>21</u>
2. Dient microscopische diagnostiek op direct of op voorbehandeld materiaal te worden uitgevoerd?	<u>22</u>
3. Wat is de minimale analyseduur van microscopisch onderzoek?	<u>22</u>
4. Is er een voorkeur voor op 'kwik-lamp' of op 'LED-lamp' gebaseerde microscopie?	<u>22</u>
5. Aan welke kwaliteitseisen moet betrouwbare microscopie voldoen?	<u>23</u>
6. Dient een positieve auramine te worden bevestigd met een andere techniek?	<u>23</u>
7. Is het van belang auramine/ZN positieve preparaten te graderen?	<u>24</u>
8. Welke methode van graderen verdient de voorkeur?	<u>25</u>
Overige overwegingen	<u>27</u>
Hoofdstuk 4a - Kweek	<u>34</u>
Voorwoord	<u>34</u>
Deel 1A - Respiratoire materialen voor onderzoek op <i>M. tuberculosis</i> complex	<u>35</u>
Uitgangsvraag	<u>35</u>
Inleiding	<u>35</u>
Zoekvragen	<u>36</u>
Selectiecriteria literatuur	<u>36</u>

Literatuur per zoekvraag	37
1. Geeft de combinatie van kweken op vast medium en in vloeibaar medium een hogere opbrengst bij Mtb?	37
Samenvatting van de literatuur	38
Reproduceerbaarheid	38
Overige overwegingen	39
2. Wat is de meest effectieve voorbehandeling voor de kweek?	39
Samenvatting van de literatuur	40
Reproduceerbaarheid	40
Overige overwegingen	40
3. Bij welke temperatuur moet worden geïncubeerd?	41
4. Wat is de detectiegrens van de kweek?	42
5. Hoe te handelen bij een positieve vloeibare kweek?	42
Overige overwegingen	42
Deel 1B - Kweek van niet-respiratoire materialen op <i>M. tuberculosis</i> complex	44
Pleuravocht	44
Pleurabiopt	45
Lymfklieren	45
Maaginhoud	45
Pericardvocht	45
Peritoneum	46
Darmmateriaal	46
Urine	46
Liquor	46
Hoofdstuk 4b - Kweek NTM	53
Kweek van respiratoire en niet-respiratoire materialen op niet-tuberculeuze mycobacteriën.	53
Uitgangsvraag	53
Inleiding	53
Zoekvragen	54
Selectiecriteria literatuur	54
Literatuur per zoekvraag	54
1. Wat is de meest effectieve voorbehandeling voor de kweek?	54
Overige overwegingen	55
2. Geeft de combinatie van kweken op vast medium en in vloeibaar medium (MGIT) een meerwaarde?	55

Overige overwegingen	57
3. Bij welke temperatuur moet worden geïncubeerd?	58
Overige overwegingen	59
Hoofdstuk 5 - Identificatie	64
Uitgangsvraag	64
Inleiding	64
Zoekvragen	65
Selectiecriteria literatuur	65
Samenvatting van literatuur	65
Overige overwegingen	68
Hoofdstuk 6 - Moleculaire Detectie	73
Uitgangsvraag	73
Inleiding	73
Zoekvragen	74
Selectiecriteria literatuur	75
Samenvatting van literatuur per zoekvraag	75
1. Wat is het effect van de voorbehandeling?	75
2. Welke NAT dient te worden gebruikt?	75
Respiratoir materiaal	75
Niet-respiratoir materiaal	76
Liquor	77
Lymfklieren	77
Pleuravocht en -biopten	78
Overige materiaalsoorten	78
3. Wordt een NAT verbeterd door meerdere monsters te testen?	79
4. Moet een positieve NAT worden bevestigd?	79
5. Moet een NAT snel worden uitgevoerd?	80
6. Kan de NAT de auraminekleuring vervangen?	80
7. Welke controles moeten worden meegenomen?	81
8. Kan de NAT de kweek vervangen?	82
Bijlage 1: Zoekcriteria literatuur voor respiratoir materiaal	90
#1 Pulmonary TB (Tuberculosis, MTB, TB)	90
#2 PCR (Polymerase chain reaction, PCR)	90
#3 Time limit (2009-2014) (Entrez/Mesh/Publication Date)	90

Bijlage 2.: Zoekcriteria literatuur voor niet-respiratoir materiaal	90
#1 Extra-pulmonary TB (Tuberculosis, MTB, TB)	90
#2 PCR (Polymerase chain reaction, PCR)	91
#3 Time limit (2009-2014 (Entrez/Mesh/Publication Date))	91
Hoofdstuk 7 - Moleculaire Typering	103
Moleculaire typering van <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex.	103
Uitgangsvraag	103
Inleiding	103
Zoekvragen	103
Selectiecriteria literatuur	104
Samenvatting van literatuur	104
1. Wat is het discriminerend vermogen van de VNTR typeringsmethode?	104
2. Hoe reproduceerbaar is VNTR typering (inter- en intra-laboratorium)?	105
3. Wat is de stabiliteit van DNA fingerprints verkregen middels VNTR typering?	105
4. Wat is de (toekomstige) plaats van "Whole Genome Sequencing" in de moleculaire epidemiologie van tuberculose?	106
Praktische handreikingen	108
Hoofdstuk 8 - Resistentie	112
Resistentieonderzoek van mycobacteriën	112
Uitgangsvragen	112
Inleiding	112
Zoekvragen	113
Selectiecriteria literatuur	113
Literatuur per zoekvraag	113
Samenvatting van literatuur	113
1. Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor <i>M. tuberculosis</i> .	113
2. Pyrazinamide	117
Tweedelijnsmiddelen	120
Kwaliteitscontrole	121
Overige overwegingen	121
3. Hoe presteren beschikbare commerciële methoden voor moleculaire detectie van resistentie in gebieden met lage TB incidentie en lage resistentiepercentages?	123
3.1 GeneXpert MTB/RIF	123
3.2 GenoType MTBDRplus	123

3.3	GenoType MTBDRs/	124
	Overige overwegingen	125
4.	Fenotypische resistentiebepaling voor NTM	127
	Overige overwegingen	129
Hoofdstuk 9 - IGRA		138
Praktische uitvoering van laboratoriumdiagnostiek voor infecties met tuberculosebacteriën door middel van Interferon Gamma Release Assays		138
	Uitgangsvraag	138
	Inleiding	138
	Beschrijving van de verschillende testen	138
	QuantIFERON-TB Gold In-Tube assay	139
	T-SPOT.TB assay	139
	Deelvragen	139
	Selectiecriteria literatuur (Tot en met december2014)	140
	Samenvatting van de literatuur per zoekvraag	140
1.	Welke condities zijn van invloed op de uitslag van een IGRA ?	140
	Patiëntvariabelen die de testresultaten kunnen beïnvloeden	142
	Overige overwegingen	144
	Conditie tot incubatie in het laboratorium	145
	Overige overwegingen	146
	Incubatiecondities	147
	Overige overwegingen	148
	Overige condities	148
	Overige overwegingen	149
2.	Wat is de testvariatie van de IGRA?	149
	Repeatability	149
	Reproducibility	150
	Within-person variability	150
	Totale Testvariatie	151
3.	Is vermelding kwantitatieve uitslagen van meerwaarde?	153
	Overige overwegingen	154
Hoofdstuk 10 - Communicatie		163
	Organisatie en communicatie	163
	Wetgeving en melding	163

GGD (mede)behandelaar	164
Hoofdstuk 10 - Kwaliteit	167
Kwaliteitscontrole	167
Bijlage - Aanbevelingen	171
Aanbevelingen - Microscopie	171
Aanbevelingen - Kweek	172
Aanbevelingen - Kweek NTM	173
Aanbevelingen - Identificatie	174
Aanbevelingen - Moleculaire Detectie	175
Aanbevelingen - Moleculaire Typering	176
Aanbevelingen - Resistentie	177
Aanbevelingen - IGRA	179
Aanbevelingen - Communicatie	181
Voorgestelde kwaliteitsnormen	182

VOORWOORD

Voorwoord

In 2006 heeft de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) een richtlijn gepubliceerd voor de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose (<http://www.nvmm.nl/richtlijnen>). Deze is in nauwe samenwerking met GGD-artsen tuberculosebestrijding en met afgevaardigden uit de Nederlandse Vereniging Artsen Longziekten en Tuberculose (NVALT), Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot bestrijding der Tuberculose (KNCV), Nederlandse Internisten Vereniging (NIV) en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) tot stand gekomen. De tuberculose-diagnostiek in Nederland kreeg verder aandacht tijdens internationale visitaties in 2003, 2008 en 2013. In 2012 is er een aparte richtlijn gemaakt voor het veilig werken met mycobacteriën (Veilig werken aan betere kwaliteit: Laboratoriumdiagnostiek van Tuberculose in de praktijk, NVMM/CiB). Er is een Nationaal Plan Tuberculosebestrijding (2011-2015) opgesteld met een aantal aanbevelingen. Het doel van dit plan is om bij een dalende incidentie van tuberculose toch een optimale tuberculosebestrijding in Nederland na te streven. In dit plan wordt voor gebruik van het juiste inperkingsniveau (BSL3) en voor een schaalvergroting gepleit. Er wordt ook gepleit voor instelling van een officieel nationaal referentielaboratorium en voor de ontwikkeling van een gestructureerd netwerk voor de diagnostiek van tuberculose, met een beperkt aantal laboratoria en goede kwaliteitsbewaking, zowel intern als extern.

In 2012 heeft een enthousiaste groep artsen-microbioloog en moleculair microbiologen besloten de richtlijn van 2006 bij te werken, in samenwerking met de bovengenoemde organisaties. Omdat inmiddels ook de nontuberculeuze mycobacteriën in toenemende mate worden herkend als verwekkers van ziekte, is in deze richtlijn ook de isolatie, identificatie en antimicrobiële gevoeligheid van deze groep mycobacteriën opgenomen. De interferon-gamma release assays hebben een vaste plaats in de Nederlandse tbc-bestrijding gekregen en voor de laboratoriumuitvoering is een (nieuw) hoofdstuk in deze richtlijn gereserveerd.

Het verschijnen van deze richtlijn valt samen met de nieuwe uitgave van het "Handboek Tuberculose" in 2015 (KNCV, Tuberculosefonds, Commissie voor Praktische Tuberculosebestrijding). In dit handboek is informatie te vinden over de organisatie van de Nederlandse tbc-bestrijding, de wetgeving, de melding en surveillance en de epidemiologie. Het handboek bevat een groot aantal veranderingen ten opzichte van de vorige editie uit 2008 en is te downloaden op: <http://www.kncvtbc.nl/sites/publickncv.antenna.nl/files/regelgeving/10.300.pdf>.

Samenstelling Werkgroep

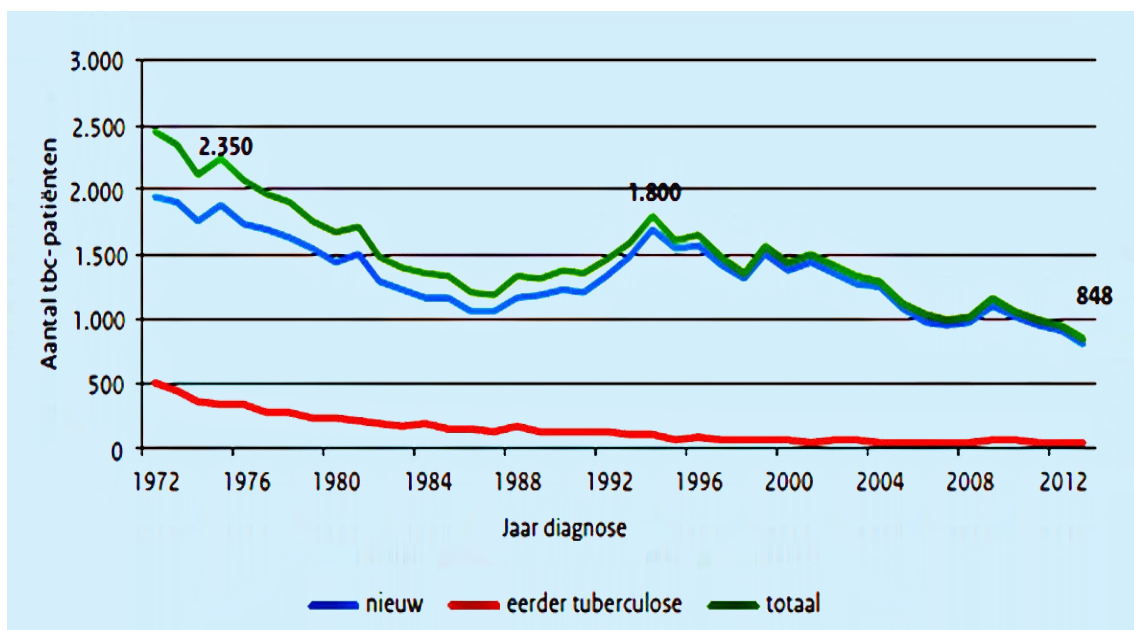
- Dr. S. Vainio, VUmc, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Amsterdam
 - Drs. M. Scholing, afdeling Medische Microbiologie, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, GGD Amsterdam
 - Dr. B. Mulder, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Hengelo
 - Dr. A.G.M. van der Zanden, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Hengelo (vanuit werkgroep Medische Moleculaire Microbiologie)
 - Dr. J. de Steenwinkel, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Rotterdam
 - Dr. J. van Ingen, RadboudUMC, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen
 - Dr. G. de Vries, KNCV Tuberculosefonds, Den Haag (namens KNCV)
 - Dr. C. Richter, afdeling Interne Geneeskunde/Infectieziekten, Rijnstate Ziekenhuis, Arnhem (namens VIZ)
 - Dr. M. Bakker, Erasmus MC, afdeling Longziekten, Rotterdam (namens NVALT)
 - Dr. J.W.A. Rossen, afdeling Medische Microbiologie, UMCG, Groningen
 - Drs. W. de Lange, afdeling Longziekten, UMCG, Groningen (namens NVALT)
 - Drs. M. Mensen, afdeling GGD, Amsterdam (namens CPT)
 - Dr. F. Vlaspoolder, Laboratorium voor Medische Microbiologie, Maasstadziekenhuis Rotterdam
 - Prof. dr. D. van Soolingen, Nationale tuberculose Referentielaboratorium, RIVM (namens RIVM)
 - Prof. dr. E.J. Kuijper, Laboratorium voor Medische Microbiologie, LUMC, Leiden
-

Algemene inleiding

Het genus *Mycobacterium* bevat drie hoofdgroepen; het *M. tuberculosis*-complex, *M. leprae*, en de zogenaamde nontuberculeuze mycobacteriën (NTM).

Tuberculose wordt meestal veroorzaakt door *Mycobacterium tuberculosis*, één van de subspecies van het *M. tuberculosis*-complex. Met de huidige moleculaire technieken kunnen alle subspecies relatief makkelijk worden geïdentificeerd. Andere subspecies dan *M. tuberculosis* zijn de minder vaak gevonden *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis caprae*, *M. canetti*, *M. oryxis*, *M. bovis BCG*, *M. pinnipedi*, *M. mungii* en *M. microti*. Het is vooral vanwege de verschillen in de epidemiologie van de mycobacteriën van de diverse subspecies, maar ook in het kader van de verschillende gevoeligheid voor pyrazinamide dat een onderscheid van belang is.

Figuur 1.1 Aantal patiënten met tuberculose, 1972-2013 (bron: [RIVM surveill lance rapport, 2014](#))



Het aantal tbc-patiënten in Nederland is in de laatste tien jaar met 38% gedaald (zie [Figuur 1.1](#)). In 2013 is in Nederland bij ongeveer 850 mensen tuberculose gediagnosticeerd ([Tuberculose in Nederland 2013](#); [RIVM surveillance rapport](#); [Slump E, Erkens CGM, van Hunen R, de Vries G, Schimmel HJ, van Soolingen](#)). Dit is een daling ten

opzichte van 2012, toen 962 patiënten werden gemeld. Nederland behoort daarmee tot de landen met de laagste tbc incidentie in Europa en de wereld. Tuberculose komt in Nederland vaker voor bij personen geboren in het buitenland (eerstegeneratieallochtonen) en tweedegeneratieallochtonen. Bijna 75% van het aantal tbc-patiënten in 2013 is geboren in het buitenland. Het aantal patiënten met multiresistente tuberculose in Nederland schommelt de laatste vijf jaar tussen de 1-2% per jaar. Alle MDR-tbc-patiënten in 2013 waren afkomstig uit het buitenland.

In de NTM kunnen thans tenminste 150 species onderscheiden worden, waarvan de meeste in ons milieu kunnen worden aangetroffen. Hoewel de incidentie van tuberculose in veel landen daalt, neemt de incidentie van infecties door NTM juist toe. Gebaseerd op het aantal inzendingen naar het RIVM, werd in Nederland de incidentie geschat op 1,7/100.000/jaar (J van Ingen, proefschrift 2009 Nijmegen; Nontuberculous mycobacteria; from gene sequences to clinical relevance).

Werkwijze van de werkgroep

We volgen de aanbevelingen van de NVMM richtlijn, waarvan het initiatief voor ontwikkeling en beheer onder auspiciën van de NVMM valt, én die direct betrekking heeft op de medische vakinhoudelijke beroepsuitoefening van NVMM leden, én die het volledige protocol van ontwikkeling, autorisatie en revisie van de NVMM heeft doorlopen. Bij de opstelling van de richtlijn is de benadering van "evidenced based richtlijn ontwikkeling (EBRO)" gekozen waarin de systematische literatuuranalyse centraal staat. Voor de diverse onderwerpen van de richtlijn zijn subgroepen gevormd die volgens het CBO-richtlijnformaat (<http://www.diliguide.nl>) de literatuur hebben verzameld van 2007 tot 2013. Er zijn uitgangsvragen en zoekvragen geformuleerd die zijn besproken met alle leden van de werkgroep. De kwaliteit van de artikelen is door werkgroepleden beoordeeld en de geselecteerde artikelen zijn vervolgens gegradeerd naar de mate van het gewicht van bewijs (GRADE waarderingssysteem). 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 volgden de conclusies en aanbevelingen.

Voor de beoordeling van het niveau en formulering van conclusies en aanbevelingen is de volgende gradering aangehouden:

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.

De volgende indeling is gebruikt voor de methodologische kwaliteit van de individuele studies:

- A1. Systematische reviews die tenminste enkele onderzoeken van A2-niveau betreffen, waarbij de resultaten van afzonderlijke onderzoeken consistent zijn.
- A2. Onderzoek ten opzichte van een referentietest, waarbij van tevoren criteria zijn gedefinieerd voor de te onderzoeken test en voor een referentietest, met een goede beschrijving van de test en de onderzochte klinische populatie:
 - het moet een voldoende grote serie van opeenvolgende patiënten betreffen
 - er moet gebruik zijn gemaakt van tevoren gedefinieerde afkapwaarden
 - de resultaten van de test en de 'gouden standaard' moeten onafhankelijk zijn beoordeeld
 Bij situaties waarbij multiële, diagnostische tests een rol spelen, is er in principe een onderlinge afhankelijkheid en dient de analyse hierop te zijn aangepast, bijvoorbeeld met logistische regressie.
- B. Vergelijking met een referentietest, beschrijving van de onderzochte test en populatie, maar niet de kenmerken die verder onder niveau A staan genoemd
- C. Niet-vergelijkend onderzoek
- D. Mening van deskundigen, bijvoorbeeld de werkgroepleden

Financiële belangenverstremeling/onafhankelijkheid werkgroepleden

Voor ontwikkeling van deze richtlijn werd financiering verkregen van de NVMM. Alle werkgroepleden hebben verklaard de afgelopen 3 jaar niet actief te zijn geweest in relatie tot het onderwerp van de richtlijn, waarbij er sprake was van sponsoring door de industrie. Er is geen sprake van belangenverstremeling die bijdrage van individuele werkgroepleden aan de ontwikkeling van deze richtlijn in de weg staat.

Doelgroepen

De primaire doelgroep van deze richtlijn is de leden van de NVMM. De richtlijn is samengesteld met andere beroepsgroepen en extern deskundigen van public health (GGD), 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).

Omdat de NVMM richtlijnen en revisietermijn van maximaal 5 jaar kennen, blijft de samenstelling van de werkgroep gehandhaafd gedurende de revisietermijn van de richtlijn. De werkgroepleden beoordelen de noodzaak tot het reviseren van een richtlijn en de aanbevelingen op basis van nieuwe of praktijkervaring.

Hoofdstuk 2

MATERIAAL

Patiëntmaterialen voor diagnostiek van mycobacteriële infectie

Patiëntmateriaal dat wordt aangeboden voor mycobacteriële diagnostiek kan van vele aard zijn en moet aan een aantal criteria voldoen:

- Patiëntmateriaal dat onderzocht wordt met het doel de initiële gevoeligheid van de mycobacteriën voor antibiotica te bepalen, dient vóór het begin van de therapie te worden afgenomen.
- 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 patiëntmaterialen (zoals sputum) meerdere monsters worden aangeboden voor diagnostiek.
- De patiëntmonsters moeten zo snel mogelijk naar het laboratorium worden verzonden om overgroei door andere micro-organismen dan mycobacteriën te voorkomen. Wordt de kweek in een ander laboratorium uitgevoerd dan dient het materiaal binnen 24 uur in dat laboratorium aanwezig te zijn en dient tot verzending bewaard te worden bij 4°C.

Tabel 2.1 Patiëntenmaterialen voor diagnostiek van mycobacteriële infectie

Materiaal-soort	Methode	Hoeveelheid	Commentaar
Expectoratie van sputum	ochtendsputum	5-10 ml	Ochtendsputum, bij voorkeur apart verzameld op 3 opeenvolgende dagen voor kweek (n=3) en voor PCR (n=2)
Inductie van sputum	Vernevelen met 5-10% fysiologisch zout	5-10 ml	
Materiaal met bronchoscopie verkregen	BAL, bronchus secreet, materiaal via BAL	5-10 ml	Expectoratie van sputum na de BAL kan zeer waardevol extra materiaal zijn
Dunne darminhoud	Stringtest	1-2 ml	Als alternatief voor sputumonderzoek
Maagsap	Nuchtere maaginhoud	Via heveling met fysiologisch zout ongeveer 20ml	Onmiddellijk na afname neutraliseren met een Na ₂ CO ₃ buffer (eindconcentratie ± 7 mg Na ₂ CO ₃ per mL sample)
Feces		1-2 gram	Alleen zinvol bij vermoeden op intestinale tuberculose

Materiaal-soort	Methode	Hoeveel-heid	Commentaar
Urine	Gewassen och-tendurine	Meer dan 15 ml, tweemaal herh-alen	Bij miliaire tuberculose en bij urogeni-tale tuberculose zinvol
Bloed, been-merg-mate-riaal	Met commerciële bloedkweek-sys-temen voor mycobacteriën	10-20 ml	Beenmerguitstrijk kan voor microscopie gebruikt worden
Liquor	Punctie	Tenminste 5 ml	Opbrengst neemt toe bij herhaald onderzoek van liquor
*Pericardvocht	Punctie	5-20 ml	Transport in container, ook bedside enting in vloeibare medium
*Ge-wrichtsvocht	Punctie	5-20 ml	Kweken (en histologie) van synovia biopten hebben een grotere opbrengst dan vocht
*Peritoneaal-vocht	Punctie	5-20 ml	De werkgroep raadt aan ascites ook bedside te enten in vloeibare kweek-media
Peritoneumbi-opt	Gerichte biopsie		Hogere opbrengst dan ascites, combi-neer met histologisch onderzoek
Pleuravocht	Punctie	5-10 ml	Pleurabiopten leveren een hogere opbrengst; bedside enting in vloeibare media wordt aangeraden
Weefsel, par-affinecoupes	Voor moleculaire diagnostiek		Volgens lokale protocollen en contacten met de afdeling Pathologie
Weefsel	Biopsie		Voor kweek ongefixeerd materiaal, droog transporteren in steriel buis
Lymfeklier	Dunne naald as-piratie (FNA) of excisie biopsie		Ook bij lagere temperaturen op ver-rijkte media incuberen. Bij voorkeur ook een kweek zonder voorbehandeling
Huidbiopt	Bij voorkeur niet desinfecteren		Ook bij lagere temperaturen op ver-rijkte media incuberen. Bij voorkeur ook een kweek zonder voorbehandeling.

*Er zijn geen studies voorhanden waarin de kweekopbrengst in verschillende hoeveelheden lichaamsvloeistoffen met elkaar zijn vergeleken.

Hoofdstuk 3

MICROSCOPIE

Uitgangsvraag

Welke methode van microscopische detectie is het meest effectief om tuberculose aan te tonen? Hierbij is het van belang een zo hoog mogelijke gevoeligheid (sensitiviteit) te combineren met zo weinig mogelijk fout-positieve resultaten (behoud van specificiteit).

Inleiding

Het direct microscopisch onderzoek van materiaal op de aanwezigheid van mycobacteriën blijft een belangrijke eerste diagnostische stap. Daarnaast zijn huidige richtlijnen voor isolatie en contactonderzoek voornamelijk gebaseerd op de bevindingen bij microscopisch onderzoek.

De specificiteit van deze methode is zeer hoog (>90%) en de sensitiviteit is afhankelijk van de gebruikte techniek, het patiëntenmateriaal, de voorbereiding en de ervaring van de microscopist. Er is berekend dat voor het microscopisch aantonen van zuurvaste staven in een Ziehl-Neelsen (ZN) preparaat van een gedecontamineerd en geconcentreerd sputummonster een minimale hoeveelheid van 5.000 tot 10.000 staven per milliliter noodzakelijk is ([Hobby, 1973](#); [Toman, 2004](#)). Ter vergelijking, de sensitiviteit van een kweek is ongeveer 10 tot 100 KVE/ml sputum ([Kent, 1985](#)). Gezien de soms geringe aantallen staven bij een actieve tuberculose varieert de gevoeligheid van microscopische diagnostiek tussen de 25-65 % ([Singh, 1998](#); [Ba, 1999](#); [Gruft, 1978](#); [Kent, 1985](#)). Enkele (zeldzame) micro-organismen kunnen ook aankleuren in een zuurvaste kleuring, zoals *Nocardia* spp., *Rhodococcus* spp. en *Legionella micadadei* ([Kent, 1985](#)).

Zoekvragen

1. Welke kleurmethode heeft de voorkeur?
2. Dient microscopische diagnostiek op direct of op voorbehandeld materiaal te worden uitgevoerd?
3. Wat is de minimale analyseduur van microscopie?
4. Is er een voorkeur voor microscopie met een kwik-lamp of een LED-lamp?
5. Aan welke kwaliteitseisen moet een betrouwbaar uitgevoerde microscopie voldoen?
6. Dient een positieve auramine kleuring te worden bevestigd met een andere techniek?
7. Is het van belang auramine/ZN positieve preparaten te graderen?
8. Welke methode van graderen verdient de voorkeur?

Selectiecriteria literatuur

Pubmed search dd. 02.04.2014: ("mycobacterium tuberculosis"[MeSH Terms] OR ("mycobacterium"[All Fields] AND "tuberculosis"[All Fields])) OR "mycobacterium tuberculosis"[All Fields]) AND ("microscopy"[MeSH Terms] OR "microscopy"[All Fields]) OR ("benzophenoneidum"[MeSH Terms] OR "benzophenoneidum"[All Fields] OR "auramine"[All Fields]) OR (ziehl[All Fields] AND Neelsen[All Fields]) AND (hasabstract[-text] AND "humans"[MeSH Terms]). Vervolgens is er een selectie gemaakt van voor de zoekvraag relevante literatuur. Tevens zijn referenties van relevante artikelen nagezocht en is gebruik gemaakt van nationale richtlijnen en Policy Statements van de WHO

Samenvatting van de literatuur

1. Welke kleurmethode heeft de voorkeur?

De huidige ZN methode is na een aantal belangrijke aanpassingen ontstaan uit Koch's alkaline methyleenblauw kleuring ([Somoskovi, 2001](#)). Bij de ZN methode wordt verhit carbolfuchsine gebruikt om de celwand van de mycobacterie te penetreren. Bij deze verhitting van ZN preparaten, een essentiële stap, komen giftige dampen (phenol) vrij. De "koude" Kinyoun kleuring is een aanpassing van de klassieke ZN methode, waarbij de verhitting-stap wordt vervangen door kleuring met een hogere concentratie carbolfuchsine. Sinds de introductie van een auramine O-gebaseerde kleurmethode (met groen-gele fluorescentie) in 1938 worden de zogenaamde fluorochroomkleuringen gebruikt voor het aantonen van zuurvaste staven. Met fluorochroom gekleurde preparaten dienen dezelfde dag nog beoordeeld te worden omdat de fluorescentie-intensiteit snel vermindert.

De auramine O-rhodamine B gebaseerde methode ([Truant, 1962](#)) heeft een geel-oranje fluorescentie en vereist voor een optimaal resultaat een andere filterinstelling welke afhankelijk is van de gebruikte microscoop ([Bird, 2000](#)). Er zijn aanwijzingen dat deze combinatie sensitiever en specifiek is dan auramine O alleen ([Kalich, 1977](#); [Somoskovi, 2001](#)). Deze kleurstoffen kunnen in hetzelfde kleurschema worden toegepast, en de auramine O-rhodamine B kleuring heeft, afhankelijk van de gebruikte kleurstofsamenstelling, eenzelfde duur (20-30 minuten). Kleurschema's en fabrikanten van kleurstoffen zijn in de beschikbare literatuur helaas vaak slecht beschreven. Er bestaan aanbieders van kleurstoffen voor een snelle gemodificeerde auramine O kleuring ([Hendry, 2009](#)), maar deze zijn niet vergeleken met de auramine O-rhodamine kleuring. Een artikel ([Sethi, 2003](#)) beschrijft een hogere sensitiviteit van auramine O-rhodamine B preparaten indien geïncubeerd bij 37°C in plaats van bij kamertemperatuur. De uitkomsten van een systematische review naar de

sensitiviteit, specificiteit en toegevoegde waarde van fluorochroom kleuring versus ZN of Kinyoun kleuringen laten zien dat fluorescentie microscopie (FM) een hogere sensitiviteit en eenzelfde specificiteit heeft en de werklust vermindert door het gebruik van een lagere vergroting ([Steingart, 2006a](#); [Steingart, 2006b](#)).

2. Dient microscopische diagnostiek op direct of op voorbehandeld materiaal te worden uitgevoerd?

De standaardprocedure voor een microscopisch preparaat is het direct aanbrengen van sputum op het objectglaasje. Het is echter ook mogelijk het sputum te decontamineren en te concentreren om de sensitiviteit te verhogen. Deze methoden van voorbehandeling worden uitgebreid beschreven in 'hoofdstuk 4 - Kweek'. In een systematische review concluderen onderzoekers ([Steingart, 2006a](#); [Steingart, 2006b](#)) dat sputum monsters voorbehandeld door middel van decontaminatie en concentratie een gemiddeld hogere sensitiviteit hebben dan bij direct aanbrengen van materiaal met een gelijkblijvende specificiteit. De WHO beveelt dit niet standaard aan vanwege onvoldoende bewijs voor de toename van sensitiviteit en beschouwt de benodigde elektriciteit voor centrifuge als een probleem in ontwikkelingslanden ([WHO, 2009](#)).

3. Wat is de minimale analyseduur van microscopisch onderzoek?

Een studie beschrijft meer-positieve tellingen in een auramine preparaat bekeken gedurende 1 minuut dan voor een ZN gedurende 4 minuten ([Bennedsen, 1966](#)). Het CDC beveelt aan om van een ZN preparaat totaal tenminste 300 gezichtsvelden van drie parallelle lanen bij een 1000x vergroting te beoordelen, overeenkomend met ongeveer 15 minuten per preparaat ([ATS, 2000](#)). Bij FM 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 ([ATS, 2000](#)). Omdat dit slechts 1-2 minuten in beslag neemt, meent de werkgroep dat er naar moet worden gestreefd om het gehele preparaat te beoordelen.

4. Is er een voorkeur voor op 'kwik-lamp' of op 'LED-lamp' gebaseerde microscopie?

De WHO adviseert om in alle gevallen op light-emitting diodes (LED) gebaseerde fluorescentie microscopie te introduceren als vervanging van ZN-lichtmicroscopie en FM met behulp van een kwiklamp ([WHO, 2010](#)). Vergeleken met de op een kwiklamp gebaseerde techniek (conventionele FM) zijn de LED lampen goedkoper en minder

onderhoudsbehoefstig. LED lampen zijn duurzaam, niet giftig en hebben geen opwarmtijd nodig. Daarnaast is de fluorescentie ook zonder donkere kamer goed te beoordelen. LED-FM is uitgebreid vergeleken met de ZN kleuring in zowel een hoog- als laagendemische setting. In vergelijkende studies tussen LED-FM en conventionele FM scoort LED-FM ten minste even goed ([Marais, 2008](#); [van Deun, 2008](#); [Trusov, 2009](#), [Minion, 2011](#)). Vergelijkende studies van commerciële LED-FM systemen in een hoog-endemische setting laten kleine of niet-significante verschillen zien tussen de verschillende commerciële systemen ([Affolabi, 2010](#); [Albert, 2010](#)).

5. Aan welke kwaliteitseisen moet betrouwbare microscopie voldoen?

De Canadese richtlijn van 2007 ([Canadian Tuberculosis Standards, 2007](#)) beveelt aan om bij iedere kleuring een positieve en een negatieve controle preparaat mee te kleuren, en ook bij iedere nieuwe batch kleurstoffen. In de recente richtlijn van 2014 ontbreekt deze aanbeveling, maar de werkgroep is van mening dat altijd een positieve controle moet worden meegenomen, en bij minder of gelijk aan drie preparaten ook een negatieve controle. Preparaten hoeven niet individueel te worden gekleurd om kruiscontaminatie te voorkomen. Omdat sterk positieve preparaten de negatieve preparaten kunnen contamineren, zijn kleurbakjes niet aan te raden. Negatieve preparaten hoeven niet (steekproefsgewijs) te worden herbekeken door een tweede analist. Negatieve preparaten hoeven niet te worden bewaard totdat de definitieve kweekuitslag bekend is. Positieve preparaten kunnen worden bewaard tot de definitieve kweekuitslagen bekend zijn om hierop PCR en moleculaire resistentie te verrichten en middels typering contaminatie te helpen opsporen; dit wordt echter niet standaard aanbevolen.

“Routine” auramines hoeven niet binnen 24 uur na aankomst van het materiaal op het laboratorium te worden gerapporteerd. Auramine kleuringen die cito zijn aangevraagd, dienen wel op dezelfde dag worden gerapporteerd; bij sterke verdenking op tuberculose ook in het weekend.

6. Dient een positieve auramine te worden bevestigd met een andere techniek?

Sommige richtlijnen bevelen aan een positieve auramine te bevestigen met behulp van een ZN preparaat. Huidige richtlijnen en WHO ([Gilpin, 2007](#); [WHO, 2010](#)) adviseren voor de microscopische diagnostiek het gebruik van een fluorochroomkleuring zonder confirmatie met een ZN. In een Nederlandse studie bleek van de 141 auramine-positieve respiratoire materialen bevestigd met een tuberculosekweek 22.7%

negatief in de ZN-kleuring. Tevens waren 19/25 (76%) auramine-positieve en kweek-positieve materialen met een niet-tuberculeuze mycobacterie (NTM) ook ZN-positief ([den Hertog, 2013](#)). Er valt dus geen waarde toe te kennen aan de ZN-kleuring ter confirmatie van een positieve auramine.

De sensitiviteit en specificiteit van een nucleïnezuur amplificatie test (NAT) zijn uitstekend voor zowel respiratoire als non-respiratoire patiëntenmaterialen met een positieve ZN of auramine (zie hoofdstuk moleculaire detectie). Afhankelijk van de gebruikte methode kunnen NAT resultaten binnen enkele uren tot dagen beschikbaar zijn ter confirmatie van de microscopische bevindingen. De werkgroep is daarom van mening dat een positieve auramine bevestigd dient te worden middels NAT.

De werkgroep adviseert een ZN-kleuring te verrichten op alle auramine-positieve materialen die niet kunnen worden bevestigd door een NAT. Het is gewenst om een positieve auramine gevolgd door een negatieve TBC PCR te onderwerpen aan een NTM PCR. Er zijn op dit moment echter te weinig publicaties over de diagnostische waarde van een NTM PCR op direct materiaal die een aanbeveling rechtvaardigen.

7. Is het van belang auramine/ZN positieve preparaten te graderen?

Enkele studies tonen de relatie aan tussen de kans op transmissie van tuberculose en de uitkomst van de laboratoriumdiagnostiek ([Shaw, 1954](#); [Grzybowski, 1975](#); [van Geuns, 1975](#)). Deze studies concluderen dat patiënten met microscopie-positieve preparaten van de luchtwegen (zonder decontaminatie- en concentratiestap) besmettelijker zijn dan in geval van alleen kweekpositieve tuberculose en kweek-negatieve tuberculose (uitkomst middels tuberculine huid test, X-thorax en follow up tot 6 maanden na diagnose indexcasus). Een negatief ZN-preparaat betekent echter niet dat er geen kans is op verspreiding. Na het bestuderen van de epidemiologie van 1574 patiënten met TB in San Francisco, bleek dat 17% van de secundaire gevallen waren besmet door ZN negatieve patiënten ([Behr, 1999](#)). Deze waarneming is bevestigd in Canada bij 791 patiënten ([Hernandez-Garduno, 2004](#)) en in Nederland bij 1285 patiënten ([Tostmann, 2008](#)), waarbij de bron voor kweekpositieve secundaire gevallen in respectievelijk 15% en 13% van de casus ZN-negatieve patiënten waren. In de studies die een verband tussen de mate van positieve microscopie en transmissie van tuberculose onderzoeken, zijn de parameters 'graderingmethode' en 'transmissie' vaak matig gedefinieerd en worden auramine en ZN resultaten niet gespecificeerd. Een Finse studie beschrijft de uitkomsten van een tweejarige follow up van contacten van microscopie-positieve en -negatieve kweekbevestigde tuberculose patiënten ([Liippo, 1993](#)). Van de 609 contacten van 134 index gevallen ontwikkelden er vier actieve tuberculose, allemaal behorend tot de contacten van patiënten met

meer dan 10 zuurvaste staven per gezichtsveld. Dit werd bevestigd in een Nederlandse studie, waaruit bleek dat een index casus met meer dan tien zuurvaste staven per gezichtsveld een zeer belangrijke risicofactor was voor het ontstaan van meer dan vijf Mantoux-positieve contacten en contacten met een actieve tuberculose ([Lohmann, 2012](#)). In Sudan was een langere duur van klachten en een ZN-uitslag van meer dan 10 zuurvaste staven per gezichtsveld een significante voorspeller van het ontstaan van symptomatische huisgenoten onder 514 tuberculose patiënten ([El-Sony, 2002](#)). In twee studies was een significant hoger aantal huisgenoten tuberculine huid test (THT) positief als de index casus bij microscopie van sputum meer dan 10 zuurvaste staven per gezichtsveld had ([Tornee, 2004](#); [Akhtar, 2009](#)).

De besmettelijkheid van tuberculose patiënten op basis van een auraminegradering bij een spontaan opgehoest sputum is weinig onderzocht, laat staan in het geval van een BAL of andere respiratoire materialen. Omdat positief materiaal uit de BAL kan worden beschouwd als open tuberculose, meent de meerderheid van de werkgroep dat het zinnig is dit ook te graderen als ware het een sputum.

8. Welke methode van graderen verdient de voorkeur?

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 ([Bronkhorst, 1949](#)). Hierbij wordt in niet geconcentreerd (!) patiëntmateriaal het aantal zuurvaste staven weergegeven in een schaal van +1 (tot 40 zuurvaste staven in het gehele preparaat) tot +5 (≥ 120 zuurvaste staven/10 gezichtsvelden). In andere landen dan Nederland wordt een vergelijkbare methode gebruikt, de zgn. indeling van Gaffky, waarbij in een schaal van 1 tot 10 de dichtheid wordt berekend ([Gaffky, 1884](#)). 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. Er bestaat ook een omrekeningsfactor voor fluorochroomkleuringen, die bij lagere vergroting beoordeeld worden. [Tabel 3.1](#) toont de semikwantitatieve uitslag zoals door het CDC aanbevolen ([ATS, 2000](#)).

Omdat alleen bij een index casus met meer dan tien zuurvaste staven per gezichtsveld bij microscopisch onderzoek een significant verhoogd risico is aangetoond op het ontstaan van meer dan vijf Mantoux-positieve contacten en contacten met een actieve tuberculose ten tijde van de screening (zie hierboven), is de werkgroep van mening dat een separate gradering op direct materiaal geen toegevoegde waarde heeft en gradering op basis van een auraminekleuring volstaat. De meeropbrengst van een

Tabel 3.1 Gradering van positieve auramine preparaten met hulp van aantal zuurvaste staven per gezichtsveld (gv)

Ziehl-Neelsen (1000X)	Auramine (250X)	Auramine (450X)	Auramine (630X)	Uitslag
1-9/100gv	1-9/100gv	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+

auraminekleuring op geconcentreerd en gedecontamineerd materiaal ten opzichte van de methode volgens Bronkhorst is met name te verwachten in de laag positieve monsters. De werkgroep adviseert om auraminepositieve sputummonsters te graderen volgens [Tabel 3.1](#) zoals voorgesteld door het CDC (zie [Tabel 3.1](#)).

Het verdient aanbeveling om in overleg met de lokale GGD de wens voor gradering op direct materiaal (volgens Bronkhorst) in een convenant op te nemen.

Conclusies	
Niveau 1	Een fluorescentiekleuring op gedecontamineerd en geconcentreerd respiratoir materiaal verhoogt de sensitiviteit van de microscopie.
Niveau 2	LED microscopie heeft de voorkeur boven conventionele fluorescentiemicroscopie met een kwiklamp op grond van milieuaspecten en gebruiksgemak.
Niveau 2	De toegevoegde diagnostische waarde van een ZN-kleuring om een positieve auramine op direct respiratoir materiaal te confirmeren, is laag.
Niveau 2	Een hoge graad van positieve microscopie correleert met de mate van transmissie van tuberculose.
Niveau 2	De combinatie auramine O-rhodamine B is sensitiever en specifiekere dan auramine O alleen.
Niveau 4	De ZN-kleuring kan toegepast worden om de aanwezigheid van zuurvaste staven anders dan <i>M. tuberculosis</i> complex vast te stellen in auramine positief, maar tuberculose PCR negatief materiaal.

Overige overwegingen

Twee belangrijke zaken hebben een rol gespeeld om de Ziehl-Neelsen kleuring voor het aantonen van zuurvaste staven te modificeren en zelfs te vervangen door andere kleuringen: toxiciteit en gevoeligheid. 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. Een nadeel van een koude kleuring is dat de ontkleuringsstap geschiedt met een minder sterke zoutzure oplossing, zodat bijvoorbeeld bovengenoemde zeldzame micro-organismen niet ontkleuren en in eerste instantie ten onrechte aangemerkt worden als NTM. Om de giftige dampen te voorkomen is de magnetron een goed alternatief voor de verwarming van de preparaten ([Hafiz, 1984](#))

Het principe van de fluorochroomkleuring verschilt niet met de ZN kleuring, alleen is hier de carbolfuchsine vervangen door een fluorochroom en is verhitting niet nodig. Het is mogelijk een positief auramine preparaat na ontvetting met aceton en een ontkleuring (30 minuten met mengsel van gelijke delen aceton en 95% ethanol) geschikt te maken voor een ZN kleuring ([Kent, 1985](#)).

Er zijn verschillende factoren die een fout-negatief resultaat van de zuurvaste kleuring kunnen geven. Als de ontkleuringstap met zoutzure alcohol te lang is zal alle carbolfuchsine 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 voorbewerking is het materiaal niet meer geschikt voor kweek. Bloedige materialen zullen een behandeling moeten ondergaan om de erythrocyten te lyseren die anders het microscopisch onderzoek bemoeilijken. Fout-positieve resultaten ontstaan door bijvoorbeeld gebruik van een buffer of vloeistof die gecontamineerd is met saprofytaire 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.

Aanbevelingen

De werkgroep raadt aan een fluorescentiekleuring op gedecontamineerd en gecontamineerd respiratoir materiaal uit te voeren omdat dit de sensitiviteit van de microscopie verhoogt.

De werkgroep is van mening dat auramine-preparaten in zijn geheel moet worden beoordeeld en adviseert bij microscopisch onderzoek altijd een positieve controle mee te nemen en bij minder of gelijk aan drie preparaten ook een negatieve controle. Voor de beoordeling van een ZN-kleuring is 15 min (totaal 300 velden) gebruikelijk.

Met fluorochroom gekleurde preparaten dienen dezelfde dag nog beoordeeld te worden omdat de fluorescentie-intensiteit snel vermindert. Cito-auramines moeten dezelfde dag worden gerapporteerd; bij sterke verdenking op tuberculose ook in het weekend.

Voor zowel respiratoire en niet-respiratoire materialen is een fluorochroomkleuring eerste keus, bij voorkeur de auramine O-rhodamine B kleuring.

Auramine-positieve preparaten hoeven niet langer geconfirméerd te worden door middel van een ZN-kleuring, maar dienen wel met een moleculaire test te worden onderzocht voor identificatie van *M. tuberculosis* complex

Bij de microscopische uitslag zal ook een schatting van de hoeveelheid aanwezige mycobacteriën gerapporteerd moeten worden (zie [Tabel 3.1](#)). Het verdient aanbeveling om in overleg met de lokale GGD de wens voor gradering op direct materiaal in een convenant op te nemen.

Referenties

Affolabi D, Torrea G, Odoun M, Senou N, Ali Ligali M, Anagonou S, Van Deun A. Comparison of two LED fluorescence microscopy build-on modules for acid-fast smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010 Feb;14(2):160-4.

Akhtar S, Rathi S K. Multilevel modeling of household contextual determinants of tuberculin skin test positivity among contacts of infectious tuberculosis patients, Umerkot, Pakistan. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80: 351–358.

Albert H, Manabe Y, Lukyamuzi G, Ademun P, Mukkada S, Nyesiga B, Joloba M, Paramasivan CN, Perkins MD. Performance of three LED-based fluorescence microscopy systems for detection of tuberculosis in Uganda. *PLoS One.* 2010 Dec 28;5(12): e15206.

American Thoracic Society, Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children.. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 Vol 161. pp 1376–1395

Ba F, Rieder HL. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3:1101-1105

Behr MA, Warren SA, Salamon H, Hopewell PC, Ponce de Leon A, Daley CL, Small PM. Transmission of Mycobacterium tuberculosis from patients smear-negative for acid-fast bacilli. *Lancet* 1999;353:444–49.

Bennedsen J, Olesen Larsen S. Examination for tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Scand J Respir Dis* 1966;47:114-20.

Bird BR, Madison BM. Use Of Fluorochrome Staining For Detecting Acid-Fast Mycobacteria, CDC Current Laboratory Practice Series, December 2000 (www.cdc.gov/dls/lta/TB_Fluorochrome/fluorochrome.pdf)

Bronkhorst W, Kraan J K. De clinische betekenis van de bacillendichtheid in tuberculeus sputum. *Ned Tijdschr Geneesk* 1949; 93:1299–1307.

Canadian Tuberculosis Standards 6th Edition, 2007. http://www.phac-aspc.gc.ca/tbpc-latb/pubs/pdf/tbstand07_e.pdf

Collins FM, Morrison NE, Dhople AM, Watson SR. Microscopic carried out on Mycobacterium leprae and M tuberculosis suspension: a comparison of three staining procedures. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1980;48:402-407.

El-Sony A, Enarson D, Khamis A, Baraka O, Bjune G. Relation of grading of sputum smears with clinical features of tuberculosis patients in routine practice in Sudan. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:91-97

Gaffky GTA. Ein Beitrag zum Verhalten der Tuberkelbacillen im Sputum. *Mitteilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* 1884; 2: 126-130. [German]

van Geuns HA, Meijer J, Styblo K. Results of contact examination in Rotterdam, 1967-1969. *Bull Int Union Tuberc* 1975;50:107-21

Gilpin C, Kim SJ, Lumb R, Rieder HL, Van Deun A; Working Group on Sputum Smear Microscopy. Critical appraisal of current recommendations and practices for tuberculosis sputum smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 Sep; 11(9):946-52.

Gruft H. Evaluation of Mycobacteriology Laboratories: The Acid-Fast Smear. *Health Lab Sci.* 1978 Oct;15(4):215-20

Grzybowski S, Barnett GD, Styblo K. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull Int Union Tuberc* 1975; 50:90-106.

Hafiz S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI. Use of microwaves for acid and alcohol fast staining. *J Clin Pathol* 1985 Sep;38(9):1073-6

Hendry C, Dionne K, Hedgepeth A, Carroll K, Parrish N. Evaluation of a rapid fluorescent staining method for detection of mycobacteria in clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2009 Apr;47(4):1206-8. doi: 10.1128/JCM.02097-08. Epub 2009 Feb 25.

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).

den Hertog AL, Daher S, Straetemans M, Scholing M, Anthony RM. No added value of performing ZN on auramine positive direct smears of respiratory samples for the detection of TB and exclusion of NTM. *Int J Tuberc Lung Dis* 2013 17(3):1-6.

Hobby GL, Holman AP, Iseman MD, et al. Enumeration of tubercle bacilli in sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 1973;4:94-104.

Kalich R, Hállová R, Kalfin E, Kubín M, Lubieńska B, Miková Z, Szaro A. Comparison of different methods of fluorochrome staining of mycobacteria.. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1977;21(2):174-82

Kent, PT, GP Kubica. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. *US Department Of Health and Human Services, CDC, Atlanta* 1985)

Liippo KK, Kulmala K, Tala EOJ. Focusing tuberculosis contact tracing by smear grading of index cases. *Am Rev Respir Dis* 1993;148:235-6

Lohmann EM, Koster BFPJ, le Cessie S, Kamst-van Agterveld MP, van Soolingen D, Arend SM. Grading of a positive sputum smear and the risk of Mycobacterium tuberculosis transmission. *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16(11):1477-1484

Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselning AC, Beyers N, Wasserman E, van Soolingen D, Warren RM. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis*. 2008 Jul;15;47(2):203-7. doi: 10.1086/589248.

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.

Minion J, Pai M, Ramsay A, Menzies D, Greenaway C. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a low-incidence setting. *PLoS One*. 2011;6(7):e22495. doi: 10.1371/journal.pone.0022495. Epub 2011 Jul 21.

Richards OW, Kline EK, Leach RE. Demonstration of tubercle bacilli by fluorescence microscopy. *Am Rev Tuberc*. 1941;44:255-266

Sethi S, Sharma M, Sengupta C, Mohandas K, Sharma SK. Enhanced detection of Mycobacteria stained with rhodamine auramine at 37 degrees C. *Indian J Pathol Microbiol*. 2003 Jul;46(3):521-3.

Shaw JB, Wynn-Williams N. Infectivity of pulmonary tuberculosis in relation to sputum status. *Am Rev Tuberc* 1954;69:724-32

Singh NP and SC Parija. The value of fluorescence microscopy of Auramine stained sputum smears for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1998;29(4):860-863.

Somoskovi A et al. Lessons from a proficiency testing event for acid-fast microscopy. *Chest* 2001;120(1);250-257

Steingart KR, Ng V, Henry M et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006a;6:664-74

Steingart KR, Henry M, Ng V, Hopewell PC, Ramsay A, Cunningham J, Urbanczik R, Perkins M, Abdel Aziz M, Pai M. Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis* 2006b;6:570-81

Truant JP, Brett WA, Thomas W. Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull.* 1962 Jun;10:287-96.

Trusov A, Bumgarner R, Valijev R, Chestnova R, Talevski S, Vragoterova, Neeley ES. Comparison of Lumin LED fluorescent attachment, fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen for AFB diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13(7):836-41

Toman's tuberculosis case detection, treatment, and monitoring: questions and answers. Edited by T Frieden. – 2nd ed. 2004

Tornee S, Kaewkungwal J, Fungladda W, Silachamroon U, Akarasewi P, Sunakorn P. Risk factors for tuberculosis infection among household contacts in Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;35:375–383.

Tostmann A, Kik SV, Kalisvaart NA, Sebek MM, Verver S, Boeree MJ, van Soolingen D. Tuberculosis transmission by patients with smear-negative pulmonary tuberculosis in a large cohort in the Netherlands. *Clin Infect Dis.* 2008 Nov 1;47(9):1135-42. doi: 10.1086/591974.

van Deun A, Chonde TM, Gumusboga M, Rienthong S. Performance and acceptability of the FluoLED Easy module for tuberculosis fluorescence microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008 Sep;12(9):1009-14.

World Health Organization. (2010). *Fluorescent light emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement.* http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501613_eng.pdf

World Health Organization. International Standards for Tuberculosis Care (ISTC), 2nd edition december 2009

Yeager HJ, Lacy J, Smith L, et al. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am Rev Respir Dis* 1967;95:998–1004.

Hoofdstuk 4A

KWEEK

Voorwoord

Alvorens patiëntmateriaal voor microbiologisch onderzoek in te sturen is het belangrijk te beslissen het materiaal aan te bieden voor een kweek op alle mycobacteriële soorten, of voor een kweek op alleen *M. tuberculosis* complex (Mtb), of juist voor een kweek op andere mycobacteriën dan Mtb (bekend als de 'niet-tuberculeuze mycobacteriën', NTM). Dit is van belang omdat de werkgroep van mening is dat (in tegenstelling tot de vorige richtlijn) de kweektechnieken voor respiratoire monsters voor Mtb en NTM verschillen en een uniforme aanvraag voor verwerking niet meer volstaat. Hieronder zijn de aanbevelingen vermeld.

Aanbevelingen		
	Immuuncompetente patiënten	Immuungecompromitteerde patiënten en patiënten met chronische longziekte
Respiratoir materialen: sputum, BAL-vloeistof	Alleen Mtb (deel 1A)	Mtb en NTM (deel 1A en 2)
Niet-respiratoire materialen: liquor, pleurabiop, pleuravocht, ascites, urine, peritoneumbiop, darmbiop, huid, pericardvocht, maaginhoud lymfeklieren	Mtb en NTM (deel 1B en 2)	Mtb en NTM (deel 1B en 2)

Onder immuuncompetente personen worden individuen verstaan die niet bekend zijn met een genetische of verworven ziekte die het immuunsysteem aantast dan wel individuen die behandeld worden met immunosuppressieve medicatie.

Patiëntmateriaal dat wordt aangeboden voor mycobacteriële kweek kan van uiteenlopende aard en van alle weefsels en organen afkomstig zijn. Het merendeel is echter respiratoir van oorsprong. Het verkregen patiëntmateriaal dat voor mycobacteriële kweek wordt aangeboden dient aan een aantal criteria te voldoen.

- Patiëntmateriaal dient, indien mogelijk, vóór begin van therapie te worden afgenomen
- 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 patiëntmateriaal en het indrogen daarvan.
- De kweekopbrengst neemt toe als van sommige patiëntmaterialen (zoals sputum en liquor) meerdere monsters worden aangeboden voor diagnostiek.
- Het is aan te bevelen om tenminste 2, maar bij voorkeur 3, verschillende respiratoire
- monsters (BAL of sputum) te analyseren op de aanwezigheid van Mtb.

Patiëntmateriaal moet zo snel mogelijk naar het laboratorium worden verzonden om overgroei door andere micro-organismen te voorkomen. Wordt de kweek op een ander laboratorium uitgevoerd, dan dient het materiaal binnen 24 uur op dat laboratorium aanwezig te zijn en dient tot verzending te worden bewaard bij 4°C.

Over de levensvatbaarheid van mycobacteriën in patiëntmateriaal is niet veel bekend. In een laboratoriumstudie naar de bewaaromstandigheden van auramine-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% van de sputa 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- en auramine- kleuring werden niet beïnvloed door de bewaaromstandigheden ([Banda, 2000](#)). Deze resultaten betekenen dat het laboratorium ingezonden respiratoir patiëntmateriaal dat enkele dagen tot 1 week oud is, niet hoeft af te keuren maar in bewerking kan nemen. Wel is de werkgroep van mening dat in Nederland de laboratoria er naar moeten streven om het patiëntmateriaal binnen 4 dagen na afname te hebben verwerkt voor kweek en een auramine-preparaat.

Deel 1A - Respiratoire materialen voor onderzoek op *M. tuberculosis* complex

Uitgangsvraag

Wat is de optimale uitvoering van kweek met als doel aantonen van Mtb?

Inleiding

De kweek van Mtb wordt als de gouden standaard voor diagnostiek beschouwd. Een optimale kweek is gevoeliger dan PCR, maar er zijn studies waarbij de gevoeligheid van kweek en PCR vergelijkbaar zijn. Bovendien kunnen van een gekweekt isolaat een (fenotypische) gevoeligheidsbepaling en een moleculaire typering worden verricht (zie voor nadere informatie het hoofdstuk Moleculaire typering van Mtb). Voor mycobacteriële kweek zijn 3 soorten media beschikbaar: egg-based, vloeibaar en agar-based. De egg-based media hebben als voordeel dat ze ongevoelig zijn

tegen uitdroging, dat toxische bestanddelen worden geneutraliseerd en dat de groei van de meeste mycobacteriën wordt gestimuleerd. Het meest bekende egg-based medium is Löwenstein-Jensen (LJ), dat bestaat uit ei bestanddelen, zouten, glycerol, aardappelmeel en malachiet groen om commensale flora te remmen. 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. Middlebrook 7H11 bevat 0.1% caseïne hydrolysaat waardoor ook INH-resistente mycobacteriën in hun groei worden gestimuleerd. Zowel de egg-based als agar-based media kunnen door toevoeging van antibiotica en antifungale middelen selectiever worden gemaakt voor isolatie van *M. tuberculosis* complex 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 er sinds verschijnen van vorige diagnostiek richtlijn weinig nieuwe literatuur bij is gekomen, is nogmaals de oudere literatuur bekeken om de zoekvragen systematisch te beantwoorden (zie zoekvragen hieronder). Hierbij moet wel in ogenschouw worden genomen dat er ten opzichte van de eerdere richtlijn nu een prominentere plaats is voor de moleculaire diagnostiek, en dat daarmee sommige overwegingen bij het opstellen van de adviezen bij Mtb kweek zijn gewijzigd.

Het is aan te bevelen om tenminste 2, maar bij voorkeur 3, verschillende respiratoire monsters (BAL of sputum) te analyseren op de aanwezigheid van Mtb.

Zoekvragen

1. Geeft de combinatie van kweken op vast medium en in vloeibaar medium een hogere opbrengst bij Mtb?
2. Wat is de meest effectieve voorbehandeling voor de kweek?
3. Bij welke temperatuur moet geïncubeerd worden?
4. Wat is de detectiegrens van de kweek?
5. Hoe te handelen bij een positieve MGIT kweek?

Selectiecriteria literatuur

Pubmed search dd. 24.02.2014: ("*Mycobacterium tuberculosis*"[Mesh]) AND ("Culture Techniques"[Mesh] OR "Culture Media, Conditioned"[Mesh] OR "Culture Media"[Mesh]) Filters: Abstract available, Humans, English, tijdsperiode [1990-2013]. Vervolgens is er een selectie gemaakt van voor de zoekvraag relevante literatuur.

Literatuur per zoekvraag

1. Geeft de combinatie van kweken op vast medium en in vloeibaar medium een hogere opbrengst bij Mtb?

Als eerste is gekeken naar literatuur waarin kweken op vast medium wordt vergeleken met kweken op vloeibaar medium. Hieruit blijkt dat kweken op een vloeibaar medium (Bactec MGIT 960 system - MGIT) sneller en gevoeliger zijn dan kweken op een vast medium ([Mirovic, 2002](#); [Laverdiere, 2000](#); [Palacios, 1999](#); [Casal, 1997](#); [Somoskovi, 2000](#); [Lee, 2003](#)). Echter, er is ook sporadische literatuur die een gelijk resultaat beschrijft ([Scarparo, 2002](#)).

Een nadeel van het gebruik van vloeibare media is de gevoeligheid voor contaminatie ten opzichte van LJ-medium (16.7% versus 9.3%) ([Chihota, 2010](#)). Daar staat tegenover dat vloeibare media een snellere groei en een hogere opbrengst van Mtb hebben.

Vervolgens is gekeken of er in andere studies is bepaald of er een meerwaarde is van de combinatie van de beide kweektechnieken. Deze resultaten zijn in [Tabel 4a.1](#) samengevat.

Het 'Clinical Microbiology Procedures Handbook' ([Garcia, 2007](#)) adviseert om zowel vloeibare als vaste kweekmedia te gebruiken. Dit vanwege de hogere contaminatie kans bij vloeibare kweken, en de mogelijkheid om op de vaste media de koloniemorfologie te beoordelen in combinatie met de eventuele aan- of afwezigheid van contaminatie. Omdat de moleculaire identificatie zeer snel is en betrouwbaar, is de koloniemorfologie niet meer belangrijk.

Tabel 4a.1 Overzicht van studies naar sensitiviteitsverschil van kweekalgoritmes

Studie	Aantal samples/patiënten	Sensitiviteit vloeibare media (%)	Sensitiviteit vloeibare media en LJ (%)	Meerwaarde combinatie (%)
Tortoli E, 1999*	2.567 / 1.631	88	94	6
Chien HP, 2000	365 / 166	95	100	5
Rishi, 2007*	500 / -	-	-	2
Chew, 1998*	603 / -	92	100	8
Idigoras, 2000	2832 / -	93	97.5	4.5

Studie	Aantal samples/ patiënten	Sensitiviteit vloeibare media (%)	Sensitiviteit vloeibare media en LJ (%)	Meer- waarde combinatie (%)
Sorlozano, 2009*	1770 / 696	89	95	6
Srisuwanvilai, 2008	2566 / -	95	100	5
Rivera, 1997*	202 / 100	99	100	1
Lu D, 2002*	6.062 / -	94	100	6
Sharp SE, 2000*	2.271 / -	100	100	0
Hillemann D, 2006*	9.558 / -	90	100	10

*Studie samles niet alleen respiratoir

Samenvatting van de literatuur

- De literatuur laat zien dat vloeibare kweekmedia hogere opbrengst hebben dan vaste kweekmedia. Als single assay scoort deze kweekmethode goed.
- De meerwaarde van een LJ kweek naast een vloeibare kweek ligt tussen 0 en 10%

Reproduceerbaarheid

De spreiding van de resultaten van de verschillende studies is beperkt. Gezien het verschil in opzet van de studies (keuze van samples etc.) lijkt het aannemelijk dat deze resultaten een goede afspiegeling zijn van de dagelijkse praktijk.

Conclusie	
Niveau1	Kweken van respiratoire samples op zowel LJ medium als in MGIT geeft een gewogen meeropbrengst van 6.9% meer positieve uitslagen van <i>M. tuberculosis</i> ten opzichte van vloeibare media.

Overige overwegingen

Alle beschreven literatuur is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia en technieken. Aangezien tegenwoordig ook de PCR haar intrede heeft gedaan, zal de meerwaarde van een vast medium voor de respiratoire samples minder zijn dan de geschatte 1-10%.

Aanbevelingen

Bij de kweken van Mtb uit respiratoire samples is een vloeibare kweek alleen voldoende. Potentiele meerwaarde van het gebruik van vaste kweekmedia lijkt zo gering dat het niet opweegt tegen het meerwerk en de extra kosten.

Bij de kweek vanuit extra-pulmonale samples (waarbij NTM in de differentiaal diagnose staat) is kweken met alleen vloeibare media niet voldoende en moet er kweek op vaste media worden ingezet (zie hiervoor het hoofdstuk diagnostiek NTM).

2. Wat is de meest effectieve voorbehandeling voor de kweek?

The Clinical Microbiology Procedures Handbook (3rd Ed) stelt dat NALC-NaOH de meest gebruikte manier van vervloeiing (N-acetyl-L-cysteine; NALC 0.5-2%) en decontaminatie (NaOH eindconcentratie 1%) is, hoewel er andere methoden ook nog worden toegepast. De eindconcentratie mag maximaal NALC 1% en NaOH 1% zijn. De CLSI stelt dat niet steriele materialen inderdaad met NALC-NaOH moeten worden behandeld, waarbij de eindconcentratie NaOH afhankelijk zou moeten zijn van de mate van "contaminatie" (overgroei door andere bacteriën) van de kweken per laboratorium, maar bij voorkeur onder de 2% moet zijn ([Wayne, 2008](#)). In tegenstelling tot The Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd Ed. spreekt de CLSI bij de voorbehandeling alleen van NALC-NaOH.

Peres et al ([Peres, 2009](#)) tonen aan dat een toename van de eindconcentratie NaOH van 1 naar 1.25% weliswaar minder contaminanten oplevert (11 versus 14%), maar dat het aantal positieve Mtb kweken ook daalt van 21% (bij 1% NaOH) naar 11% (bij 1.25 NaOH). Zij concluderen dan ook dat de eindconcentratie 1% zou moeten zijn. Na de voorbehandeling van niet steriele materialen met NALC-NaOH moet er snel een neutralisatie met fosfaatbuffer worden uitgevoerd, gevolgd door een centrifugatie ($\geq 3000 \times g$ voor 15-20 minuten, ongeremd) en opnemen van de pellet in een fosfaatbuffer.

Uit studies waarbij verschillende decontaminatie technieken werden vergeleken bleek dat of een H_2SO_4 -4-cycloheximide methode inferieur is aan een NaOH techniek ([Iiva-](#)

[nainen, 1997](#)), of tenminste dat er geen significante betere Mtb kweekresultaten werden behaald met een H₂SO₄ methode ten opzichte van een NALC-NaOH methode ([Buijtels, 2005](#)). Bij de SDS-NaOH decontaminatie methode zijn de in de literatuur beschreven resultaten ook tegenstrijdig.

In beide handboeken wordt beschreven dat centrifugeren (CLSI: 30 minuten bij 3.000xg, of The Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd Ed.: 15-20 minuten bij 3.000xg) van 10 mL van de 'steriele' materialen (bv. bloed, beenmerg of liquor) en daarna de pellet opnemen in 1-2 mL steriel 0.85% NaCl de gevoeligheid van de kweek en de microscopie vergroot ([Garcia, 2007](#); [Peres, 2009](#); [Iivanainen, 1997](#); [Buijtels, 2005](#); [Wayne, 2008](#)) Aanvullend wordt gesteld dat de contaminatiegraad van de vloeibare kweken tussen de 2 en 5% zou moeten liggen. Bij een lagere contaminatiegraad dan 2% in de kweken zou de decontaminatie procedure te sterk kunnen zijn en zouden er daarmee ook mycobacteriën kunnen worden afgedood. Bij een te hoog percentage contaminatie kunnen kweken verloren gaan door overgroei ([Garcia, 2007](#); [Peres, 2009](#); [Iivanainen, 1997](#); [Buijtels, 2005](#); [Wayne, 2008](#)).

Samenvatting van de literatuur

De literatuur laat een divers beeld zien van de verschillende decontaminatie en vloeïing technieken. Echter de beide toonaangevende handboeken voor laboratorium diagnostiek (CLSI en The Clinical Microbiology Procedures Handbook 3rd Ed.) zijn eenduidig over het plaatsen van de NALC-NaOH techniek op de eerste plaats. Daarbij is er geen (recente) literatuur die evident aantoont dat er een betere techniek in de voorbereiding van Mtb kweek is.

Reproduceerbaarheid

Gezien de wisselende resultaten (bv. bij de SDS-NaOH studies) is de reproduceerbaarheid van de beschreven studies beperkt. Daarentegen lijkt er wel een uniforme uitkomst te zijn bij de NALC-NaOH techniek.

Overige overwegingen

Aangezien er naast de decontaminatie ook nog een mix van antibiotica (bijvoorbeeld polymyxine-B, trimethoprim, amphotericine-B, azlocilline en nalidixinezuur) bij de vloeibare kweektechniek wordt toegevoegd, is er ook tijdens de kweek nog een remming van de overige flora.

Bij een kweek die toch gecontamineerd blijkt (groei in de vloeibare kweek met een ander micro-organisme) wordt geadviseerd om nogmaals de kweek in te zetten en het vloeibare kweekmedium en/of het patiëntenmateriaal opnieuw te decontamineren met NaOH (zie hiervoor ook [Zoekvraag 5](#)). Het wordt daarom aanbevolen het patiëntmateriaal voldoende lang te bewaren.

Het decontaminatie advies is alleen van toepassing voor niet steriele samples. Bij samples afkomstig uit bv. liquor, bloed of beenmerg wordt geadviseerd om geen decontaminatiestappen voorafgaand aan de kweek te verrichten.

Conclusies	
Niveau 3	De voorbereiding middels NALC (1-2%) voor de vervloeiing en NaOH (1%) voor de decontaminatie wordt beschouwd als de standaard.
Niveau 3	Bij een contaminatiegraad van vloeibare kweken onder 2% zullen waarschijnlijk te veel kweken niet groeien door een te sterke decontaminatie, bij een contaminatiegraad boven 5% zal in te veel kweken <i>M. tuberculosis</i> overgroeid zijn door andere flora.

Aanbevelingen	
Gebruik voor de voorbereiding van Mtb kweken NALC(1-2%)-NaOH(1%).	
Om het effect van de voorbereiding te monitoren is jaarlijkse controle van de contaminatiegraad van de kweken noodzakelijk.	
De contaminatiegraad van vloeibare kweken dient tussen 2 en 5% te bedragen.	

3. Bij welke temperatuur moet worden geïncubeerd?

De Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria; Approved Guideline (M48-A) en het Clinical Microbiology Procedures Handbook – 3rd Ed. vermelden (net als de vorige Nederlandse TB diagnostiek richtlijn) een optimale temperatuur voor kweek van Mtb van 35°C tot 37°C. Voor de kweektemperaturen van NTM verwijzen we naar de NTM diagnostiek richtlijn ([Garcia, 2007](#); [Wayne, 2008](#)).

Conclusie en aanbeveling	
Niveau 2	Mtb kweken hebben de hoogste opbrengst bij een temperatuur van 35°C – 37°C

4. Wat is de detectiegrens van de kweek?

De detectiegrens van de kweek is sterk afhankelijk van de studie populatie, het patiëntmateriaal en de noodzaak om wel of niet een decontaminatie toe te passen. In het algemeen wordt uitgegaan dat er 10 tot 100 colony forming units (CFU) *M. tuberculosis* in 1 ml sputum nodig is om een positief kweekresultaat te krijgen. Ter vergelijking, voor het microscopisch aantonen van zuurvaste staven is een minimale hoeveelheid van 5.000 tot 10.000 CFU per milliliter noodzakelijk.

Het aantal CFU per ml waarmee *M. tuberculosis* complex in patiëntmateriaal aanwezig is, hangt ook samen met de afweerstatus van de patiënt en de aard van het patiëntmateriaal. Mede daarom is de in de literatuur beschreven sensitiviteit van de kweek zo wisselend. Deze wisselt namelijk van 25 tot 75%. De sensitiviteit is mede afhankelijk van wat er als referentie wordt gebruikt. Het is lastig de sensitiviteit van de kweek te bepalen omdat de gouden standaard voor detectie van levende Mtb een (optimaal uitgevoerde) kweek is.

5. Hoe te handelen bij een positieve vloeibare kweek?

Bij een positieve kweek moet er in eerste instantie worden vastgesteld of het groei van een zuurvaste staaf betreft. Hiervoor kan er een auramine-, ZN- of Kinyoun kleuring worden verricht. Als deze negatief is dient er te worden uitgesloten dat het contaminatie betreft en kan de kweek ook op een rijke voedingsbodem (bijvoorbeeld bloedagar medium) worden afgeënt. Deze bloedagar wordt vervolgens na 48 uur op groei gecontroleerd. Indien positief dan kan de vloeibare kweek opnieuw worden gedecontamineerd en ingezet (zie [Zoekvraag 2](#)).

Bij een positieve kleuring en/of negatieve afenting van de bloedagar kan worden bepaald of het een zuurvaste mycobacterie betreft, en zo ja wat de determinatie hiervan is. Hiervoor zijn verschillende moleculaire diagnostische technieken beschikbaar (zie hoofdstuk moleculaire diagnostiek). Bij een negatieve test voor Mtb moet er verdere diagnostiek naar NTM worden verricht (zie hiervoor hoofdstuk NTM).

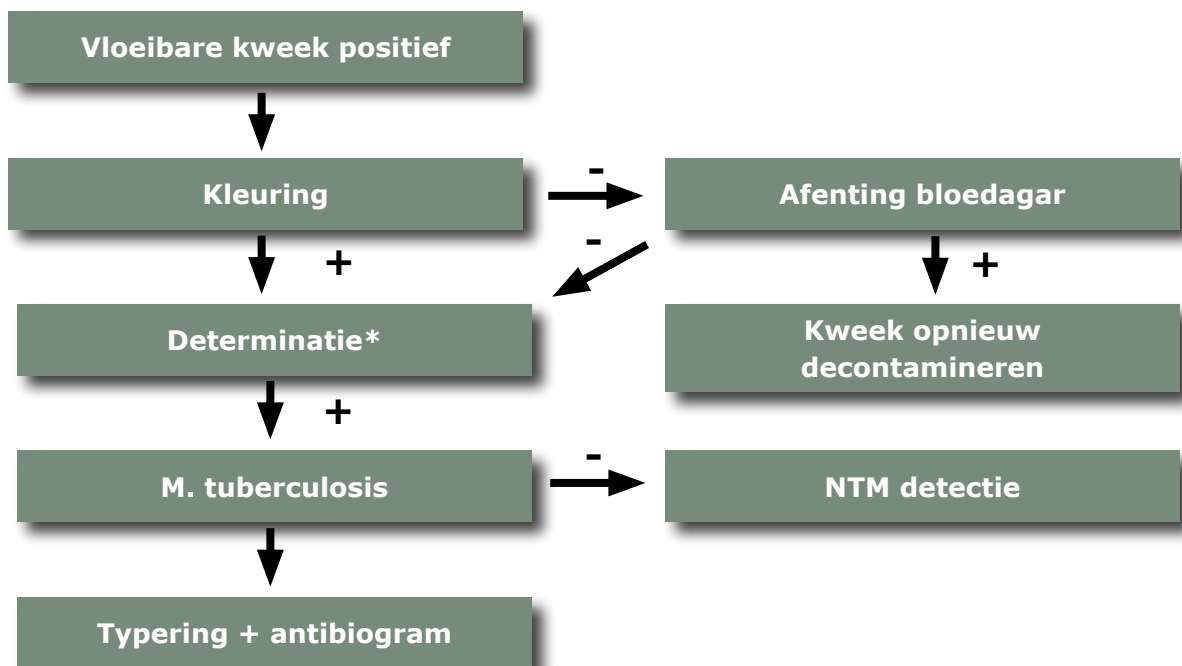
Bij isolatie van een eerste Mtb isolaat bij een patiënt volgt typering (RIVM) en een gevoeligheidsbepaling (zie hiervoor het hoofdstuk gevoeligheid).

De identificatie moet tot op het (sub)species niveau plaatsvinden. Het alleen rapporteren van *Mycobacterium tuberculosis* complex is niet afdoende omdat daarin nog een aantal verschillende klinisch relevante (subs)species vallen.

Overige overwegingen

In de literatuur en verschillende (inter-)nationale richtlijnen staat nergens een exacte definitie van een positieve kweek van *M. tuberculosis* complex. Een vloeibare kweek

wordt als positief beschouwd zodra deze wordt afgevlagd door een geautomatiseerd kweekstelsel (o.b.v. zuurstof gebruik), er geen andere bacteriën dan zuurvaste staven worden aangetoond en specifiek genetisch materiaal van *M. tuberculosis* aanwezig is dat in de loop van de tijd in concentratie toeneemt. Meer specifiek, de Ct-waarde van de moleculaire detectie techniek ter bevestiging van de kweek moet in de loop van de kweektijd (significant) lager worden.



*Identificatie met PCR, hybridisatie of sequencing dient tot op het subspecies niveau te gebeuren.

Conclusie	
Niveau 4	Een vloeibare Mtb kweek wordt positief beschouwd als in de vloeibare kweek verbruik van zuurstof is en het genoom van Mtb kan worden aangetoond in een hoeveelheid passend bij de biomassa aan Mtb die zo een hoeveelheid zuurstof kan hebben verbruikt.

Aanbeveling

Identificatie van *Mycobacterium tuberculosis* complex moet tot op het (sub)species niveau worden verricht.

Deel 1B - Kweek van niet-respiratoire materialen op *M. tuberculosis* complex

Bij deze materialen wordt aangeraden zowel vaste media als vloeibare kweekmedia te gebruiken voor de kweek op *M. tuberculosis* complex. De voorbehandeling is afhankelijk van de aard en de wijze waarop het patiëntmateriaal is verkregen. Bij weefselbiopten is homogenisering en concentreren van het materiaal belangrijk omdat de kweekopbrengst hiermee toeneemt ([Garcia, 2007](#)). Hierbij kan er gebruik worden gemaakt van potterbuizen; een techniek waarbij met een stamper in een glazenbuis de monsters worden fijngemalen. Tegenwoordig zijn er ook meer geautomatiseerde homogenisertechnieken, zoals de Beadbeater® (homogenisatie m.b.v. glasparels) of GentleMACS® (homogenisatie m.b.v. mesjes) die het voordeel hebben dat ze gestandaardiseerd werken en een (theoretische) lagere kans hebben op (kruis-)contaminatie omdat het gesloten systemen zijn. Echter hier zijn geen (goede) vergelijkende studies naar gedaan en daarom wordt er geen aanbeveling gegeven vanuit de werkgroep. In het algemeen beveelt de werkgroep aan om alleen gebruik te maken van steriele disposables of goed te steriliseren materialen, omdat de (langdurige) kweken gevoelig zijn voor contaminatie.

Pleuravocht

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 of door een pleurabioptie te nemen. 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, zoals de plaats van inoculatie (bedside of in laboratorium) en het gebruik van transportmedium en specifieke 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 beter te zijn dan laboratorium inoculatie indien vloeibare media zoals Bactec werden gebruikt ([Cheng, 1999](#); [Luzze, 2001](#); [Maartens, 1991](#)).

De sensitiviteit van kweken met conventionele vaste media zoals LJ in prospectieve studies bleek maximaal 23 % te zijn ([Maartens, 1991](#)). Vloeibare kweekmedia blijken gevoeliger te zijn dan vaste media zoals LJ en de kweek in vloeibare media wordt ook sneller positief.

Pleurabiopt

Pleurabiopten kunnen niet alleen met kleuring en kweek op de aanwezigheid van mycobacteriën onderzocht worden, maar ook met histologisch onderzoek. Granulomateuze ontsteking met verkazende necrose in het pleurabiopt wordt ook als sterke aanwijzing voor tuberculose gezien. De sensitiviteit van histologisch onderzoek in pleurabiopten was in prospectieve studies 55-85% ([Luzze, 2001](#); [Heyderman, 1998](#); [Levine, 1970](#); [Richter, 1994](#); [Scerbo, 1971](#)), en in retrospectieve studies 45%-80% ([Antoniskis, 1990](#); [Kirsch, 1997](#); [Valdes, 1998](#)).

Lymfklieren

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. Gericht genomenbiopten hebben een hogere opbrengst. Lymfeklierbiopten kunnen niet alleen met kleuring en kweek op de aanwezigheid van mycobacteriën worden onderzocht, maar ook met histologisch onderzoek. Voor de kweek wordt homogenisering en een voorbereiding aangeraden, waarbij het materiaal op vaste en vloeibare media wordt ingezet.

Maaginhoud

Onderzoek van maagsap wordt aangeraden bij verdenking op pulmonale tuberculose als onderzoek van sputum of bronchoalveolaire lavage niet mogelijk is. De nuchtere maaginhoud moet 's ochtends via hevelen van 20-30 ml fysiologisch zout bij voorkeur in 5-10 ml Na₂CO₃ buffer worden opgevangen. Als er geen buffer wordt gebruikt moet het materiaal binnen 4 uur op het laboratorium zijn voor bewerking. Na concentratie kan het materiaal worden geënt op vaste en vloeibare media.

Pericardvocht

Voor de diagnose pericarditis tuberculosa lijkt de combinatie histologisch en microbiologisch onderzoek van pericardvocht en/of pericardbiopt het meest aangewezen. Voor de diagnostiek van pericarditis tuberculosa is onderzoek van pericardweefsel gevoeliger dan van pericardvocht. Het verschil is niet zo groot dat dit het afnemen van een pericardbiopt rechtvaardigt.

Peritoneum

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. 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 ([Chow, 2003](#)).

Darmmateriaal

Tuberculose kan in de gehele tractus digestivus zijn gelokaliseerd. In een review van Horvath et al. blijkt er in ruim 75% van de gevallen wel een voorkeurslokalisatie te bestaan voor het ileocecaal gebied ([Horvath, 1998](#)). Intestinale tuberculose gaat in 20% gepaard met een actieve pulmonale tuberculose. Diagnose wordt gewoonlijk via endoscopie gesteld, waarbij de kans op het aantonen van mycobacteriën (positieve auramine, positieve kweek of positieve amplificatie) toeneemt met het nemen van meerdere en diepe biopten ([Kim, 1998](#)). De biopten moeten na homogenisering worden behandeld met NALC-NaOH en geënt op vaste en in vloeibare media.

Urine

Urogenitale tuberculose kan onderdeel zijn van een gedissemineerde tuberculose, maar manifesteert zich meestal als een endogene reactivatie van tuberculose. Van patiënten met urogenitale tuberculose heeft 57-70% een afwijkende thoraxfoto passend bij (doorgemaakte) pulmonale TB, en heeft ongeveer 25% anamnestiche pulmonale of extra pulmonale TB doorgemaakt. Met ochtendurine wordt een hogere sensitiviteit van de kweek bereikt dan met 24-uurs verzamelurine ([Kenney, 1960](#)). Hoewel goede studies ontbreken wordt geadviseerd drie aparte ochtendurines in te sturen, omdat hierdoor een hogere opbrengst van de microscopie en kweek kan worden bereikt. Tenminste 48 uur voor afname van urine mag de patiënt geen antibiotica hebben gebruikt die de groei van mycobacteriën kunnen remmen. De ochtendurine wordt voorbehandeld en geënt op vaste en in vloeibare media.

Liquor

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 kliniek bij tuberculeuze meningitis wordt bepaald door 3 verschillende pathofysiologische mechanismen: een arachnoiditis met ingroei en laedering van craniaalvaten en basaal gelegen hersenzenuwen (met als resultante de bekende basaal gelegen hersenzenuwuitval), daarnaast de vasculitis met bloedige en niet-bloedige infarceringen en tenslotte de hydrocephalus

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. 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 ([Kennedy, 1979](#)). De cellen zijn meestal lymfocytair, maar in het beginstadium van de meningitis kan dit polynucleair zijn.

Geadviseerd wordt om minimaal 6 mL liquor af te nemen ([Kennedy, 1979](#); [Marais, 2010](#)). In het onderzoek van Thwaites et al. was er een significant verschil van microbiologische opbrengst tussen liquor monsters van 4 mL of minder en liquor monsters van 5 mL of meer ([Thwaites, 2004](#)). Er is geen onderzoek gedaan naar het nut van "bed-side" beënting van liquor monsters rechtstreeks in vloeibare kweekmedia, zoals bij pleuravocht. Wel blijkt uit het onderzoek van Thwaites et al. dat herhaald onderzoek van liquor, ook na het starten van de therapie de opbrengst van microscopie (met 10%), kweek en PCR (met 42%) vergroot ([Thwaites, 2004](#)). Vooral de combinatie van kleuring en moleculaire diagnostiek bereikt dan een sensitiviteit van meer dan 80%. Hoewel *M. tuberculosis* door de cordfactor in liquor kan samenklonteren 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.

Niet-voorbehandeld sediment en het resterende supernatant moeten op vaste media en in vloeibare media worden beënt. 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 liquor monsters te onderzoeken op de aanwezigheid van zuurvaste staven met kweek en PCR 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 liquor monsters 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.

Conclusie en aanbeveling

Niveau 1	Voor de kweek van niet-respiratoire materialen op <i>M. tuberculosis</i> complex is naast een vloeibaar medium ook een vast medium nodig. Afhankelijk van de aard van het materiaal zal de voorbereiding bestaan uit homogenisering met decontaminatie en concentratie.
----------	---

Referenties

Antoniskis D, Amin K, Barnes PF. Pleuritis as a manifestation of reactivation tuberculosis. *Am J Med* 1990;89:447-50.

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;4:272-4.

Buijtels PC, Petit PL. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Methods* 2005;62:83-8.

Casal M, Gutierrez J, Vaquero M. Comparative evaluation of the mycobacteria growth indicator tube with the BACTEC 460 TB system and Lowenstein-Jensen medium for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 1997;1:81-84.

Cheng AF, Tai VH, Li MS et al. Improved recovery of Mycobacterium tuberculosis from pleural aspirates: bedside inoculation, heparinized containers and liquid culture media. *Scand J Infect Dis* 1999;31:485-7.

Chew WK, Lasaitis RM, Schio FA, Gilbert GL. Clinical evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of Mycobacterium species. *J. Med. Microbiol.* 1998; 47:821-7.

Chihota VN, Grant AD, Fielding K et al. Liquid vs. solid culture for tuberculosis: performance and cost in a resource-constrained setting. *Int J Tuberc Lung Dis* 2010;14:1024-31.

Chien HP, Yu MC, et al. "Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens." *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2000; 4(9): 866-870.

Chow KM, Chow VC, Szeto CC. Indication for peritoneal biopsy in tuberculous peritonitis. *Am J Surg* 2003;185:567-73.

Garcia LS. Clinical microbiology procedures handbook - 3rd Ed. 2007;Section 7: Mycobacteriology and Antimycobacterial Susceptibility Testing.

Heyderman RS, Makunike R, Muza T et al. Pleural tuberculosis in Harare, Zimbabwe: the relationship between human immunodeficiency virus, CD4 lymphocyte count, granuloma formation and disseminated disease. *Trop Med Int Health* 1998;3:14-20.

Referenties

Hillemann D, Richter E, Rüsç-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 automated system for recovery of Mycobacteria from 9,558 extrapulmonary specimens, including urine samples. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:4014-7.

Horvath KD, Whelan RL. Intestinal tuberculosis: return of an old disease. *Am J Gastroenterol* 1998;93:692-6.

Idigoras P, Beristain X, et al. "Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Lowenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2000; 19(5): 350-354.

Iivanainen E, Martikainen PJ, Katila ML. Comparison of some decontamination methods and growth media for isolation of mycobacteria from northern brook waters. *J Appl Microbiol* 1997;82:121-7.

Kennedy DH, Fallon RJ. Tuberculous meningitis. *JAMA* 1979;241:264-8.

Kenney M, Loechel AB, Lovelock FJ. Urine culture in tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1960;82:564-7.

Kim KM, Lee A, Choi KY, Lee KY, Kwak JJ. Intestinal tuberculosis: clinicopathologic analysis and diagnosis by endoscopic biopsy. *Am J Gastroenterol* 1998;93:606-9.

Kirsch CM, Kroe DM, Azzi RL, Jensen WA, Kagawa FT, Wehner JH. The optimal number of pleural biopsy specimens for a diagnosis of tuberculous pleurisy. *Chest* 1997;112:702-6.

Laverdiere M, Poirier L, Weiss K, Beliveau C, Bedard L, Desnoyers D. Comparative evaluation of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for the detection of mycobacteria from clinical specimens: clinical relevance of higher recovery rates from broth-based detection systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36:1-5.

Lee JJ, Suo J, Lin CB, Wang JD, Lin TY, Tsai YC. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2003;7:569-574.

Levine H, Metzger W, Lacera D, Kay L. Diagnosis of tuberculous pleurisy by culture of pleural biopsy specimen. *Arch Intern Med* 1970;126:269-71.

Lu D, Heeren B, et al. "Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens." *Am J Clin Pathol* 2002; 118(4): 542-545.

Referenties

Luzze H, Elliott AM, Joloba ML et al. Evaluation of suspected tuberculous pleurisy: clinical and diagnostic findings in HIV-1-positive and HIV-negative adults in Uganda. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001;5:746-53.

Maartens G, Bateman ED. Tuberculous pleural effusions: increased culture yield with bedside inoculation of pleural fluid and poor diagnostic value of adenosine deaminase. *Thorax* 1991;46:96-9.

Marais S, Thwaites G, Schoeman JF et al. Tuberculous meningitis: a uniform case definition for use in clinical research. *Lancet Infect Dis* 2010;10:803-12.

Mirovic V, Lepsanovic Z. Evaluation of the MB/BacT system for recovery of mycobacteria from clinical specimens in comparison to Lowenstein-Jensen medium. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:709-14.

Palacios JJ, Ferro J, Ruiz Palma N et al. Fully automated liquid culture system compared with Lowenstein-Jensen solid medium for rapid recovery of mycobacteria from clinical samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18:265-73.

Peres RL, Maciel EL, Morais CG et al. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *Int J Tuberc Lung Dis* 2009;13:1572-5.

Richter C, Perenboom R, Swai AB et al. Diagnosis of tuberculosis in patients with pleural effusion in an area of HIV infection and limited diagnostic facilities. *Trop Geogr Med* 1994;46:293-7.

Rishi S, Sinha P, et al. "A comparative study for the detection of Mycobacteria by BACTEC MGIT 960, Lowenstein Jensen media and direct AFB smear examination." *Indian J Med Microbiol* 2007; 25(4): 383-386.

Rivera AB, Tupasi TE, et al. "Rapid and improved recovery rate of Mycobacterium tuberculosis in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Lowenstein Jensen medium." *Int J Tuberc Lung Dis* 1997; 1(5): 454-459.

Scarpato C, Piccoli P, Rigon A, Ruggiero G, Ricordi P, Piersimoni C. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 in comparison with BACTEC 460 TB for detection and recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2002;44:157-161.

Scerbo J, Keltz H, Stone DJ. A prospective study of closed pleural biopsies. *JAMA* 1971;218:377-80.

Sharp SE, Lemes M, et al. "Lowenstein-Jensen media. No longer necessary for mycobacterial isolation." *Am J Clin Pathol* 2000; 113(6): 770-773.

Referenties

Somoskovi A, Kodmon C, Lantos A et al. Comparison of recoveries of *Mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Lowenstein-Jensen medium. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:2395-2397.

Sorlozano A, Soria I, et al. "Comparative Evaluation of Three Culture Methods for the Isolation of Mycobacteria from Clinical Samples." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2009; 19(10): 1259-1264.

Srisuwanvilai LO, Monkongdee P, et al. "Performance of the BACTEC MGIT 960 compared with solid media for detection of *Mycobacterium* in Bangkok, Thailand." *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61(4): 402-407.

Thwaites GE, Caws M, Chau TT et al. 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.

Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista N. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3578-82

Valdes L, Alvarez D, San Jose E et al. Tuberculous pleurisy: a study of 254 patients. *Arch Intern Med* 1998;158:2017-21.

Wayne PA. Laboratory detection and identification of mycobacteria; approved guideline (M48-A). *Clinical and Laboratory Standards Institute* 2008;28:1-92.

Hoofdstuk 4B

KWEEK NONTUBERCULEUZE

MYCOBACTERIËN

Kweek van respiratoire en niet-respiratoire materialen op niet-tuberculeuze mycobacteriën.

Uitgangsvraag

Wat is de optimale uitvoering van de kweek om nontuberculeuze mycobacteriën te isoleren uit patiëntmaterialen?

Inleiding

De kweek is de basis van de diagnostiek van ziekte door nontuberculeuze mycobacteriën (NTM; in het verleden ook "atypische mycobacteriën" genoemd). Van de ruim 160 soorten NTM zijn er slechts 25 die met enige regelmaat uit klinische materialen worden geïsoleerd en geassocieerd zijn met NTM ziekte. 2 NTM kunnen infecties van alle organen veroorzaken, maar longinfecties zijn veruit het meest frequent, gevolgd door lymfadenitis bij kinderen, gedissemineerde infecties bij ernstig immunogecompromitteerden en huid, weke delen of bot/gewricht infecties na inoculatie (zoals de huidinfectie door *M. marinum*) ([Griffith, 2007](#)).

Een positieve NTM kweek uit een normaal steriel materiaal is zeer suggestief voor ziekte, tenzij contaminatie van het materiaal aannemelijk kan worden gemaakt. Voor pulmonale en tractus digestivus monsters geldt dit niet, omdat de NTM, als omgevingsbacteriën, hierin aanwezig kunnen zijn zonder ziekte te veroorzaken. Voor deze materialen, met name pulmonale materialen geldt dat de diagnose van NTM (long) ziekte pas te stellen is wanneer meerdere positieve kweken met hetzelfde species zijn verkregen bij een symptomatische patiënt met passende radiologische afwijkingen (en waar mogelijk passend histologie) ([van Ingen, 2013](#)).

Om deze diagnose te stellen moeten ten minste drie separaat afgenomen respiratoire materialen van ten minste redelijke kwaliteit zijn verkregen. Separaat afgenomen betekent hier niet, zoals bij TB, op opeenvolgende dagen. Er dient een interval van ten minste een week te worden aangehouden ([Griffith, 2007](#)). Dit interval is niet gestoeld op klinische studies, maar wordt aangehouden om tijdelijke kolonisatie, bijvoorbeeld na contact met aerosolen bij douchen of drinken van (kraan)water, te kunnen onderscheiden van een ware infectie.

De mate van klinische relevantie, dus het percentage van patiënten met positieve kweken met een NTM species uit respiratoire materialen waarbij daadwerkelijk sprake blijkt van NTM longziekte, verschilt sterk per species. Zo veroorzaken *M. goodii* en *M. chelonae* vrijwel nooit longziekten, in tegenstelling tot *M. malmoense* en *M. kansasii* waarbij meer dan 70% van de positieve kweken klinisch relevant zijn, dus passend bij NTM longziekte ([van Ingen, 2009](#); [Hoefsloot, 2009](#)). Van het

veelvoorkomende *M. avium* complex kan in ongeveer de helft van de patiënten met een positieve kweek uiteindelijk de diagnose *M. avium* complex longziekte worden gesteld ([van Ingen, 2009](#)).

Zoekvragen

1. Wat is de meest effectieve voorbehandeling voor de kweek?
2. Geeft de combinatie van kweken op vast medium en in vloeibaar medium een meerwaarde?
3. Bij welke temperatuur moet worden geïncubeerd?

Selectiecriteria literatuur

PubMed search dd. 09.04.2014: ("Mycobacterium"[Mesh]) AND ("Culture Techniques"[Mesh] OR "Culture Media, Conditioned"[Mesh] OR "Culture Media"[Mesh]) Filters: Abstract available, Humans, English, tijdsperiode [1995-2013]. Vervolgens is een selectie gemaakt van voor de zoekvraag relevante literatuur. Alle diagnostische studies met minder dan 10 NTM isolaten werden niet gebruikt.

Literatuur per zoekvraag

1. Wat is de meest effectieve voorbehandeling voor de kweek?

De voorbehandeling voor de kweek is voor NTM in principe niet anders dan voor *M. tuberculosis* complex, met één belangrijke uitzondering: patiënten met Cystic Fibrosis. Deze patiëntgroep heeft een verhoogd risico op het ontwikkelen van NTM longziekte. Specifiek in deze groep is contaminatie van mycobacteriële kweken een frequent voorkomend probleem. Dit hangt samen met de overige luchtwegflora van deze patiënten, in het bijzonder het voorkomen van pseudomonaden en schimmels in hun luchtwegen.

Een partiele oplossing voor dit probleem kan worden verkregen met een tweede decontaminatie-stap met 5% oxaalzuur. In eerdere studies (door 1 groep gedaan) kon hiermee de contaminatiegraad van LJ kweken worden verlaagd van 74% naar 5% en die van BacTec460 vloeibare kweken van 36% naar 3%. Deze resultaten bleken echter vooral gunstig in microscopie-positieve materialen. In materialen met een lagere load kan deze decontaminatie de sensitiviteit van kweek verlagen ([Whittier, 1993](#); [Whittier, 1997](#)).

Als alternatief voor de 1% NALC-NaOH decontaminatie is decontaminatie met chloorhexidine mogelijk. Een studie heeft 1% chloorhexidine vergeleken met 0.25%/1%

NaLC-NaOH gevolgd door 5% oxaalzuur in 827 sputa van CF patiënten. Chloorhexidine decontaminatie leverde tweemaal zoveel kweken met NTM op (6.50% versus 3.25%), ondanks een hogere contaminatiegraad in de chloorhexidine behandelde materialen (20% versus 14.2%) ([Ferroni, 2006](#)). Hoewel veelbelovend kent deze methode een groot bezwaar. Voor het bufferen van de chloorhexidine bij het voorbereiden van de kweek is veel lecithine nodig en dit verstoort de sensor van de MGIT960 geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen. Kweken kunnen dan dus alleen op LJ of andere vaste media worden ingezet. Een latere studie bevestigde het gunstige effect van chloorhexidine decontaminatie, maar liet zien dat de winst in sensitiviteit met kweek op vaste media niet opweegt tegen NaLC-NaOH decontaminatie en kweek in vloeibare media ([De Bel, 2013](#)).

Conclusie	
Niveau 3	De voorbereiding middels NALC (1%) voor de vervloeiing en NaOH (1%) voor de decontaminatie wordt ook voor NTM beschouwd als de standaard.

Overige overwegingen

Alleen bij Cystic Fibrosis patiënten met sterke verdenking NTM ziekte maar gecontamineerde kweken kan alternatieve decontaminatie overwogen worden middels chloorhexidine of NALC-NaOH met vervolgens oxaalzuur.

Centra die veel mycobacteriële diagnostiek doen voor Cystic Fibrosis patiënten of andere patiënten met bronchiëctasieën zullen een hogere contaminatiegraad van hun kweken zien; de streefwaarden die in het hoofdstuk over de kweek voor *M. tuberculosis* worden gehanteerd zijn dan mogelijk niet haalbaar.

2. Geeft de combinatie van kweken op vast medium en in vloeibaar medium (MGIT) een meerwaarde?

Uit de meta-analyse van Cruciani et al ([Cruciani, 2004](#)) komt een toename in sensitiviteit van 10% naar voren, bij het toevoegen van de LJ kweek aan het MGIT960 vloeibaar kweekstelsel. Voor deze meta-analyse konden 10 studies, met 14.745 monsters, worden gebruikt, allen uit de periode 1990-2003. Naast deze studies vonden wij nog 9 studies waarin de NTM data specifiek wordt benoemd en waaruit de sensitiviteit voor verschillende kweekalgoritmes herleidbaar was ([Chew, 1998](#); [Idigoras, 2000](#); [Sorlozano, 2009](#); [Rivera, 1997](#); [Alcaide, 2000](#); [Lu, 2002](#); [Lee J, 2003](#); [Sharp, 2000](#); [Hillemann, 2006](#)). De data uit deze studies en de meta-analyse zijn

weergegeven in [Tabel 4b.1](#). Over andere vloeibare media en commerciële systemen is minder gepubliceerd dan over MGIT. Voor alle studies geldt dat in de analyses alle verschillende materialen (steriel vs niet-steriel, respiratoir vs anders) gepoold zijn.

Tabel 4b.1 Overzicht van studies naar sensitiviteit van kweekalgoritmes, specifiek voor NTM

Studie	Aantal samples/patiënten	Aantal NTM	Sensitiviteit MGIT (%)	Sensitiviteit MGIT+vaste media (%)	Meerwaarde combinatie (%)
Cruciani, 2004*	14745	571	66%	76%	10%
Chew, 1998*	603 / -	48 (alleen MAC)	94%	98%	4%
Idigoras, 2000**	2832 / -	120	83%	94%	11%
Sorlozano, 2009*	1770 / 696	21	71%	100%	29%
Rivera, 1997*	202 / 100	12	58%	100%	42%
Alcaide, 2000*	1068 / -	24	63%	75%	12%
Lu, 2002*	6.062 / -	213	88%	100%	12%
Lee J, 2003***	1.396 / 622	19	100%	100%	0%
Sharp, 2000*	2.271 / -	293	68%	100%	32%
Hillemann, 2006****	9.558 / -	259	86%	100%	14%

* alleen Löwenstein-Jensen medium gebruikt als vast medium

**Löwenstein-Jensen, Coletsos en Middlebrook 7H11 als vast medium

***Löwenstein-Jensen en Middlebrook 7H11 als vast medium

****Löwenstein-Jensen en Stonebrink als vast medium

Conclusie	
Niveau 1	Kweken zowel op LJ medium als in MGIT geeft een gewogen meerwaarde van 15,3% positieve uitslagen ten opzichte van kweken in de MGIT alleen.

Overige overwegingen

De epidemiologie in Nederland is dusdanig veranderd dat een gemiddeld Nederlands laboratorium voor mycobacteriologie nu vrijwel evenveel NTM als *M. tuberculosis* complex isoleert. De klinische presentatie van NTM infecties kent zoveel overlap met die van tuberculose dat een onderscheid op basis van klinisch beeld niet goed mogelijk is. Alleen bij specifieke hoog-risico groepen voor tuberculose kan in de kweek specifiek gericht worden op *M. tuberculosis* complex. Bij specifiek risicogroepen voor NTM infecties, zoals Cystic Fibrosis patiënten, dient juist zoveel mogelijk op NTM gericht te worden.

De beschreven toegevoegde waarde van LJ kweek wordt mede bepaald door de diversiteit in NTM species. Deze verschilt per gebied. Niet alle literatuur zal dus eenvoudig te extrapoleren zijn naar de Nederlandse setting.

Belangrijk is dat een aantal klinisch relevante NTM (*Mycobacterium haemophilum*, *Mycobacterium genavense*) niet of nauwelijks groei vertonen op in de routine gebruikte media. Voor *M. haemophilum* dient een extra ijzerbron aan het medium te worden toegevoegd (ijzerammoniumcitraat, factor X, FOS [BD Bioscience], hemine of vergelijkbaar) of kan een chocolade plaat worden beënt. Er zijn aanwijzingen dat dit species beter groeit bij 30 dan bij 37 graden Celsius (zie onder) ([Saubolle, 1996](#); [Bruijnesteijn, 2005](#)). Dit species veroorzaakt in Nederland vooral lymfadenitis bij kinderen en gedissemineerde huidinfecties bij ernstig immuungecompromitteerden.

Voor *Mycobacterium genavense* is het optimale kweekmedium nog niet bekend, maar het aanzuren van het MGIT / Middlebrook 7H9 medium tot een pH van 5.5-6.0, het toevoegen van bloed (humaan of schaap) of houtskool verhogen allen de sensitiviteit. Zonder deze supplementen heeft *M. genavense* een incubatieduur van 3 maanden nodig om tot zichtbare groei in het MGIT medium te komen. Een vast medium met bloed, houtskool, caseïne en gistextract, aangezuurd tot pH 6.0 is succesvol gebleken voor veterinaire materialen (dit NTM species veroorzaakt ziekte bij vogels) ([Realini, 1999](#)). Een praktische overweging is het gebruiken van de medium voor pyrazinamide

gevoeligheidsbepalingen van de MGIT960 (BD Bioscience, Erembodegem, België); dit medium is reeds aangezuurd. Dit species veroorzaakt vooral gedissemineerde infecties bij ernstig immuungecompromitteerden, maar sporadisch ook longinfecties. Tevens is bekend dat niet alle positieve kweken in het MGIT medium ook daadwerkelijk door het geautomatiseerde systeem worden opgemerkt. Dit probleem treedt vooral op bij zeer traag groeiende NTM, notoir bij *M. xenopi*. In 1 studie werden slechts 13 van de 44 *M. xenopi* isolaten door het MGIT systeem gedetecteerd; alle anderen werden pas bij visuele inspectie onderkend ([Piersimoni, 2009](#)). Een MGIT buis die door het systeem na de normale duur van incubatie als negatief wordt aangemerkt dient visueel te worden geïnspecteerd op groei voordat de buis wordt vernietigd ([Piersimoni, 2009](#)).

Tenslotte zijn er ook NTM species die in het geheel niet groeien op artificiële media, zoals '*M. tilburgii*' en *M. ulcerans* (verwekker van Buruli ulcer disease, ernstige huidinfectie). Bij microscopie-positieve maar kweek negatieve monsters dient dit in overweging te worden genomen.

Aanbevelingen

Bij de kweek voor detectie van nontuberculeuze mycobacteriën is de vloeibare kweek alleen niet voldoende en zullen er vaste media moeten worden ingezet; specifieke supplementen kunnen nodig zijn.

Een door geautomatiseerde kweeksystemen als 'negatief' aangemerkte kweek dient visueel te worden geïnspecteerd op groei alvorens de buis wordt vernietigd

3. Bij welke temperatuur moet worden geïncubeerd?

Er is tot op heden maar 1 studie verricht naar de meerwaarde van het incuberen van vloeibare kweken (BacT/Alert 3D) en LJ buizen bij zowel 30°C als 37°C. Hieruit kwam naar voren dat bij 37°C 1 *M. marinum* isolaat (van 5 *M. marinum*; 16 NTM in totaal) werd gemist en dat de overige *M. marinum* isolaten sneller gedetecteerd werden bij 30 graden Celsius ([Alfa, 2011](#)).

Er is ook klinische ervaring dat *M. haemophilum* sneller groeit bij 30°C dan bij 37°C ([Saubolle, 1996](#)). In een studie in Nederland kon bij 16 kinderen met lymfadenitis *M. haemophilum* als verwekker worden aangetoond met kweken bij 37°C, kweek op X-factor gesuppleerde kweken bij 30°C en een species-specifieke rtPCR. De routine kweek leverde groei op bij 1 patiëntje, terwijl X-factor gesuppleerde media bij 30°C

bij 9 kinderen groei opleverden van *M. haemophilum*. Er werden geen gesuppleerde media bij 37°C geïncubeerd ([Bruijnesteijn, 2005](#)).

Voor het aflezen van de vloeibare kweek bij 30 graden Celsius kan de microMGIT reader worden gebruikt (indien MGIT buizen worden geïncubeerd), of visuele inspectie.

Conclusie

Niveau 3	NTM kweken van huid, weke delen, bot of gewrichtsmaterialen dienen bij 30°C en 37°C te worden geïncubeerd
----------	---

Aanbevelingen

NTM kweken van respiratoire materialen moeten worden geïncubeerd bij een temperatuur van 35°C-37°C

NTM kweken van huid, bot of lymfekliermaterialen moeten worden geïncubeerd bij een temperatuur van 30°C en 35-37°C

Overige overwegingen

Over de meerwaarde van het incuberen van zowel vaste als vloeibare media bij 30°C graden zijn onvoldoende gegevens beschikbaar. De beschikbare data uit 1 studie is gebaseerd op vaste (LJ) en vloeibare media (BacTAlert 3D) bij 30°C en 37°C ([Alfa, 2011](#)).

Referenties

Alcaide F, Benítez MA, Escribà JM, Martín R. 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.

Alfa MJ, Manickam K, Sepehri S, Sitter D, Lenton P. Evaluation of BacT/Alert 3D automated unit for detection of nontuberculous mycobacteria requiring incubation at 30 degrees C for optimal growth. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2691-3.

Bruijnesteijn van Coppentraet LE, Kuijper EJ, Lindeboom JA, Prins JM, Claas EC. Mycobacterium haemophilum and lymphadenitis in children. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 62-8.

Chew WK, Lasaitis RM, Schio FA, Gilbert GL. Clinical evaluation of the Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) compared with radiometric (Bactec) and solid media for isolation of Mycobacterium species. *J Med Microbiol* 1998; 47: 821-7.

Chien HP, Yu MC, et al. "Comparison of the BACTEC MGIT 960 with Lowenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens." *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 2000; 4(9): 866-870.

Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2321-2325.

De Bel A, De Geyter D, De Schutter I, Mouton C, Wellemans I, Hanssens L, Schelstraete P, Malfroot A, Pierard D. Sampling and decontamination method for culture of nontuberculous mycobacteria in respiratory samples of cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4204-4206.

Ferroni A, Vu-Thien H, Lanotte P, Le Bourgeois M, Sermet-Gaudelus I, Fauroux B, Marchand S, Varaigne F, Berche P, Gaillard JL, Offredo C. Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 2237-2239.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Russo S, Fordham von Reyn C, Wallace RJ Jr., Winthrop K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.

Referenties

Hillemann D, Richter E, Rüsç-Gerdes S. Use of the BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 automated system for recovery of Mycobacteria from 9,558 extrapulmonary specimens, including urine samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4014-7.

Hoefsloot W, van Ingen J, de Lange WC, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D. Clinical relevance of Mycobacterium malmoense isolation in The Netherlands. *Eur Respir J* 2009; 34: 926-931.

Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Pérez-Trallero E. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 350-4.

Lee JJ, Suo J, Lin CB, Wang JD, Lin TY, Tsai YC. Comparative evaluation of the BACTEC MGIT 960 system with solid medium for isolation of mycobacteria. *Int J Tuberc Lung Dis* 2003;7: 569-74.

Lu D, Heeren B, Dunne WM. Comparison of the Automated Mycobacteria Growth Indicator Tube System (BACTEC 960/MGIT) with Löwenstein-Jensen medium for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Am J Clin Pathol* 2002;118: 542-5.

Piersimoni C, Nista D, Bornigia S, Gherardi G. Unreliable detection of Mycobacterium xenopi by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture system. *J Clin Microbiol* 2009;47: 804-6.

Realini L, de Ridder K, Hirschel B, Portaels F. Blood and charcoal added to acidified agar media promote the growth of Mycobacterium genavense. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34: 45-50.

Rivera AB, Tupasi TE, Grimaldo ER, Cardano RC, Co VM. Rapid and improved recovery rate of Mycobacterium tuberculosis in Mycobacteria Growth Indicator Tube combined with solid Löwenstein Jensen medium. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1: 454-9.

Saubolle MA, Kiehn TE, White MH, Rudinsky MF, Armstrong D. Mycobacterium haemophilum: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 1996;9: 435-447.

Sharp SE, Lemes M, Sierra SG, Poniacka A, Poppiti RJ Jr. Löwenstein-Jensen media. No longer necessary for mycobacterial isolation. *Am J Clin Pathol* 2000; 113: 770-3.

Referenties

Sorlozano A, Soria I, Roman J, Huertas P, Soto MJ, Piedrola G, Gutierrez J. Comparative evaluation of three culture methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples. *J Microbiol Biotechnol* 2009;19: 1259-64.

Tortoli E, Cichero P, Piersimoni C, Simonetti MT, Gesu G, Nista D. Use of BACTEC MGIT 960 for recovery of mycobacteria from clinical specimens: multicenter study. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:3578-82

van Ingen J, Bendien SA, de Lange WCM, Hoefsloot W, Dekhuijzen PNR, Boree MJ, van Soolingen D. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, the Netherlands. *Thorax* 2009;64: 502-506.

van Ingen J. Diagnosis of nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med* 2013;34: 103-109.

Whittier S, Hopfer RL, Knowles MR, Gilligan PH. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1993;31: 861-864.

Whittier S, Olivier K, Gilligan P, Knowles M, Della-Latta P. Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous mycobacteria in sputum samples from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2706-2708.

Hoofdstuk 5

IDENTIFICATIE VAN MYCOBACTERIËN

Uitgangsvraag

Welke methode is het meest geschikt om *Mycobacterium* isolaten te identificeren op (sub-) species niveau?

In dit hoofdstuk wordt de meest geschikte benadering beschreven om mycobacteriën die geïsoleerd worden uit klinisch materiaal te identificeren voor ondersteuning van de diagnostiek, de behandeling en het epidemiologisch onderzoek.

Inleiding

Tot in de jaren negentig werden in Nederland *Mycobacterium* isolaten geïdentificeerd aan de hand van hun groeikarakteristieken en hun biochemische functioneren, soms gecombineerd met serologische testen. Snelheid, reproduceerbaarheid en onderscheidend vermogen van deze klassieke testen waren beperkt.

De komst van DNA technologie heeft dit onderwerp revolutionair veranderd. Eind jaren tachtig werd het AccuProbe systeem (GenProbe, San Diego) op de markt gebracht, waarmee een *M. tuberculosis* complex cultuur binnen enkele uren kon worden herkend op basis van de detectie van specifiek ribosomaal RNA. In daarop volgende jaren werden ook AccuProbe assays geïntroduceerd voor het herkennen *M. kansasii*, *M. gordonae* en *M. avium* complex. Eind jaren negentig werden reverse line blots geïntroduceerd voor het onderscheiden van de (sub)species in het *M. tuberculosis* complex en het identificeren van de bij de mens meest frequent gevonden non-tuberculeuze *Mycobacterium* (NTM) species .

In het laatste decennium zijn in toenemende mate DNA sequentie analyse technieken gebruikt om bepaalde semi-geconserveerde delen van het mycobacterieel genoom te onderzoeken op species specifieke sequenties. Hierbij worden bijvoorbeeld het 16S rRNA gen, het rpoB gen, het hsp65 gen en 16S-23S internal transcribed spacer (ITS) onderzocht, of zelfs combinaties hiervan ([Springer, 1996](#); [de Zwaan, 2014](#); [Roth, 1998](#); [McNabb, 2004](#); [Adékambi, 2003](#); [Macheras, 2011](#); [Zelazny, 2009](#)). Door de toepassing van DNA technologie zijn in de laatste twee decennia veel nieuwe species toegevoegd aan de NTM, en ook enkele aan het *Mycobacterium tuberculosis* complex. De taxonomie heeft hierdoor een sterke ontwikkeling doorgemaakt, al is het einde hiervan nog lang niet in zicht. Het correct identificeren van mycobacterien is niet louter een academische exercitie. Door grote verschillen in overdraagbaarheid, klinische relevantie, geassocieerde ziektebeelden en gevoeligheid voor antibiotica kan een correcte identificatie van grote invloed zijn op het beleid.

Zoekvragen

1. Welke identificatiemethoden zijn er op dit moment beschikbaar?
2. Welke methoden zijn in Nederland aan te bevelen voor de identificatie van *M. tuberculosis* complex isolaten?
3. Welke methoden zijn in Nederland aan te bevelen voor de identificatie van NTM isolaten?

Selectiecriteria literatuur

Originele artikelen in het Engels tot en met december 2014 via PubMed. De volgende MeSH termen werden alleen en in combinaties gebruikt: "Mycobacterium/classification", "Mycobacterium/genetics", "RNA, Ribosomal, 16S") en "heat-shock protein 65, Mycobacterium"[Supplementary Concept] .

Samenvatting van literatuur

Bij het vinden van een positieve kweek dient eerst onderscheid te worden gemaakt tussen het *M. tuberculosis* complex, non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM; *M. leprae* is niet kweekbaar) en andere micro-organismen ([Griffith DE, 2007](#)). Hiervoor kan gekozen worden voor een moleculaire test die *M. tuberculosis* complex kan aantonen. Er zijn testen voor het direct aantonen van mycobacteriën in klinisch materiaal en methoden om kweken te identificeren. Sommige testen zijn voor beide doeleinden geschikt, zoals bijvoorbeeld een *IS6110* PCR of een commerciële test zoals de *MTBDRplus* (zie hoofdstuk moleculaire detectie). Vooral bij het analyseren van een klein aantal samples en voor het verkrijgen van een resultaat binnen enkele uren, biedt deze methode een aantal voordelen. Een tegenwoordig ook veel gebruikte optie voor het aantonen van *M. tuberculosis* complex in kweken is de immuno-chromatografische test. Er zijn inmiddels een aantal tests ontwikkeld die op basis van reactiviteit met *M. tuberculosis* specifieke antigenen identificatie als *M. tuberculosis* complex mogelijk maken in een vloeibaar kweekmedium. In Nederland is de TBc ID (BD Bioscience) beschikbaar, die het MPT64 antigeen detecteert. In studies toont deze methode een sensitiviteit van 95.2% tot 98.5% en specificiteit van 99.2% tot 100% ([Martin, 2011](#); [Lu, 2011](#)). Fout-negatieve uitslagen worden gezien bij stammen met mutaties in het gen dat MPT64 codeert en bij *M. bovis* BCG stammen waarin dit gen afwezig is. Fout-positieve uitslagen worden met name gezien bij zwaar gecontamineerde kweken.

Vanzelfsprekend is er een veelheid aan DNA/RNA in-house of commerciële technieken beschikbaar om op efficiënte wijze *M. tuberculosis* complex en NTM (sub)species te identificeren in positieve kweken.

In [Tabel 5.1](#) is een overzicht te zien van de momenteel meest relevante en gebruikte identificatiemethoden voor gekweekte mycobacteriën.

Tabel 5.1 In Nederland commercieel beschikbare reverse line blots voor *Mycobacterium* identificatie

Method	Fabrikant	Target	Herkenning
GenoType MTBC	Hain	gyrB/RD1	Alleen MTBC: <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. bovis BCG</i> , <i>M. caprae</i> & <i>M. microti</i>
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM	Hain	23S rRNA gen	<i>Mycobacterium</i> species* & MTBC 13 NTM species
GenoType <i>Mycobacterium</i> AS	Hain	23S rRNA gen	<i>Mycobacterium</i> species* 16 NTM species
INNO-LiPA MYCO-BACTERIA v2	Fujirebio	16S-23S ITS	<i>Mycobacterium</i> species*, MTBC 16 NTM species

MTBC: *Mycobacterium tuberculosis* complex

**Mycobacterium* species betekent hier dat het isolaat alleen geïdentificeerd wordt als behorend tot het genus *Mycobacterium*.

Voor iedere reverse line blot geldt dat de identificaties een versimpelde weergave van de realiteit kan zijn. De specificiteit van gebruikte probes is namelijk niet 100%, zoals bijvoorbeeld voor bepaalde zeldzame *M. avium* complex leden. Een aantal bekende pitfalls/misidentificaties is weergegeven in [Tabel 5.2](#) ([van Ingen, 2010](#); [Tortoli, 2010](#)). In algemene zin kan worden gesteld dat de probes voor het *M. avium* complex voor de commerciële systemen niet erg nauwkeurig zijn. De zeldzamere species binnen dit complex worden veelal onterecht als *M. avium* of *M. intracellulare* geïdentificeerd en een aantal species dat verwant is aan *M. scrofulaceum* (zoals *M. saskatchewanense*, *M. nebraskense*, *M. mantonii* en *M. seoulense*) wordt onterecht als *M. scrofulaceum* of *M. avium* complex geïdentificeerd ([van Ingen, 2010](#); [Tortoli, 2010](#); [van Ingen, 2009](#)). Gezien overeenkomsten in klinische manifestaties en gevoeligheid voor antibiotica levert dit in de praktijk weinig problemen op. Dit geldt ook voor het *M. fortuitum* complex, waarvan de meeste species ook niet nader dan tot het *M. fortuitum* complex niveau kunnen worden geïdentificeerd met de beschikbare reverse line blots. Omdat deze species minder pathogeen

geacht worden en behandeling afhankelijk is van het gevoeligheidspatroon ([Griffith DE, 2007](#)) is de moeizame identificatie echter klinisch geen belangrijk probleem. Met de voortschrijdende inzichten in taxonomie wordt ook een toenemend aantal species beschreven dat verkeerd geïdentificeerd wordt met deze reverse line blots. Hierbij dient wel aangetekend te worden dat de taxonomie nog volop in ontwikkeling is en de nieuwe species benamingen niet altijd veel toevoegen aan de diagnostiek.

Tabel 5.2 In Nederland relevante misidentificaties door reverse line blots

Methodie	Feitelijk species	Afgegeven identificatie
GenoType MTBC	<i>M. pinnipedii</i> (seal tuberculosis) <i>M. orygis</i> (antelope tuberculosis)	<i>M. africanum</i> <i>M. africanum</i>
GenoType <i>Mycobacterium</i> CM / AS	<i>M. riyadhense</i> <i>M. chimaera</i>	<i>M. tuberculosis</i> complex <i>M. intracellulare</i>
INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2	<i>M. tilburgii</i> <i>M. sherrisii</i> <i>M. holsaticum</i>	<i>M. simiae</i> <i>M. simiae</i> <i>M. gordonae</i>

De taxonomie binnen het *M. tuberculosis* complex wordt opgehangen aan een serie grote ("regions of difference") en kleine deleties ([Brosch, 2002](#); [Halse, 2011](#)) en variaties in het *gyrase* gen. Hoewel deze zeker in te zetten zijn om onder klinische isolaten onderscheid te maken tussen sub-groepen in het complex, bijvoorbeeld door de "regions of difference" aan te tonen middels real-time PCR ([Halse, 2011](#)), is de MTBC reverse line methode (Hain) een snelle, betrouwbare benadering om een nader onderscheid te maken in deze genetisch sterk geconserveerde bacteriën. In de variable number of tandem repeat (VNTR) typering kunnen de (sub) species die niet in de MTBC reverse line blot worden aangetoond wel worden herkend. Het gebruik van deze benadering is op dit moment de dagelijkse praktijk in Nederland, al is de evaluatie hiervan nog niet gepubliceerd (van Soolingen; persoonlijke mededeling). Het belang van de nadere identificatie binnen het *M. tuberculosis* complex is enerzijds vroegtijdig het bijsturen van therapie (*M. bovis* wordt langer behandeld en zonder pyrazinamide) en anderzijds het sturen van het bronopsporing en contactonderzoek (*M. bovis* en *M. africanum* laten doorgaans minder secundaire ziektegevallen zien ([de Jong, 2008](#)), het aantonen van andere, dierlijke species kunnen specifiek brononderzoek (on)nodig maken).

Zoals voor de bacteriologie in het algemeen, is er ook voor NTM een interesse in het ontwikkelen van MALDI-ToF als identificatie methode vanwege de snelheid en lage kosten. Hoewel inmiddels grote stappen zijn gezet in het standaardiseren van extractiemethoden ([Buchan, 2014](#)) is de waarde van deze methode nog onvoldoende vastgesteld ([van Ingen, 2015](#)).

Conclusies	
Niveau 1	Voor het onderscheiden van <i>M. tuberculosis</i> complex van NTM in een nieuw positieve vloeibare kweek zijn zowel PCR als immunochromatografische assays betrouwbaar en bruikbaar.
Niveau 3	De verschillende <i>M. tuberculosis</i> complex (sub)species (momenteel <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. bovis caprea</i> , <i>M. bovis BCG</i> , <i>M. canettii</i> , <i>M. pinnipedii</i> , <i>M. microti</i> , <i>M. mungi</i> en <i>M. orygis</i>) hebben ieder een eigen epidemiologie en/of behandeling. Op dit moment is de reverse line blot methode van Hain (MTBC) de meest efficiënte wijze om onderscheid te maken tussen de meest relevante (sub)species in het <i>M. tuberculosis</i> complex. Voor de meer uitzonderlijke (sub)species is de VNTR typering nodig om deze te herkennen. Er zijn diverse reverse line blot methoden (Innogenetics en Hain) die de meest frequente NTM species kunnen herkennen
Niveau 2	Met DNA sequencing van bepaalde semi-geconserveerde genomische targets, zoals het 16S rRNA gen, het hsp65 gen en het rpoB gen, kunnen de meeste NTM species herkend worden. Het onderscheidend vermogen van deze targets verschilt per species en NTM complex. Het meest gebruikt wordt de 16S sequencing en daar is een grote data base van beschikbaar. Het rpoB gen en het hsp65 gen kennen een groter onderscheidend vermogen, met name binnen de species van snel groeiende NTM.
Niveau 4	De ervaringen met Maldi-ToF zijn op dit moment te beperkt om deze identificatie aan te bevelen.

Overige overwegingen

Bij patiënten met NTM longinfecties is het niet ongebruikelijk dat in de tijd verschillende NTM species (soms gelijktijdig) aanwezig zijn. Bekend verschijnsel is het overgaan van een *M. avium* complex infectie in een *M. abscessus* infectie ([Griffith DE, 2007](#)). Om die reden adviseren richtlijnen voor diagnostiek en behandeling om

alle geïsoleerde NTM moleculair te identificeren; dit geldt ook voor vervolgisolaten ([Griffith DE, 2007](#); [van Ingen, 2015](#)). In de loop van 2015 en 2016 zullen nieuwe richtlijnen voor NTM infecties verschijnen (vanuit ATS/ERS/ESCMID/IDSA en vanuit Britse en Noord-Amerikaanse CF foundation) die hier ook voor zullen gaan pleiten (J. van Ingen, persoonlijke communicatie).

Er komt steeds meer klinisch bewijs dat het onderscheiden van subspecies binnen *M. abscessus* belangrijk is om de klinische relevantie in te schatten, omdat een van de subspecies (*M. abscessus* subsp. *massiliense*) een -door deletie- dysfunctioneel *erm* gen heeft en daardoor gevoelig is voor macroliden. De overige subspecies vertonen allen induceerbare macrolide resistentie. Dit onderscheid is slechts te maken met *hsp65* of *rpoB* gen sequencing, of door het *erm* gen zelf te amplificeren na identificatie als *M. abscessus* met een andere techniek ([van Ingen, 2015](#)).

Er is inmiddels ervaring opgedaan met MALDI-ToF in een aantal centra in Nederland. Hoewel met een regelmatig geupdate database het onderscheidend vermogen redelijk tot goed lijkt, is deze techniek niet geschikt voor direct gebruik in positieve vloeibare kweken. In die setting is slechts 50% van de isolaten direct te identificeren. De niet te identificeren kweken geven geen mooi eiwitspectrum vanwege vertroebeling door eiwitten uit afgedode keelflora en contaminanten. Slechts na subcultuur op vaste media wordt het mogelijk om >90% van de isolaten alsnog te identificeren. Dit vereist wel regelmatig "naschieten" om een kwalitatief optimaal spectrum te verkrijgen (J. van Ingen, RadboudUMC, manuscript ingestuurd voor publicatie).

Aanbevelingen

Een identificatie tot het subspecies niveau van *M. tuberculosis* complex isolaten is van belang voor de behandeling van de patiënt en het contactonderzoek.

Een juiste identificatie van NTM wordt aanbevolen om de behandeling van de patiënt te optimaliseren en voor epidemiologisch onderzoek.

Voor de identificatie van de (sub)species van *M. tuberculosis* complex en van NTM zijn de reverse line blot assays van Hain en Innogenetics/Fujirebio aan te bevelen.

Voor de identificatie van de (sub)species van NTM kan additionele sequentie analyse van 1 of meerdere genomische targets nodig zijn.

Alle geïsoleerde NTM dienen moleculair te worden geïdentificeerd.

Referenties

Adékambi T, Colson P, Drancourt M. rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 5699-5708.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Mar 19;99(6):3684-9.

Buchan BW, Riebe KM, Timke M, Kostrzewa M, Ledebor NA. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of Mycobacterium species in cultures using solid medium and broth. *Am J Clin Pathol* 2014; 141: 25-34.

de Jong BC, Hill PC, Aiken A, Awine T, Antonio M, Adetifa IM, Jackson-Sillah DJ, Fox A, Deriemer K, Gagneux S, Borgdorff MW, McAdam KP, Corrah T, Small PM, Adegbola RA. Progression to active tuberculosis, but not transmission, varies by Mycobacterium tuberculosis lineage in The Gambia. *J Infect Dis.* 2008 Oct 1;198(7):1037-43.

de Zwaan R, van Ingen J, van Soolingen D. Utility of rpoB gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 2544-51.

Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Russo S, Fordham von Reyn C, Wallace RJ Jr., Winthrop K. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.

Halse TA, Escuyer VE, Musser KA. Evaluation of a single-tube multiplex real-time PCR for differentiation of members of the Mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 2011 Jul;49(7):2562-7.

Lu PL, Yang YC, Huang SC, Jenh YS, Lin YC, Huang HH, Chang TC. Evaluation of the Bactec MGIT 960 system in combination with the MGIT TBc identification test for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2011; 49(6):2290-2.

Macheras E, Roux AL, Bastian S, Leão SC, Palaci M, Sivadon-Tardy V, Gutierrez C, Richter E, Rüsç-Gerdes S, Pfyffer G, Bodmer T, Cambau E, Gaillard JL, Heym B. Multilocus sequence analysis and rpoB sequencing of Mycobacterium abscessus (sensu lato) strains. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 491-9.

Referenties

Martin A, Bombeeck D, Fissette K, de Rijk P, Hernández-Neuta I, Del Portillo P, Palomino JC. Evaluation of the BD MGIT TBc Identification Test (TBc ID), a rapid chromatographic immunoassay for the detection of Mycobacterium tuberculosis complex from liquid culture. *J Microbiol Methods* 2011; 84(2):255-7.

McNabb A, Eisler D, Adie K, Amos M, Rodrigues M, Stephens G, Black WA, Isaac-Renton J. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of Mycobacterium species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3000-3011.

Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H. Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 139-147.

Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Böttger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 296-303.

Tortoli E, Pecorari M, Fabio G, Messinò M, Fabio A. Commercial DNA probes for mycobacteria incorrectly identify a number of less frequently encountered species. *J Clin Microbiol* 2010; 48(1):307-10.

van Ingen J, de Zwaan CC, Enaimi M, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, van Soolingen D. Re-analysis of 178 previously unidentifiable Mycobacterium isolates in the Netherlands, from the 1999-2007 period. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(9):1470-4.

van Ingen J, Lindeboom JA, Hartwig NG, de Zwaan R, Tortoli E, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, van Soolingen D. Mycobacterium mantanii sp. nov.; A novel pathogenic slowly growing scotochromogenic species. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; 59(11): 2782-7.

van Ingen J. Microbiological diagnosis of pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med* 2015; 36(1):43-54.

Zelazny AM, Root JM, Shea YR, Colombo RE, Shamputa IC, Stock F, Conlan S, McNulty S, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, Olivier KN, Holland SM, Sampaio EP. Cohort study of molecular identification and typing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium massiliense, and Mycobacterium bolletii. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1985-95.

Hoofdstuk 6

MOLECULAIRE DETECTIE

Uitgangsvraag

Wat is de meest optimale manier om moleculaire detectie van *M. tuberculosis* complex te gebruiken in de diagnostiek van tuberculose? Dit hoofdstuk gaat over de moleculaire detectie direct in patiëntmateriaal. Het identificeren en typeren van gekweekte *M. tuberculosis* complex isolaten wordt besproken in het hoofdstuk "Typeringen".

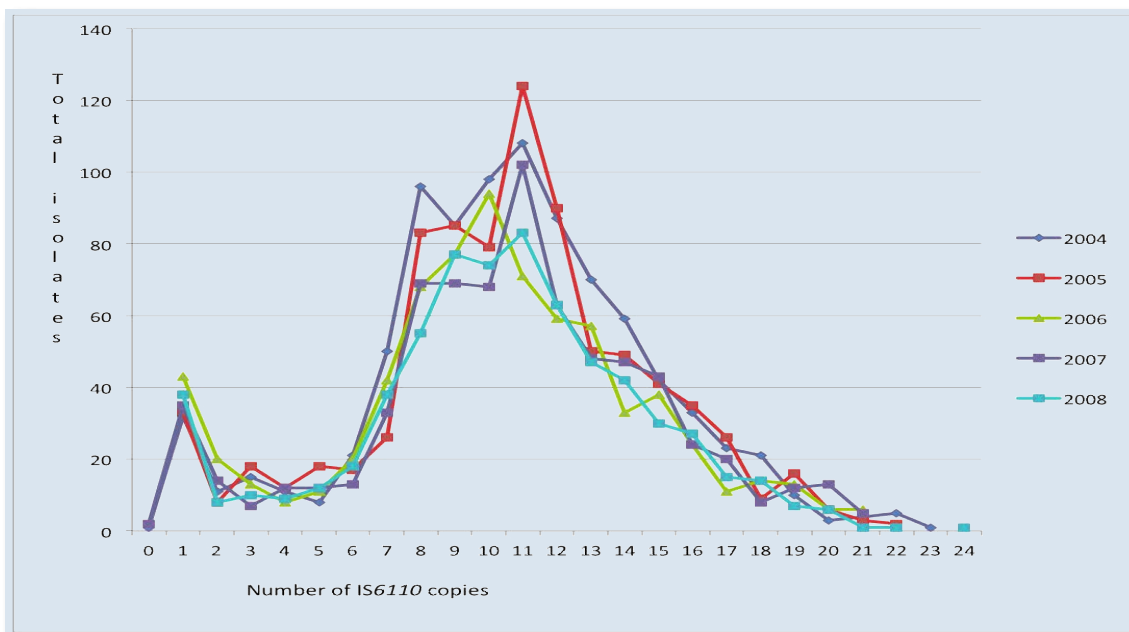
Inleiding

Om nucleïnezuren (DNA en/of RNA) van *M. tuberculosis* complex in patiëntmonsters aan te tonen, wordt gebruik gemaakt van een nucleïnezuur amplificatie techniek (NAT). Een NAT is gebaseerd op het principe dat kleine stukjes DNA (primers) zich specifiek aan een stuk van het DNA/RNA (target) van het te onderzoeken pathogeen kunnen binden. Dit stuk wordt vervolgens geamplificeerd. Er zijn verschillende NAT-en, b.v. polymerase-chain reaction (PCR), nucleic acid sequence based amplification (NASBA), transcription-mediated amplification (TMA) en loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Daarnaast zijn er verschillende methoden om het geamplificeerde product te detecteren. In Nederland wordt real-time PCR (RT-PCR of qPCR) het meest gebruikt, daarom wordt in deze richtlijn vooral aandacht aan deze techniek besteed.

Om een optimaal resultaat van de NAT te verkrijgen is het van belang dat de tijd tussen afname van de patiëntmaterialen en het verwerken ervan zo kort mogelijk is. Hoewel niet bekend is hoe lang patiëntmaterialen opgeslagen kunnen worden voor moleculaire diagnostiek naar mycobacteriële infecties, wordt het aanbevolen om het materiaal niet langer dan 1 week bij 4°C te bewaren. De sensitiviteit van de NAT wordt beïnvloed door de methode van DNA-extractie, de amplificatieparameters en de gebruikte primers/probes. De sensitiviteit neemt toe bij gebruik van primers voor een target sequentie die in meerdere kopieën aanwezig is.

Bij in-house ontwikkelde assays wordt vaak als target het insertie-element *IS6110* gebruikt omdat dit (veelal) in meerdere kopieën voorkomt in het genoom van het *M. tuberculosis* complex (zie [Figuur 6.1](#), bron RIVM).

In Nederland heeft een aantal laboratoria gezamenlijk een *IS6110* RT-PCR ontwikkeld ([Savelkoul, 2006](#)) die in ons land veel wordt gebruikt. Recent zijn de resultaten van de ervaringen van 6 Nederlandse ziekenhuizen gemeld in het "Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie" (December 2014) waarbij in een periode van 2 jaar (2004-2006) respiratoire en niet-respiratoire materialen zijn getest. De resultaten van de PCR van beide materiaalsoorten was vergelijkbaar, met de kweekopbrengst als standaard. Een nadeel is echter, dat in de literatuur *M. tuberculosis* stammen zijn beschreven waarbij het *IS6110* element ontbreekt ([Das, 1993](#); [Herrera, 1996](#); [Huyen, 2013](#); [Sahadevan, 1995](#); [Thierry, 1995](#); [Yuen, 1993](#)). De prevalentie van

Figuur 6.1 Speiding van het aantal kopiën IS6110 per genomeem

deze stammen varieert per regio: wereldwijd is dat rond 0,1%, in Vietnam rond 8% en in bepaalde delen van India rond 20% ([Chauhan, 2007](#)). Andere targets zoals het 16S rRNA, rpoB, sod, 32Kda en dnaJ gen kunnen ook worden gebruikt voor het detecteren van *M. tuberculosis*, al dan niet in combinatie met IS6110. Het mpt40 gen is niet geschikt in Nederland, omdat 8% van de geïsoleerde stammen dit gen mist.

Zoekvragen

1. Kan een NAT zowel op direct als op voorbehandeld materiaal worden uitgevoerd?
2. Welke NAT dient te worden gebruikt met welke sensitiviteit en specificiteit?
3. Kan de diagnostiek m.b.v. een NAT worden verbeterd door meerdere monsters per patiënt te analyseren?
4. Moet een positieve NAT worden bevestigd met een andere methode dan kweek?
5. Hoe snel moet een NAT worden uitgevoerd, hoe in het weekend?
6. Kan de NAT de auramine kleuring vervangen bij een aanvraag op alleen *M. tuberculosis*?
7. Welke controles moeten worden meegenomen bij het uitvoeren van een NAT?
8. Kan de NAT de kweek vervangen bij een aanvraag op alleen *M. tuberculosis*?

Selectiecriteria literatuur

Originele artikelen in het Engels tot en met februari 2014 via Pubmed.
Nationale Richtlijnen, Policy Statements WHO.

Samenvatting van literatuur per zoekvraag**1. Wat is het effect van de voorbehandeling?**

Er is weinig tot geen literatuur beschikbaar over het effect van voorbehandeling op de gevoeligheid van de NAT voor *M. tuberculosis* complex. Met voorbehandeling worden de stappen bedoeld die worden genomen om materiaal geschikt te maken voor kweek (homogeniseren, decontaminatie en concentratie). Uit niet-gepubliceerde gegevens van 41 monsters bij de GGD Amsterdam en het LUMC in Leiden blijkt dat er geen verschil is in gevoeligheid van de *IS6110* RT-PCR ([Savelkoul, 2006](#)) tussen voorbehandeld en niet-voorbehandeld materiaal.

Conclusie

Niveau 4

De NAT kan zowel op voorbehandeld als niet-voorbehandeld materiaal worden uitgevoerd maar homogenisatie blijft belangrijk.

2. Welke NAT dient te worden gebruikt?**Respiratoir materiaal**

Voor deze vraag is alleen de literatuur van de afgelopen vijf jaar doorgenomen (1 januari 2009 – 28 februari 2014). Hiervoor is gekozen omdat er in de afgelopen jaren veel ontwikkelingen hebben plaatsgevonden op het gebied van moleculaire detectie, bijvoorbeeld de conventionele PCR is vrijwel volledig vervangen door RT-PCR. De nieuwe methoden hebben een hogere sensitiviteit en specificiteit dan de oudere. De literatuur is daarom verder geselecteerd op basis van de huidige meest gebruikte technieken. Studies met alleen conventionele PCR of andere weinig gebruikte NAT-en zijn niet mee genomen (voor de volledige zoek-, inclusie- en exclusiecriteria, zie [Bijlage 1](#)). Tevens is de literatuur tot en met 2007 samengevat in een systematische review ([Dinnes, 2007](#)).

Studies die voldoen aan de bovengenoemde zoekcriteria zijn samengevat in [Tabel 6.1](#). De meest gebruikte methoden in de recente literatuur zijn een in-house *IS6110* RT-PCR, en de commerciële NAT: Amplified *M. tuberculosis* Direct Test (AMDT, Gen-

Probe, San Diego, CA, USA; een NASBA methode met 16S rRNA als target), de COBAS TaqMan *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostic System, Basel, Switzerland; RT-PCR met het 16S rRNA gen als target) en de volledig geautomatiseerde GeneXpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA; RT-PCR met *rpoB* als target). Deze drie commerciële testen zijn ook door de FDA goedgekeurd voor respiratoir materiaal. De gevoeligheid van de NAT's voor respiratoir microscopie (is auramine en/of ZN) positief materiaal is 69–100% (gemiddeld 94,5%) en voor microscopie negatief materiaal 28–88,9% (gemiddeld 62,8%) ([Tabel 6.1](#)).

Afhankelijk van de gebruikte gouden standaard en discrepantieanalyse varieert de specificiteit tussen 50 en 100%. De meeste studies melden een specificiteit van >95% voor zo wel microscopie positief als negatief materiaal. De gemiddelde gevoeligheid per methode voor microscopie positief patiëntenmateriaal is 99,9% (99,6–100%) voor *IS6110* RT-PCR, 92,4% (69–100%) voor GeneXpert en 96,7% (87–96,9%) voor COBAS TaqMan. Voor de andere methoden zijn er niet genoeg studies om een gemiddelde gevoeligheid te berekenen. Voor microscopie negatief patiëntenmateriaal zijn de getallen 61,1% (40–75,4%) voor *IS6110* RT-PCR, 61,1% (28–73,1%) voor GeneXpert en 59,1% (34,9–79,5%) voor COBAS TaqMan. Een recente *in vitro* studie laat zien dat de analytische gevoeligheid van de GeneXpert lager zou zijn dan dat van de andere NAT's ([Akkerman, 2013](#)). Uit de bovengenoemde getallen blijkt echter dat er weinig verschillen zijn tussen de NAT's op klinische monsters, hoewel de laagste sensitiviteit voor zowel microscopie positief (69%) als negatief materiaal (28%) voor de GeneXpert zijn gerapporteerd.

Het is belangrijk te realiseren dat de methode van DNA-extractie in de GeneXpert anders is dan bij de andere NAT's. De GeneXpert gebruikt een filter om micro-organismen uit het monster op te vangen en vervolgens te lyseren, terwijl DNA-extractie methoden ook vrij DNA isoleren uit het patiëntmateriaal. Hierdoor is de GeneXpert mogelijk minder geschikt voor het analyseren van ingevroren patiëntmateriaal of patiëntmateriaal dat gelyseerde *M. tuberculosis* bevat.

Niet-respiratoir materiaal

In eerste instantie is gezocht naar literatuur met daarin geïncludeerde verschillende soorten niet-respiratoir materialen. De literatuur is verder geselecteerd volgens vergelijkbare inclusie- en exclusiecriteria als voor respiratoir materiaal (zie Bijlage 2.). Studies die voldoen aan deze criteria zijn samengevat in [Tabel 6.2](#)

De meeste studies voor niet-respiratoir materiaal maken gebruik van de bovengenoemde NAT's. De studies in [Tabel 6.2](#) bevatten verschillende soorten niet-respiratoir materiaal (o.a. liquor, biopten, bloed, pleuravocht, ascites, urine, feces, beenmerg). Voor al deze materialen is de sensitiviteit/specificiteit gecombineerd tot een getal. In studies waar een onderscheid is gemaakt tussen microscopie positief en negatief ma-

teriaal varieert de sensitiviteit respectievelijk tussen 96 en 100% (gemiddeld 99,4%) en 0 en 80% (gemiddeld 54,4%). In studies waar geen onderscheid wordt gemaakt tussen microscopie positief en negatief materiaal komt de gemiddelde gevoeligheid uit op 80,2% (58,3 – 100%). De gerapporteerde specificiteit varieert tussen 66,7 en 100% (gemiddeld 94%). Net als bij respiratoir materiaal blijken er geen systematische verschillen te zijn tussen de verschillende NAT's, maar hierbij dient opgemerkt te worden dat de hoeveelheid studies per NAT gering is.

Ook is literatuur opgenomen waarin het gebruik van NAT voor één specifiek niet-respiratoir materiaalsoort is onderzocht. Vanwege de geringe hoeveelheid beschikbare artikelen zijn hier ook studies meegenomen die niet voldoen aan de eerder genoemde zoek- en inclusiecriteria (bv. gebruik van conventionele PCR, studie in hoog-endemische landen, NAT niet vergeleken met kweek, studies voor 2009; voor volledige zoekcriteria, zie [Bijlage 2](#)). Deze literatuur is hieronder samengevat per materiaalsoort.

Liquor

Een meta-analyse uit 2003 meldt een sensitiviteit en specificiteit van 56% en 98% voor commerciële NAT's. Voor in-house NAT's zijn de resultaten te verschillend om conclusies te kunnen trekken ([Pai, 2003](#)). Vanwege de snelheid wordt het gebruik van (commerciële) NAT's aanbevolen naast conventionele methoden. Een NAT kan niet worden gebruikt om meningitis tuberculosa uit te sluiten. Literatuur na 2003 bevat vooral studies met in-house PCR's met verschillende targets, vaak in multiplex of nested-PCR opzet ([Bandyopadhyay, 2008](#); [Chaidir, 2012](#); [Dora, 2008](#); [Halder, 2012](#); [Kusum, 2011](#); [Nagdev, 2011](#); [Rafi, 2007](#); [Rafi, 2007b](#); [Sharma K, 2010](#); [Srivastava, 2006](#); [Takahashi, 2008](#)). Deze studies melden een gemiddelde gevoeligheid van 65% (51 – 100%) en specificiteit van 97% (91 – 100%). In twee recente studies is de GeneXpert gebruikt, en de gerapporteerde sensitiviteit en specificiteit zijn 59,3% en 99,5% ([Nhu, 2013](#)) en 67% en 94% ([Patel, 2013](#)).

Lymfklieren

Uit een systematisch review uit 2007 blijkt dat de gepubliceerde sensitiviteit (2 – 100%) en specificiteit (28 – 100%) sterk uiteenlopen ([Daley, 2007](#)). Ook hier is de conclusie dat een NAT alleen niet kan worden gebruikt om een infectie met *M. tuberculosis* complex uit te sluiten. Meer recente literatuur met lymfklierbiopten en cytologische punctiemateriaal meldt eveneens gevarieerde getallen: gemiddelde gevoeligheid van 75% (42 – 88%) en specificiteit van 87% (67 – 100%) ([Cortez, 2011](#); [Derese, 2012](#); [Mittal, 2010](#); [Nopvichai, 2009](#); [Sharma M, 2010](#); [Verma, 2010](#)).

Pleuravocht en -biopten

Een systematisch review uit 2004 meldt een sensitiviteit/specificiteit van 62%/98% voor commerciële NAT's, de getallen voor in-house testen zijn erg gevarieerd ([Pai, 2004](#)). Conclusie luidt, net als voor liquor en lymfklieren, dat een NAT kan worden gebruikt in combinatie met conventionele technieken en klinische gegevens maar niet om de diagnose TB uit te sluiten. Studies na 2007, vooral met in-house conventionele (nested) PCR, komen uit op een gemiddelde gevoeligheid van 63% (52 – 95%) en specificiteit van 87% ([Bandyopadhyay, 2008](#); [Srivastava, 2006](#); [Baba, 2008](#); [Gao, 2012](#); [Gill, 2013](#); [Kalantri, 2011](#); [Kumar, 2010](#); [Liu, 2007](#); [Maurya, 2011](#); [Rosso, 2011](#)). Het gebruik van GeneXpert op pleuravocht is in drie recente studies getest ([Christopher, 2013](#); [Friedrich, 2011](#); [Porcel, 2013](#)). Alle studies melden een lage gevoeligheid (15%, 16% en 25%) en een specificiteit van 100%. Deze data wijzen erop dat de gevoeligheid van de GeneXpert voor pleuravocht lager is dan van (sommige) andere NAT's. Dit heeft mogelijk te maken met het paucibacillaire karakter van pleuravocht en de feit dat de GeneXpert geen vrij DNA in patiëntmateriaal kan aantonen (zie boven). De lage gevoeligheid van de GeneXpert voor pleuravocht wordt ook in de meest recente WHO Policy Statement genoemd ([WHO, 2013](#)).

Overige materiaalsoorten

Er zijn kleine studies en case reports te vinden over het gebruik van NAT's voor andere materiaalsoorten, zoals ascites, verschillende biopten (o.a. peritoneum, bot, pericard, huid), beenmerg, urine, pericardvocht en gewrichtspunctaat. Deze studies zijn samengevat in een recent review ([Mehta, 2012](#)). Net als voor de andere niet-respiratoire materialen, variëren de gerapporteerde sensitiviteit en specificiteit voor deze materiaalsoorten sterk.

Conclusies	
Niveau 2	Een in-house RT-PCR, de AMTD test, de COBAS TaqMan <i>M. tuberculosis</i> test of de GeneXpert MTB/RIF kan worden gebruikt om zowel microscopie positief als negatief respiratoir materiaal te analyseren voor de aanwezigheid van <i>M. tuberculosis</i> complex. Er zijn geen opvallende verschillen in de sensitiviteit en specificiteit van deze testen aangetoond.
Niveau 3	De bovengenoemde NAT's kunnen ook worden gebruikt om (zowel microscopie positief als negatief) niet-respiratoir materiaal te analyseren voor de aanwezigheid van <i>M. tuberculosis</i> complex. Het is niet duidelijk of alle methoden even geschikt zijn voor alle materiaalsoorten; de GeneXpert heeft een lage gevoeligheid voor detectie van <i>M.tuberculosis</i> complex in pleuravocht

3. Wordt een NAT verbeterd door meerdere monsters te testen?

Het is bekend dat het analyseren van meerdere monsters per patiënt de gevoeligheid van TB diagnostiek vergroot. De WHO raadt aan om bij verdenking op pulmonale tuberculose twee monsters per patiënt te testen. Er is weinig literatuur te vinden over het vergroten van de gevoeligheid bij meerdere monsters op NAT. De beschikbare studies laten echter zien dat net als voor de kweek, het analyseren van meerdere monsters per patiënt de gevoeligheid van de NAT vergroot ([Tabel 6.3](#)). Het gaat hier om respiratoir materiaal, maar het is aannemelijk dat de gevoeligheid van de NAT ook voor andere materialen omhoog gaat door het analyseren van meerdere monsters. In sommige studies die in [Tabel 6.1](#) en [Tabel 6.2](#) zijn genoemd, is de sensitiviteit ook op basis van meerdere monsters per patiënt gerekend.

Conclusie	
Niveau 1	Het analyseren van meerdere monsters vergroot de gevoeligheid van de NAT.

4. Moet een positieve NAT worden bevestigd?

Er is geen literatuur te vinden over het nut van een bevestigingstest bij een positieve NAT. In de meeste recente studies wordt geen bevestigingstest gebruikt ([Tabel 6.1](#) en [Tabel 6.2](#)). De werkgroep is van mening dat een tweede test niet nodig is, mits de NAT als valide wordt aangemerkt op basis van kwaliteitscriteria die zijn vastgelegd (zie onder, [punt 6](#)). Het is wel nodig om materiaal met een positieve NAT altijd op kweek te zetten, om de NAT uitslag te bevestigen en om een volledige gevoeligheidsbepaling en typering uit te kunnen voeren op de gekweekte stam. In sommige gevallen (bijvoorbeeld bij eerder behandelde patiënten) is het belangrijk om te weten of het NAT-positieve materiaal nog levende mycobacteriën bevat. Echter, het kweken van NAT-positief materiaal is niet altijd mogelijk (bijvoorbeeld in het geval van parafine coupes), of soms blijft de kweek om andere redenen negatief. In zulke gevallen kan het zinvol zijn om de NAT door een andere (moleculaire) methode te bevestigen. Moleculaire resistentiebepalingen kunnen bijvoorbeeld als bevestigingstest worden gebruikt (zie hoofdstuk Resistentiebepalingen).

Conclusie	
Niveau 4	Een bevestigingstest (anders dan kweek) voor een positieve NAT is niet nodig, mits de NAT als valide wordt aangemerkt op basis van vastgelegde kwaliteitscriteria. Als kweek niet mogelijk is, of negatief blijft, kunnen andere moleculaire testen worden gebruikt om een positieve NAT te bevestigen.

5. Moet een NAT snel worden uitgevoerd?

Er is weinig literatuur te vinden over de benodigde snelheid van de NAT diagnostiek. De CDC richtlijn uit 2009 geeft aan dat de NAT uitslag binnen 48 uur na monsterafname bekend moet zijn ([MMWR, 2009](#)). De werkgroep is van de mening dat in elk laboratorium de mogelijkheid moet bestaan om moleculaire cito diagnostiek op *M. tuberculosis* uit te voeren, ook in het weekend. De uitslag van een cito aanvraag moet binnen 48 uur bekend zijn om een gerichte therapie in te kunnen stellen, andere verwekkers te kunnen uitsluiten en resistentie snel te kunnen herkennen. Ondanks de aanbevelingen van de CDC, wordt het niet nodig geacht om een tijdlimiet aan te geven voor routinematige NAT op *M. tuberculosis* complex.

Aanbeveling
Elk laboratorium moet de mogelijkheid bieden voor een cito-NAT op <i>M. tuberculosis</i> complex, ook in het weekend. De uitslag van een cito bepaling moet binnen 48 uur bekend zijn.

6. Kan de NAT de auraminekleuring vervangen?

Vergeleken met auramine microscopie, ligt de toegevoegde waarde van de NAT in ([MMWR, 2009](#)):

- een grotere positief voorspellende waarde van tuberculose (> 95%) in auramine positieve monsters in een omgeving waarin ook non-tuberculeuze mycobacteriën voorkomen en
- het vermogen om snel de aanwezigheid van *M. tuberculosis* aan te tonen in 50% - 80% van de auramine negatieve, kweek-positieve monsters.

De NAT kan bij respiratoire materialen de auramine kleuring niet vervangen, omdat de interpretatie van tuberculose een combinatie is van NAT, microscopie en kweek

([MMWR, 2009](#)). Bij materialen zoals liquor en paraffine coupes voor onderzoek op *M. tuberculosis* complex lijkt de NAT de auramine wel te kunnen vervangen ([Totsch, 1996](#); [van der Zanden, 1998](#))

Conclusie	
Niveau 2	De NAT kan bij respiratoire materialen de auramine niet vervangen, omdat de interpretatie van TB een combinatie is van NAT, microscopie en kweek.

7. Welke controles moeten worden meegenomen?

Bij elke NAT in een niet gesloten systeem moet tenminste een positieve controle, een negatieve controle en een interne controle worden meegenomen. De NAT worden als valide aangemerkt op basis van kwaliteitscriteria die zijn vastgelegd voor de Cq waarden van zowel de positieve controle (PCR bepaling is valide) als de (interne) remmingscontrole (valide negatief resultaat van het betreffende materiaal). Als positieve controle wordt een positieve opwerkingscontrole (POC) gebruikt, bestaande uit positief materiaal (gekweekt of klinisch materiaal) met een vastgestelde hoeveelheid van de betreffende target, die simultaan de hele analyseprocedure doorloopt. Op deze wijze wordt zowel de PCR reactie als de target-specifieke extractieprocedure gecontroleerd. Indien het target niet te kweken is en klinisch materiaal schaars is, is het gebruik van een positieve DNA controle van de specifieke target mogelijk als amplificatiecontrole. Er is altijd tenminste één negatieve controle per run nodig die de gehele opwerking en amplificatie doorlopen (negatieve opwerkingscontrole, NOC).

Bij grote runs (aantal door het lab te bepalen) dienen meerdere negatieve controles verspreid tussen de klinische monsters te worden gebruikt. Een interne controle (IC) wordt meegenomen als controle op remming en correcte NA isolatie. Een IC is een PCR target dat in een vaste concentratie aan het monster wordt toegevoegd en de extractie en amplificatie/detectiestappen doorloopt. Indien de procedure accuraat is verlopen en geen remming optreedt, zal de Cq waarde van de IC bij alle monsters rond dezelfde Cq liggen. Hierbij mag de toegevoegde IC niet interfereren met de detectie-gevoeligheid van het beoogde target, en heeft altijd een vastgestelde Cq in het gebruikte klinische materiaalsoort. De Cq-waarde van de controle dient binnen een gedefinieerde grens te vallen. Daarnaast dient er een vastgelegde procedure te zijn die beschrijft wat te doen na het vinden van een geremd patiëntmateriaal ([Bustin, 2009](#); [WMDI, 2013](#)).

Conclusie	
Niveau 1	Voor moleculaire testen in niet gesloten systemen dient elke keer als een NAT wordt uitgevoerd een POC, een NOC en een IC te worden meegenomen.

8. Kan de NAT de kweek vervangen?

Uit de literatuur vermeld in [Tabel 6.1](#) blijkt dat gevoeligheid van de NAT's op microscopie negatief respiratoir materiaal laag is (rond 60%). Echter, de meeste studies gebruiken kweek als gouden standaard om de gevoeligheid van de NAT te bepalen, terwijl de gevoeligheid van de kweek op microscopie negatief materiaal ook niet 100% is ([Al Zahrani, 2001](#)). De meeste studies beschouwen NAT-positieve maar kweek-negatieve monsters als fout positief of nemen deze monsters niet mee in het berekenen van de gevoeligheid. In sommige studies is de gevoeligheid van de kweek gebaseerd op meerdere monsters, terwijl die van de NAT op basis van één monster is berekend. Door deze redenen kan de gevoeligheid van de NAT onderschat worden. In studies waarin een andere gouden standaard (bijvoorbeeld klinische gegevens, vervolgonmonster) is gebruikt, is er weinig verschil in gevoeligheid van de kweek en de NAT: Chen et al, 2012 ([Chen, 2012](#)): kweek 89,2%, AMTD 95,2%; Drouillon et al, 2009 ([Drouillon, 2009](#)): kweek 80%, AMTD 86,7%; Cui et al, 2012 ([Cui, 2012](#)): kweek 61,7%, AMTD 67,6%. Deze getallen voor de gevoeligheid zijn samengevoegd voor microscopie positief en negatief materiaal. Bij deze studies zijn er gebreken in de opzet, en kunnen deze niet worden gebruikt om definitieve conclusies te trekken. Het gebrek aan een algemeen geaccepteerd, uniforme gouden standaard (anders dan kweek) draagt bij aan dit probleem.

Recent zijn de resultaten van de ervaringen van 6 Nederlandse ziekenhuizen gemeld in het "Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie" (December 2014) waarbij in een periode van 2 jaar (2004-2006) respiratoire en niet-respiratoire materialen zijn getest met de *IS6110* RT-PCR. Volgens deze data is er nauwelijks verschil in de gevoeligheid van de NAT en de kweek. Echter, de ervaringen van de werkgroepleden met de gevoeligheid van van deze NAT zijn wisselend.

De bovengenoemde overwegingen gelden ook voor niet-respiratoir materiaal. In een studie waar de GeneXpert wordt vergeleken met de BacTec MGIT kweek voor >500 niet-respiratoire monsters (verschillende materiaalsoorten), was de gevoeligheid van de kweek lager dan van de NAT (53 vs. 81%) ([Vadwai, 2011](#)). Deze studie ge-

bruikte klinische gegevens en histologie als gouden standaard. Er zijn aanwijzingen dat voor bepaalde materiaalsoorten, vooral liquor en pleuravocht, een NAT duidelijk gevoeliger kan zijn dan de kweek. Echter, in veel studies naar meningitis tuberculosa is de gebruikte kweektechniek niet optimaal (bv. alleen op Lowenstein-Jensen medium). In drie recente studies is de kweek met de BacTec MGIT verricht. In één van deze studies ([Takahashi, 2008](#)), die klinische diagnose en therapierespons als gouden standaard gebruikt, was de NAT (in-house nested PCR) aanzienlijk gevoeliger (95,8%) dan de kweek (33,3%).

Ook in de tweede studie bleek de NAT (*IS6110* RT-PCR) gevoeliger te zijn dan de kweek (67% vs. 33%) ([Chaidir, 2012](#)). De gevoeligheid van de NAT werd op basis van klinische diagnose bepaald.

De derde studie heeft GeneXpert als NAT gebruikt en een klinische algoritme als gouden standaard. In deze studie had de kweek een gevoeligheid van 66,5% en de GeneXpert een gevoeligheid van 59,3% ([Nhu, 2013](#)). Voor pleuravocht zijn er drie recente studies die een hogere gevoeligheid voor een NAT (in-house PCRs met verschillende targets) dan voor kweek melden: 60,7% vs. 46,1% ([Maurya, 2011](#)); 51,7% vs. 10,6% ([Kumar, 2010](#)) en 94,8% vs. 10,6% ([Gao, 2012](#)). Het is echter moeilijk om conclusies te trekken op basis van deze studies, omdat de gerapporteerde gevoeligheden voor zowel de NAT als de kweek erg variëren.

Al met al is de werkgroep van de mening dat er te weinig bewijs is om te kunnen concluderen dat de NAT voor één of meerdere materiaalsoorten de kweek zou kunnen vervangen. Het belangrijkste voordeel voor het gebruik van een NAT is dan ook dat de tijd tot diagnose aanzienlijk kan worden verkort in vergelijking met de kweek ([Boehme, 2010](#)). Om deze reden, adviseert de WHO het gebruik van GeneXpert op zowel microscopie positief als negatief respiratoir en niet-respiratoir materiaal (met de uitzondering van pleuravocht) ([WHO, 2013](#); [WHO, 2011](#)). Ook volgens de CDC richtlijn moet bij verdenking op pulmonale tuberculose tenminste één respiratoir monster met een NAT worden onderzocht ([MMWR, 2009](#)).

Conclusies	
Niveau 1	Er is onvoldoende bewijs om te kunnen concluderen dat de NAT even gevoelig is als de kweek
Niveau 2	Het gebruik van een NAT kan de tijd tot de diagnose aanzienlijk verkorten in vergelijking met kweek

Aanbevelingen

Auramine-positief respiratoir en niet-respiratoir materiaal dient met een in-house RT-PCR (mits gevalideerd en op schrift vastgesteld volgens de geldende certificatie regels), de AMTD test, de COBAS TaqMan *M. tuberculosis* test of de GeneXpert MTB/RIF te worden onderzocht op de aanwezigheid van *M. tuberculosis* complex. Bij het gebruik van *IS6110* als target dient men er bewust van te zijn dat *IS6110* bij sommige stammen ontbreekt. Dit kan leiden tot een fout-negatieve test.

Bij sterke verdenking op tuberculose, dient auramine-negatief respiratoir en niet-respiratoir materiaal ook met de bovengenoemde moleculaire technieken te worden onderzocht, omdat een positieve uitslag de tijd tot diagnose significant kan verkorten

Het analyseren van meerdere monsters per patiënt m.b.v. een NAT is zinvol, omdat daardoor de gevoeligheid van de NAT wordt vergroot. Bij verdenking pulmonale tuberculose, dienen er twee monsters per patiënt te worden geanalyseerd.

Een negatieve NAT mag niet worden gebruikt om tuberculose uit te sluiten, en een NAT kan de kweek niet vervangen.

De moleculaire detectie kan op zowel voorbehandeld als niet-voorbehandeld materiaal worden gebruikt mits er wel homogenisatie heeft plaatsgevonden. Een bevestigingstest (anders dan kweek) voor een positieve NAT is niet nodig, maar kan worden gebruikt als de kweek negatief blijft of niet mogelijk is. Moleculaire resistentiebepalingen kunnen worden gebruikt als bevestigingstest.

Een NAT kan de auramine-kleuring op respiratoir materiaal niet vervangen. Voor andere materialen zoals liquor en paraffine-coupes kan dit wel.

Elk laboratorium moet de mogelijkheid bieden voor het uitvoeren van een cito-NAT op *M. tuberculosis* complex ook in het weekend. Laboratoria die geen moleculaire diagnostiek doen, dienen een cito-regeling af te spreken met een ander laboratorium. De uitslag van een cito-uitslag moet in principe binnen 48 uur bekend zijn.

Tabel 6.1 Studies met NAT voor diagnostiek van tuberculose op respiratoir materiaal

Studie	Methode	Sensitiviteit*	Specificiteit
Drouillon, 2009	AMTD 16S rRNA NASBA	86,7%**	93,9%
Halse, 2010	<i>IS6110</i> RT-PCR	99,6% (ZN+)**	100% (ZN+)
		75,4% (ZN-)	99,9% (ZN-)
Kim, 2011	COBAS TaqMan RT-PCR	79,1%	98,2%
Armand, 2011	GeneXpert MTB/RIF	100% (ZN+)	ND***
		57% (ZN-)	
	<i>IS6110</i> RT-PCR	100% (ZN+)	
		68% (ZN-)	
Bowles, 2011	GeneXpert MTB/RIF	93,8%**	92,0%**
Cui, 2012	TRCRapid 16S rRNA TRC	67,6%	100%
Gomez, 2011	<i>IS6110</i> RT-PCR	97%	100%
	IS1081 RT-PCR	96%	100%
	RD1 RT-PCR	95%	100%
Hanif, 2011	GeneXpert MTB/RIF	98% (ZN+)	ND
		69% (ZN-)	
Hur, 2011	Artus MTB RT-PCR	97,8%	85,1%
Inoue, 2010	<i>IS6110</i> RT-PCR	84% (retrosp)##	97% (retrosp)
		96,5% (prosp)	98,6% (prosp)
Leung, 2011	Multiplex RT-PCR (<i>IS6110</i> en Rv0927-PstS3)	100% (GS: kweek)#	94.3% (GS: kweek)
		100% (GS: klin dg)	100% (GS: klin dg)
Malbruny, 2011	GeneXpert MTB/RIF	100%	100%
Miller, 2010	GeneXpert MTB/RIF	100% (ZN+)	97%
		60% (ZN-)	
	<i>IS6110</i> RT-PCR	100% (ZN+)	97%
		40% (ZN-)	
Moure, 2011	GeneXpert MTB/RIF	78%	100%

Studie	Methode	Sensitiviteit*	Specificiteit
Simonnet, 2011	16S rRNA NASBA	100%**	100%
Tanaka, 2010	TRCRapid 16S rRNA TRC^	100% (ZN+)	97% (ZN+)
		88,9% (ZN-)	100% (ZN-)
Teo, 2011	GeneXpert MTB/RIF	95,6% (ZN+)	89%
		59% (ZN-)	
	AMTD 16S rRNA NASBA	97,8% (ZN+)	87,1%
		77,3% (ZN-)	
Yang, 2011	COBAS TaqMan RT-PCR	96,9% (ZN+)	100% (ZN+)
		79,5% (ZN-)	98,7% (ZN-)
Zeka, 2011	GeneXpert MTB/RIF	100% (ZN+)	100% (ZN+)
		68,6% (ZN-)	100% (ZN-)
Al-Ateah, 2012	GeneXpert MTB/RIF	95,4%	100%
Chen, 2012	Care TB RT-PCR	91,2%	100%
	AMTD 16S rRNA NASBA	95,2 %	97,9%
Duarte, 2012	Artus MTB RT-PCR	94%	90%
Jiang, 2012	16S rDNA RT-PCR	83,9%**	89,9%
Lira, 2012	<i>IS6110</i> RT-PCR	87,9%	98%
Papaventsis, 2012	AMTD 16S rRNA NASBA	100% (GS: kweek)	77% (GS: kweek)
		58% (GS: klin dg)	96% (GS: klin dg)
Seagar, 2012	<i>IS6110</i> RT-PCR	100%**	96%
	MTB Q-Alert RT-PCR	92%	96%
	ITS RT-PCR	87%	50%
Tortoli, 2012	COBAS TaqMan RT-PCR	81,15%	99,95%
Antonienka, 2013	GeneXpert MTB/RIF	94,1% (ZN+)	96,2%
		68% (ZN-)	
	COBAS TaqMan RT-PCR	93,3% (ZN+)	100%
		68% (ZN-)	
Bloemberg, 2013	COBAS TaqMan RT-PCR	88,4%	98,8%
Deggim, 2013	GeneXpert MTB/RIF	83%	97%

Studie	Methode	Sensitiviteit*	Specificiteit
Kwak, 2013	GeneXpert MTB/RIF	88,9% (ZN+)	100%
		73,1% (ZN-)	100%
Lee HY, 2013	COBAS TaqMan RT-PCR	94,4% (ZN+)	78,1%
		34,9% (ZN-)	98,2%
Lee MR, 2013	GeneXpert MTB/RIF	81,6%	100%
Lira, 2013	<i>IS6110</i> RT-PCR	87,9%	98%
Park, 2013	GeneXpert MTB/RIF	69% (ZN+)	100%
		67% (ZN-)	
	COBAS TaqMan RT-PCR	87% (ZN+)	100%
		54% (ZN-)	
Sohn, 2014	GeneXpert MTB/RIF	86% (ZN+)	100%
		28% (ZN-)	100%

* sensitiviteit en specificiteit voor respiratoir materiaal; alle monsters (ZN+ en ZN-), tenzij anders aangegeven

** respiratoir en niet-respiratoir materiaal

*** ND = not determined

GS = gouden standaard; klin dg = klinische diagnose

retersp = retrospectieve arm van de studie; prosp = prospectieve arm van de studie

^ TRC = transcription-reverse transcription concerted reaction

Tabel 6.2 Studies met NAT voor diagnostiek van tuberculose op niet-respiratoir materiaal

Studie	Methode	Sensitiviteit*	Specificiteit
Armand, 2011	GeneXpert MTB/RIF	100% (ZN+)	ND**
		37% (ZN-)	
	IS6110 RT-PCR	100% (ZN+)	
		71% (ZN-)	
Causse, 2011	GeneXpert MTB/RIF	95%	100%
	COBAS TaqMan RT-PCR	78%	98%
Hillemann, 2011	GeneXpert MTB/RIF	77,3%	98,3%
Malbrunoy, 2011	GeneXpert MTB/RIF	85,7%	97,3%
Miller, 2010	GeneXpert MTB/RIF	100% (ZN+)	87%
		75% (ZN-)	
	IS6110 RT-PCR	100% (ZN+)	87%
		0% (ZN-)	
Moure, 2011	GeneXpert MTB/RIF	61% (ZN-)	100%
Moure, 2011b	GeneXpert MTB/RIF	58,3%	100%
Simonnet, 2011	16S rRNA NASBA	100%	97,1%
Tanaka, 2010	TRCRapid 16S rRNA TRC	100% (ZN+)	66,7% (ZN+)
		80% (ZN-)	99,7% (ZN-)
Vadwai, 2011	GeneXpert MTB/RIF	96% (ZN+)	99,6%
		64% (ZN-)	
Zeka, 2011	GeneXpert MTB/RIF	100% (ZN+)	100% (ZN+)
		47,4% (ZN-)	100% (ZN-)
Al-Ateah, 2012	GeneXpert MTB/RIF	94,4%	100%
Gous, 2012	16S rDNA RT-PCR	64,3%	84%

Studie	Methode	Sensitiviteit*	Specificiteit
Papaventsis, 2012	16S rRNA NASBA	100%	97,5%
Tortoli, 2012	COBAS TaqMan RT-PCR	64,3%	99,9%
Tortoli, 2012b	GeneXpert MTB/RIF	81,3%	99,8%
Bloemberg, 2013	COBAS TaqMan RT-PCR	63,6%	94,6%

* sensitiviteit en specificiteit voor niet-respiratoir materiaal; alle monsters (ZN+ en ZN-), tenzij anders aangegeven

**ND = not determined

Tabel 6.3 Toegevoegde waarde van het analyseren van meerdere monsters met NAT op de aanwezigheid van *M. tuberculosis*.

Studie	Methode	Resultaat
Al Zahrani, 2001	COBAS Amplicor MTD (conventionele PCR), BACTEC 12B kweek	Cumulatieve positiviteit: kweek 1e 70% 2e 90% 3e 99% PCR 1e 89% 2e 95% 3e 99%
Nicol, 2011	GeneXpert MTD/ RIF, BACTEC MGIT kweek	ZN- monsters, toe name positiviteit na 1e monster: kweek +13,8% GeneXpert +27,8%
Boehme, 2010	GeneXpert MTD/RIF, BACTEC MGIT kweek	ZN-/kweek+ monsters, positief in GeneXpert: 1e monster 72,5% 2e monster +12,6% 3e monster +5,1%

Bijlage 1: Zoekcriteria literatuur voor respiratoir materiaal

#1 Pulmonary TB (*Tuberculosis*, MTB, TB)

"*Tuberculosis*, pulmonary"[Mesh] OR "*Tuberculosis*, pulmonary"[tiab] OR "anthracosilicotuberculosis"[tiab] OR "bronchial tuberculosis"[tiab] OR "bronchitis tuberculosa"[tiab] OR "lung tuberculosis"[tiab] OR (("Tuberculosis"[Mesh] OR "Mycobacterium tuberculosis"[Mesh] OR tubercul*[tiab] OR tb[tiab]) AND ("Lung"[Mesh] OR "Lung"[tiab] OR "bronchi"[tiab] OR "pulmonary"[tiab]))

#2 PCR (Polymerase chain reaction, PCR)

"Polymerase chain reaction"[Mesh] OR "Polymerase chain reaction"[tiab] OR "Polymerase chain reactions"[tiab] OR "PCR"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Techniques"[Mesh] OR "Nucleic Acid Amplification Techniques"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Technique"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Test"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Tests"[tiab]

#3 Time limit (2009-2014) (Entrez/Mesh/Publication Date)

("2009/01/01"[EDAT] : "2014/02/28"[EDAT]) AND ("2009/01/01"[MHDA] : "2012/02/28"[MHDA])) AND ("2009/01/01"[PDAT] : "2014/02/28"[PDAT])

Inclusiecriteria:

- studies waarin een NAT op klinisch materiaal wordt vergeleken met kweek
- respiratoir materiaal
- artikel in het Engels

Exclusiecriteria:

- studie in hoog-endemische gebieden (India, Afrika)
- NAT = conventionele PCR

Bijlage 2.: Zoekcriteria literatuur voor niet-respiratoir materiaal

#1 Extra-pulmonary TB (*Tuberculosis*, MTB, TB)

"*Tuberculosis*, extra-pulmonary"[Mesh] OR "*Tuberculosis*, extra-pulmonary"[tiab] OR ("*Tuberculosis*"[Mesh] OR "Mycobacterium tuberculosis"[Mesh] OR tubercul*[tiab] OR tb[tiab]) AND ("extra-pulmonary"[tiab]))

#2 PCR (Polymerase chain reaction, PCR)

"Polymerase chain reaction"[Mesh] OR "Polymerase chain reaction"[tiab] OR "Polymerase chain reactions"[tiab] OR "PCR"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Techniques"[Mesh] OR "Nucleic Acid Amplification Techniques"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Technique"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Test"[tiab] OR "Nucleic Acid Amplification Tests"[tiab]

#3 Time limit (2009-2014 (Entrez/Mesh/Publication Date))

("2009/01/01"[EDAT] : "2012/02/28"[EDAT]) AND ("2009/01/01"[MHDA] : "2014/02/28"[MHDA])) AND ("2009/01/01"[PDAT] : "2014/02/28"[PDAT])

Inclusiecriteria

- studies waarin een NAT op klinisch materiaal wordt vergeleken met kweek
- niet-respiratoir materiaal
- artikel in het Engels

Exclusiecriteria

- NAT = conventionele PCR

Voor de literatuur over specifieke materiaalsoorten, is er gezocht met de volgende zoektermen: meningitis, liquor, lymfadenitis, pleural, pleural fluid, abdominal, ascites, pericardial, pericardial fluid, pericarditis, biopt in combinatie met #1 en #2. In deze zoekopdrachten is er geen tijdlimiet (#3) meegenomen.

Inclusie criterium

- studies waarin het gebruik van een NAT voor de diagnostiek van verschillende vormen van extra-pulmonale tuberculose is onderzocht

Referenties

Akkerman OW, van der Werf TS, de Boer M, de Beer JL, Rahim Z, Rossen JW, et al. Comparison of 14 molecular assays for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Nov;51(11):3505-11.

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.

Al-Ateah SM, Al-Dowaidi MM, El-Khizzi NA. Evaluation of direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and non-respiratory clinical specimens using the Cepheid Gene Xpert(R) system. *Saudi medical journal*. 2012 Oct;33(10):1100-5.

Antonenka U, Hofmann-Thiel S, Turaev L, Esenalieva A, Abdulloeva M, Sahalchyk E, et al. Comparison of Xpert MTB/RIF with ProbeTec ET DTB and COBAS TaqMan MTB for direct detection of *M. tuberculosis complex* in respiratory specimens. *BMC infectious diseases*. 2013;13:280.

Armand S, Vanhuls P, Delcroix G, Courcol R, Lemaitre N. Comparison of the Xpert MTB/RIF test with an IS6110-TaqMan real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2011 May;49(5):1772-6.

Baba K, Pathak S, Sviland L, Langeland N, Hoosen AA, Asjo B, et al. Real-time quantitative PCR in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed paraffin-embedded pleural tissue in patients from a high HIV endemic area. *Diagn Mol Pathol*. 2008 Jun;17(2):112-7.

Bandyopadhyay D, Gupta S, Banerjee S, Gupta S, Ray D, Bhattacharya S, et al. Adenosine deaminase estimation and multiplex polymerase chain reaction in diagnosis of extra-pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2008 Oct;12(10):1203-8.

Bloemberg GV, Voit A, Ritter C, Deggim V, Bottger EC. Evaluation of Cobas TaqMan MTB for direct detection of the Mycobacterium tuberculosis complex in comparison with Cobas Amplicor MTB. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Jul;51(7):2112-7.

Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *The New England journal of medicine*. 2010 Sep 9;363(11):1005-15.

Referenties

Bowles EC, Freyee B, van Ingen J, Mulder B, Boeree MJ, van Soolingen D. Xpert MTB/RIF(R), a novel automated polymerase chain reaction-based tool for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2011 Jul;15(7):988-9.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry.* 2009 Apr;55(4):611-22.

Causse M, Ruiz P, Gutierrez-Aroca JB, Casal M. Comparison of two molecular methods for rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology.* 2011 Aug;49(8):3065-7.

Chaidir L, Ganiem AR, Vander Zanden A, Muhsinin S, Kusumaningrum T, Kusumadewi I, et al. Comparison of real time IS6110-PCR, microscopy, and culture for diagnosis of tuberculous meningitis in a cohort of adult patients in Indonesia. *PloS one.* 2012;7(12):e52001.

Chauhan DS, Sharma VD, Parashar D, Chauhan A, Singh D, Singh HB, et al. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis isolates from different parts of India based on IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. *The Indian journal of medical research.* 2007 Apr;125(4):577-81.

Chen X, Yang Q, Kong H, Chen Y. Real-time PCR and Amplified MTD(R) for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary specimens. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012 Feb;16(2):235-9.

Christopher DJ, Schumacher SG, Michael JS, Luo R, Balamugesh T, Durai-kannan P, et al. Performance of Xpert MTB/RIF on pleural tissue for the diagnosis of pleural tuberculosis. *The European respiratory journal.* 2013 Nov;42(5):1427-9.

Cortez MV, Oliveira CM, Monte RL, Araujo JR, Braga BB, Reis DZ, et al. HIV-associated tuberculous lymphadenitis: the importance of polymerase chain reaction (PCR) as a complementary tool for the diagnosis of tuberculosis - a study of 104 patients. *Anais brasileiros de dermatologia.* 2011 Sep-Oct;86(5):925-31.

Cui Z, Wang Y, Fang L, Zheng R, Huang X, Liu X, et al. Novel real-time simultaneous amplification and testing method to accurately and rapidly detect Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of clinical microbiology.* 2012 Mar;50(3):646-50.

Daley P, Thomas S, Pai M. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of tuberculous lymphadenitis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 Nov;11(11):1166-76.

Referenties

Das S, Chan SL, Allen BW, Mitchison DA, Lowrie DB. 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.* 1993 Feb;74(1):47-51.

Deggim V, Somoskovi A, Voit A, Bottger EC, Bloemberg GV. Integrating the Xpert MTB/RIF assay into a diagnostic workflow for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in a low-prevalence area. *Journal of clinical microbiology.* 2013 Jul;51(7):2396-9.

Derese Y, Hailu E, Assefa T, Bekele Y, Mihret A, Aseffa A, et al. Comparison of PCR with standard culture of fine needle aspiration samples in the diagnosis of tuberculosis lymphadenitis. *Journal of infection in developing countries.* 2012 Jan;6(1):53-7.

Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health technology assessment (Winchester, England).* 2007 Jan;11(3):1-196.

Dora JM, Geib G, Chakr R, Paris F, Mombach AB, Lutz L, et al. Polymerase chain reaction as a useful and simple tool for rapid diagnosis of tuberculous meningitis in a Brazilian tertiary care hospital. *Braz J Infect Dis.* 2008 Jun;12(3):245-7.

Drouillon V, Delogu G, Dettori G, Lagrange PH, Benecchi M, Houriez F, et al. Multicenter evaluation of a transcription-reverse transcription concerted assay for rapid detection of mycobacterium tuberculosis complex in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology.* 2009 Nov;47(11):3461-5.

Duarte EL, Paixao E, David S. Bridging the gap between PCR detection of Mycobacterium tuberculosis complex and tuberculosis diagnosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2012;16(3):391-3.

Friedrich SO, von Groote-Bidlingmaier F, Diacon AH. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pleural tuberculosis. *Journal of clinical microbiology.* 2011 Dec;49(12):4341-2.

Gao Y, Ou Q, Huang F, Wang S, Shen L, Shen Y, et al. Improved diagnostic power by combined interferon-gamma release assay and nested-PCR in tuberculous pleurisy in high tuberculosis prevalence area. *FEMS immunology and medical microbiology.* 2012 Dec;66(3):393-8.

Gill MK, Kukreja S, Chhabra N. Evaluation of nested polymerase chain reaction for rapid diagnosis of clinically suspected tuberculous pleurisy. *J Clin Diagn Res.* 2013 Nov;7(11):2456-8.

Referenties

Gomez DI, Mullin CS, Mora-Guzman F, Crespo-Solis JG, Fisher-Hoch SP, McCormick JB, et al. Rapid DNA extraction for specific detection and quantitation of Mycobacterium tuberculosis DNA in sputum specimens using Taqman assays. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*. 2011 Dec;91 Suppl 1:S43-8.

Gous N, Scott LE, Wong E, Omar T, Venter WD, Stevens W. Performance of the Roche LightCycler real-time PCR assay for diagnosing extrapulmonary tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 2012 Jun;50(6):2100-3.

Haldar S, Sankhyan N, Sharma N, Bansal A, Jain V, Gupta VK, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis GlcB or HspX Antigens or devR DNA impacts the rapid diagnosis of tuberculous meningitis in children. *PloS one*. 2012;7(9):e44630.

Halse TA, Edwards J, Cunningham PL, Wolfgang WJ, Dumas NB, Escuyer VE, et al. Combined real-time PCR and rpoB gene pyrosequencing for rapid identification of Mycobacterium tuberculosis and determination of rifampin resistance directly in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2010 Apr;48(4):1182-8.

Hanif SN, Eldeen HS, Ahmad S, Mokaddas E. GeneXpert(R) MTB/RIF for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and extra-pulmonary samples. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 Sep;15(9):1274-5.

Herrera EA, Segovia M. Evaluation of mtp40 genomic fragment amplification for specific detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*. 1996 May;34(5):1108-13.

Hillemann D, Rusch-Gerdes S, Boehme C, Richter E. Rapid molecular detection of extrapulmonary tuberculosis by the automated GeneXpert MTB/RIF system. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Apr;49(4):1202-5.

Hur M, Moon HW, Yun YM, Kang TY, Kim HS, Kim HS, et al. Detection of tuberculosis using artus M. tuberculosis PCR Kit and COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis Test. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 Jun;15(6):795-8.

Huyen M, Tiemersma E, Kremer K, de Haas P, Lan N, Buu T, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis isolates lacking IS6110 in Vietnam. *Submitted*. 2013.

Inoue M, Tang WY, Wee SY, Barkham T. Audit and improve! Evaluation of a real-time probe-based PCR assay with internal control for the direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Jan;30(1):131-5.

Referenties

Jiang LJ, Wu WJ, Wu H, Ryang SS, Zhou J, Wu W, et al. Rapid detection and monitoring therapeutic efficacy of Mycobacterium tuberculosis complex using a novel real-time assay. *Journal of microbiology and biotechnology*. 2012 Sep;22(9):1301-6.

Kalantri Y, Hemvani N, Chitnis DS. Evaluation of real-time polymerase chain reaction, interferon-gamma, adenosine deaminase, and immunoglobulin A for the efficient diagnosis of pleural tuberculosis. *Int J Infect Dis*. 2011 Apr;15(4):e226-31.

Kim JH, Kim YJ, Ki CS, Kim JY, Lee NY. Evaluation of Cobas TaqMan MTB PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Jan;49(1):173-6.

Kumar P, Sen MK, Chauhan DS, Katoch VM, Singh S, Prasad HK. Assessment of the N-PCR assay in diagnosis of pleural tuberculosis: detection of *M. tuberculosis* in pleural fluid and sputum collected in tandem. *PloS one*. 2010;5(4):e10220.

Kusum S, Aman S, Pallab R, Kumar SS, Manish M, Sudesh P, et al. Multiplex PCR for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Journal of neurology*. 2011 Oct;258(10):1781-7.

Kwak N, Choi SM, Lee J, Park YS, Lee CH, Lee SM, et al. Diagnostic accuracy and turnaround time of the Xpert MTB/RIF assay in routine clinical practice. *PloS one*. 2013;8(10):e77456.

Lee HY, Seong MW, Park SS, Hwang SS, Lee J, Park YS, et al. Diagnostic accuracy of Xpert(R) MTB/RIF on bronchoscopy specimens in patients with suspected pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2013 Jul;17(7):917-21.

Lee MR, Chung KP, Wang HC, Lin CB, Yu CJ, Lee JJ, et al. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *Journal of medical microbiology*. 2013 Aug;62(Pt 8):1160-4.

Leung ET, Zheng L, Wong RY, Chan EW, Au TK, Chan RC, et al. Rapid and simultaneous detection of Mycobacterium tuberculosis complex and Beijing/W genotype in sputum by an optimized DNA extraction protocol and a novel multiplex real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Jul;49(7):2509-15.

Lira LA, Santos FC, Carvalho MS, Montenegro RA, Lima JF, Schindler HC, et al. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect Mycobacterium tuberculosis in sputum samples of patients with pulmonary TB. *Journal of applied microbiology*. 2013 Apr;114(4):1103-8.

Referenties

Lira LA, Santos FC, Carvalho MS, Montenegro RA, Lima JF, Schindler HC, et al. Evaluation of a IS6110-Taqman real-time PCR assay to detect Mycobacterium tuberculosis in sputum samples of patients with pulmonary TB. *Journal of applied microbiology*. 2012 Apr;114(4):1103-8.

Liu KT, Su WJ, Perng RP. Clinical utility of polymerase chain reaction for diagnosis of smear-negative pleural tuberculosis. *J Chin Med Assoc*. 2007 Apr;70(4):148-51; discussion 6-7.

Malbruny B, Le Marrec G, Courageux K, Leclercq R, Cattoir V. Rapid and efficient detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and non-respiratory samples. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011 Apr;15(4):553-5.

Maurya AK, Kant S, Kushwaha RA, Nag VL, Kumar M, Dhole TN. The advantage of using IS6110-PCR vs. *BACTEC culture for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis from pleural fluid in northern India*. *Bioscience trends*. 2011 Aug;5(4):159-64.

Mehta PK, Raj A, Singh N, Khuller GK. Diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2012 Oct;66(1):20-36.

Miller MB, Popowitch EB, Backlund MG, Ager EP. Performance of Xpert MTB/RIF RUO assay and IS6110 real-time PCR for Mycobacterium tuberculosis detection in clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2010 Oct;49(10):3458-62.

Mittal P, Handa U, Mohan H, Gupta V. Comparative evaluation of fine needle aspiration cytology, culture, and PCR in diagnosis of tuberculous lymphadenitis. *Diagnostic cytopathology*. 2010 Nov;39(11):822-6.

MMWR. CDC Updated guidelines for the use of nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculosis. 2009 16 January 2009;58((01)):7-10.

Moure R, Martin R, Alcaide F. Effectiveness of an integrated real-time PCR method for detection of the Mycobacterium tuberculosis complex in smear-negative extrapulmonary samples in an area of low tuberculosis prevalence. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Feb;50(2):513-5.

Moure R, Munoz L, Torres M, Santin M, Martin R, Alcaide F. Rapid detection of Mycobacterium tuberculosis complex and rifampin resistance in smear-negative clinical samples by use of an integrated real-time PCR method. *Journal of clinical microbiology*. 2011b Mar;49(3):1137-9.

Referenties

Nagdev KJ, Kashyap RS, Parida MM, Kapgate RC, Purohit HJ, Taori GM, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and reliable diagnosis of tuberculous meningitis. *Journal of clinical microbiology*. 2011 May;49(5):1861-5.

Nhu NT, Heemskerk D, Thu do DA, Chau TT, Mai NT, Nghia HD, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculous meningitis. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Jan;52(1):226-33.

Nicol MP, Workman L, Isaacs W, Munro J, Black F, Eley B, et al. Accuracy of the Xpert MTB/RIF test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children admitted to hospital in Cape Town, South Africa: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases*. 2011 Nov;11(11):819-24.

Nopvichai C, Sanpavat A, Sawatdee R, Assanasen T, Wacharapluesadee S, Thorner PS, et al. PCR detection of Mycobacterium tuberculosis in necrotising non-granulomatous lymphadenitis using formalin-fixed paraffin-embedded tissue: a study in Thai patients. *Journal of clinical pathology*. 2009 Sep;62(9):812-5.

Opgesteld door: Werkgroep Moleculaire Diagnostiek van Infectieziekten (WMDI) NVvMMN. Concept richtlijn voor moleculaire diagnostiek van infectieziekten. 2013 25 January 2013;versie 4.

Pai M, Flores LL, Hubbard A, Riley LW, Colford JM, Jr. Nucleic acid amplification tests in the diagnosis of tuberculous pleuritis: a systematic review and meta-analysis. *BMC infectious diseases*. 2004 Feb 23;4:6.

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. *The Lancet infectious diseases*. 2003 Oct;3(10):633-43.

Papaventsis D, Ioannidis P, Karabela S, Nikolaou S, Syridou G, Marinou I, et al. Impact of the Gen-Probe Amplified MTD(R) Test on tuberculosis diagnosis in children. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2012;16(3):384-90.

Park KS, Kim JY, Lee JW, Hwang YY, Jeon K, Koh WJ, et al. Comparison of the Xpert MTB/RIF and Cobas TaqMan MTB assays for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2013 Oct;51(10):3225-7.

Patel VB, Theron G, Lenders L, Matinyena B, Connolly C, Singh R, et al. Diagnostic accuracy of quantitative PCR (Xpert MTB/RIF) for tuberculous meningitis in a high burden setting: a prospective study. *PLoS medicine*. 2013 Oct;10(10):e1001536.

Referenties

Porcel JM, Palma R, Valdes L, Bielsa S, San-Jose E, Esquerda A. Xpert(R) MTB/RIF in pleural fluid for the diagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2013 Sep;17(9):1217-9.

Rafi W, Venkataswamy MM, Nagarathna S, Satishchandra P, Chandramuki A. Role of IS6110 uniplex PCR in the diagnosis of tuberculous meningitis: experience at a tertiary neurocentre. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007 Feb;11(2):209-14.

Rafi W, Venkataswamy MM, Ravi V, Chandramuki A. Rapid diagnosis of tuberculous meningitis: a comparative evaluation of in-house PCR assays involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, MPB-64 and 65 kDa antigen. *Journal of the neurological sciences.* 2007b Jan 31;252(2):163-8.

Rosso F, Michelon CT, Sperhake RD, Verza M, Olival L, Conde MB, et al. Evaluation of real-time PCR of patient pleural effusion for diagnosis of tuberculosis. *BMC research notes.* 2011;4:279.

Sahadevan R, Narayanan S, Paramasivan CN, Prabhakar R, Narayanan PR. 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. *Journal of clinical microbiology.* 1995 Nov;33(11):3037-9.

Savelkoul PH, Catsburg A, Mulder S, Oostendorp L, Schirm J, Wilke H, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *Journal of microbiological methods.* 2006 Jul;66(1):177-80.

Seagar AL, Neish B, Laurenson IF. Comparison of two in-house real-time PCR assays with MTB Q-PCR Alert and GenoType MTBDRplus for the rapid detection of mycobacteria in clinical specimens. *Journal of medical microbiology.* 2012 Oct;61(Pt 10):1459-64.

Sharma K, Sharma A, Singh M, Ray P, Dandora R, Sharma SK, et al. Evaluation of polymerase chain reaction using protein b primers for rapid diagnosis of tuberculous meningitis. *Neurology India.* 2010 Sep-Oct;58(5):727-31.

Sharma M, Sethi S, Mishra AK, Chatterjee SS, Wanchu A, Nijhawan R. Efficacy of an in-house polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of Mycobacterium tuberculosis in patients with tubercular lymphadenitis: comparison with fine needle aspiration cytology and conventional techniques. *Indian journal of pathology & microbiology.* 2010 Oct-Dec;53(4):714-7.

Referenties

Simonnet C, Lacoste V, Drogoul AS, Rastogi N. Automated extraction and amplification for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in various clinical samples. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Apr;49(4):1700-1.

Sohn H, Aero AD, Menzies D, Behr M, Schwartzman K, Alvarez GG, et al. Xpert MTB/RIF Testing in a Low Tuberculosis Incidence, High-Resource Setting: Limitations in Accuracy and Clinical Impact. *Clin Infect Dis*. 2014 Apr;58(7):970-6.

Srivastava R, Kumar D, Waskar MN, Sharma M, Katoch VM, Srivastava BS. Identification of a repetitive sequence belonging to a PPE gene of Mycobacterium tuberculosis and its use in diagnosis of tuberculosis. *Journal of medical microbiology*. 2006 Aug;55(Pt 8):1071-7.

Takahashi T, Tamura M, Asami Y, Kitamura E, Saito K, Suzuki T, et al. Novel wide-range quantitative nested real-time PCR assay for Mycobacterium tuberculosis DNA: clinical application for diagnosis of tuberculous meningitis. *Journal of clinical microbiology*. 2008 May;46(5):1698-707.

Tanaka H, Hirose H, Kato Y, Kida S, Miyajima E. Clinical evaluation of TRCRapid M.TB for detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and non-respiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2010 May;48(5):1536-41.

Teo J, Jureen R, Chiang D, Chan D, Lin R. Comparison of two nucleic acid amplification assays, the Xpert MTB/RIF assay and the amplified Mycobacterium Tuberculosis Direct assay, for detection of Mycobacterium tuberculosis in respiratory and nonrespiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Oct;49(10):3659-62.

Thierry D, Chavarot P, Marchal G, Le Thi KT, Ho ML, Nguyen NL, et al. Mycobacterium tuberculosis strains unidentified using the IS6110 probe can be detected by oligonucleotides derived from the Mt308 sequence. *Research in microbiology*. 1995 May;146(4):325-8.

Tortoli E, Russo C, Piersimoni C, Mazzola E, Dal Monte P, Pascarella M, et al. Clinical validation of Xpert MTB/RIF for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis. *The European respiratory journal*. 2012 Aug;40(2):442-7.

Tortoli E, Urbano P, Marcelli F, Simonetti TM, Cirillo DM. Is real-time PCR better than conventional PCR for Mycobacterium tuberculosis complex detection in clinical samples? *Journal of clinical microbiology*. 2012b Aug;50(8):2810-3.

Totsch M, Bocker W, Brommelkamp E, Fille M, Kreczy A, Ofner D, et al. Diagnostic value of different PCR assays for the detection of mycobacterial DNA in granulomatous lymphadenopathy. *The Journal of pathology*. 1996 Feb;178(2):221-6.

Referenties

Vadwai V, Boehme C, Nabeta P, Shetty A, Alland D, Rodrigues C. Xpert MTB/RIF: a new pillar in diagnosis of extrapulmonary tuberculosis? *Journal of clinical microbiology*. 2011 Jul;49(7):2540-5.

van der Zanden AG, Hoentjen AH, Heilmann FG, Weltevreden EF, Schouls LM, van Embden JD. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations. *Mol Pathol*. 1998 Aug;51(4):209-14.

Verma P, Jain A, Patra SK, Gandhi S, Sherwal BL, Chaudhary M. Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) using hupB gene in diagnosis of tuberculous lymphadenitis in fine needle aspirates. *The Indian journal of tuberculosis*. 2010 Jul;57(3):128-33.

WHO. Automated Real-Time Nucleid Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert MTB/RIF System. *Geneva*; 2011.

WHO. Xpert MTB/RIF system for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. *Geneva*; 2013.

Yang YC, Lu PL, Huang SC, Jenh YS, Jou R, Chang TC. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Mar;49(3):797-801.

Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *Journal of clinical microbiology*. 1993 Jun;31(6):1615-8.

Zeka AN, Tasbakan S, Cavusoglu C. Evaluation of the GeneXpert MTB/RIF assay for rapid diagnosis of tuberculosis and detection of rifampin resistance in pulmonary and extrapulmonary specimens. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Dec;49(12):4138-41.

Hoofdstuk 7

MOLECULAIRE TYPERING

Moleculaire typering van *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Uitgangsvraag

Welke typeringsmethode is het meest geschikt om de moleculaire epidemiologie van tuberculose in Nederland te ondersteunen?

Inleiding

In het begin van de jaren negentig werden repeterende DNA sequenties in *M. tuberculosis* ontdekt, zoals insertie element *IS6110* en de directe repeats, die geassocieerd bleken te zijn met verschillende niveaus van DNA polymorfisme in het genoom van *M. tuberculosis*. Hierdoor werd het mogelijk de restrictie fragment lengte polymorfisme (RFLP) - en de spacer oligo (spoligo) typering te ontwikkelen ([van Soolingen, 2001](#)). Deze typeringen zijn de basis geworden van de moleculaire epidemiologie van tuberculose wereldwijd, zowel voor surveillance als voor onderzoeksdoeleinden.

Vanaf 1993 werd de RFLP techniek, met insertiesequentie *IS6110* als target, gebruikt om alle *M. tuberculosis* complex isolaten in Nederland te typeren. Dit werd gedaan om bronopsporings- en clusteronderzoek bij GGD'en te ondersteunen en leidde tot inzicht in de transmissie van tuberculose in ons land.

Omdat RFLP typering traag en technisch moeilijk uitvoerbaar is, werd in Nederland in 2009 de Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) typering geïntroduceerd. Dit is inmiddels de wereldwijde standaard voor typering van *M. tuberculosis* ([Supply, 2006](#)). In de VNTR typering worden 24 genomische sites met tandem repeats geamplificeerd in een multiplex PCR ([Supply, 2006](#)). Middels een DNA sequencer wordt de lengte van de PCR fragmenten vastgesteld waaruit het aantal tandem repeats, dat per locus aanwezig is, wordt afgeleid ([Supply, 2006](#)). Deze analyse resulteert in een code van 24 cijfers, die fungeert als een DNA fingerprint. Omdat de VNTR typering op PCR is gebaseerd, is weinig DNA nodig en is de gemiddelde doorlooptijd sterk verkort in vergelijking met de RFLP typering. Na binnenkomst bij het RIVM is na gemiddeld 11 dagen het VNTR patroon bekend. VNTR typering is tot op heden niet uitvoerbaar direct op patiëntenmateriaal, met uitzondering van materialen die een hoge load aan *M. tuberculosis* complex bacteriën bevatten.

In de laatste jaren wordt onderzoek gedaan naar de bruikbaarheid van Whole Genome Sequencing in de moleculaire epidemiologie van tuberculose ([Bryant, 2013](#); [Schurch, 2010](#)).

Zoekvragen

1. Wat is het discriminerend vermogen van de VNTR typeringsmethode?
2. Hoe reproduceerbaar is VNTR typering (inter- en intra-laboratorium)?
3. Wat is de stabiliteit van DNA fingerprints verkregen middels VNTR typering?

4. Wat is de (toekomstige) plaats van Whole Genome Sequencing in de moleculaire typering van *M. tuberculosis* complex isolaten?

Selectiecriteria literatuur

PubMed search dd. 10.06.2014. De volgende MesSH termen werden in combinatie gebruikt: "*Mycobacterium tuberculosis*" AND "Bacterial Typing Techniques"; Filters: Abstract available, Humans, English, tijdsperiode [1995-2013]. Vervolgens is er een selectie gemaakt van voor de zoekvraag relevante literatuur.

Samenvatting van literatuur

1. Wat is het discriminerend vermogen van de VNTR typeringsmethode?

Om de invoering van VNTR typering in 2009 mogelijk te maken, is de volledige collectie van *M. tuberculosis* isolaten van de jaren 2004-2008, die al onderworpen was aan RFLP typering, opnieuw getypeerd met VNTR typering. Hierdoor werd opnieuw een 'geheugen' aangelegd van circulerende stammen in Nederland die mogelijk bronnen voor transmissie zouden kunnen vormen in de tijd daarna. Tevens gaf dit de mogelijkheid om de RFLP- en VNTR typering uitgebreid met elkaar te vergelijken ([de Beer, 2013](#)). Uit de analyse bleek dat het discriminerende vermogen van beide technieken nagenoeg gelijk is; uit de 3978 typeerbare isolaten werden 2607 VNTR types geïdentificeerd, tegen 2733 RFLP types. Bij 79% van de 3978 geanalyseerde isolaten kwam de indeling in clusters overeen. In de analyse van de discrepanties bleek dat de clustering op grond van VNTR typering beter overeenkomt met de bevindingen van GGDen in het onderzoek naar epidemiologische verbanden tussen tuberculose gevallen, dan die op grond van RFLP typering.

Er zijn ook vergelijkende studies tussen RFLP en VNTR typering uitgevoerd in de Duitse bondsstaat Sleeswijk-Holstein ([Roetzer, 2011](#)), de regio Brussel ([Allix-Béguet, 2008](#)) en op nationaal niveau in Slovenië ([Bidovec-Stojkovic, 2011](#)), drie gebieden met een epidemiologie van tuberculose die lijkt op de Nederlandse situatie. De studie in Sleeswijk-Holstein typeerde 277 isolaten, vond 231 RFLP types en 220 VNTR types en toonde overeenkomst in typeringsresultaten tussen RFLP en VNTR in 93% van de stammen. Belangrijke discrepanties waren er vooral in Beijing genotype stammen, waarin de VNTR methode een duidelijk lager onderscheidend vermogen had dan RFLP. Dit leidde tot clusters waarin geen epidemiologische links konden worden aangetoond ([Roetzer, 2011](#)). In de regio Brussel werden 807 isolaten uit een 3 jaar durende studie gebruikt. Zowel VNTR and RFLP typering herkende 258 verschillende types, maar VNTR analyse resulteerde in meer unieke profielen en kleinere clusters (dus opsplitsen van RFLP clusters) ([Allix-Béguet, 2008](#)). In Slovenië tenslotte werden

196 isolaten uit het nationale surveillance systeem (vergelijkbaar met het Nederlandse) getypeerd. RFLP typering toonde 157 verschillende patronen, VNTR toonde 150 patronen, wederom met name door meer unieke profielen en kleinere clusters (dus opsplitsen van RFLP clusters). Beide technieken hadden een hele hoge Hunter Gaston Discriminatory Index, een maat voor het discriminerend vermogen, namelijk 0.9963 (RFLP) en 0.9962 (VNTR) ([Bidovec-Stojkovic, 2011](#)). Ook in de Nederlandse studie werd een dusdanig hoge HGDI gemeten voor beide methoden (Jessica de Beer, Jakko van Ingen, Dick van Soolingen; niet gepubliceerde data).

2. Hoe reproduceerbaar is VNTR typering (inter- en intra-laboratorium)?

In een project van het Europese Center for Infectious Disease Prevention and Control (ECDC) dat door het RIVM gecoördineerd wordt, is tweemaal een wereldwijde kwaliteitsronzending van de standaard 24-loci VNTR typering georganiseerd. In de eerste ronzzending, waaraan 37 internationale laboratoria deelnamen, bleek de intralaboratorium reproduceerbaarheid 72% en de interlaboratorium reproduceerbaarheid slechts 60% te bedragen ([de Beer, 2012](#)). Deelnemende laboratoria gebruikten zeer uiteenlopende technieken voor het vaststellen van de lengte van de PCR fragmenten waaruit het aantal tandem repeats wordt afgeleid. Met name de calibratie van de gebruikte methode bleek vaak onvoldoende en leverde veel systematische fouten op. Na het aanbrengen van talrijke verbeteringen in de techniek bij individuele laboratoria en het verder standaardiseren steeg de interlaboratorium reproduceerbaarheid in de tweede ronde van 62% (niet alle deelnemers uit de eerste ronde deden mee) naar 79% en de intralaboratorium reproduceerbaarheid van 72% naar 88% ([de Beer, 2014](#)). In beide studies was het gebruik van de commercieel beschikbare methode voor VNTR typering (Genoscreen, Lille, FR) geassocieerd met de hoogste intra- en interlaboratorium reproduceerbaarheid ([de Beer, 2012](#); [de Beer, 2014](#)).

3. Wat is de stabiliteit van DNA fingerprints verkregen middels VNTR typering?

Er is weinig onderzoek verricht naar de stabiliteit van VNTR patronen in vervolgisolaten van individuele tuberculosepatiënten. Voor de brede invoering van de 24-loci VNTR typering is de stabiliteit onderzocht van 12 loci-VNTR patronen (met 12 loci die nog steeds deel uitmaken van de 24 loci die momenteel worden gebruikt). Er werden 123 seriële isolaten onderzocht van 56 patiënten in Zuid Afrika. De intervallen in afnamedata van de kweken liepen uiteen van 8 tot 2185 dagen. Slechts bij 1 patiënt

was er een verandering in 1 van de 12 VNTR loci. Het ging hierbij om een kweek afgenomen 309 dagen na de initiële kweek ([Savine, 2002](#)).

In VNTR patronen worden soms dubbele allelen zichtbaar die kunnen duiden op gemengde *M. tuberculosis* infecties of evolutionaire drift. In Nederland wordt bij 3% van de geproduceerde VNTR patronen minstens één dubbel allel gedetecteerd ([de Beer, 2013](#)). Dit bemoeilijkt de interpretatie, maar hierover zijn afspraken gemaakt met de KNCV en GGDen die bij het RIVM zijn op te vragen.

Hiermee samenhangend dient de vraag zich dan ook aan of de definitie van clustering van isolaten van patiënten gebaseerd zou moeten zijn op identieke VNTR patronen, of dat er juist kleine afwijkingen getolereerd zouden moeten worden. Om deze vraag te onderzoeken is er recent een onderzoek uitgevoerd naar de populatiestructuur van *M. tuberculosis* in Nederland ([Sloot, 2013](#)). Hierbij is gebleken dat het grootste deel van de *M. tuberculosis* stammen op grond van de VNTR patronen zo sterk op elkaar lijkt dat ze in clonale complexen vallen. Als de definitie van clustering op grond van VNTR typering zou worden opgerekt naar stammen die bijna identieke patronen hebben en tot een clonaal complex behoren, dan zou het percentage clusterende isolaten dermate sterk omhoog gaan dat dit de bruikbaarheid van de DNA fingerprinting in Nederland zou ondermijnen. Er is daarom besloten om bij de definitie van clustering uit te blijven gaan van volledig identieke VNTR patronen.

4. Wat is de (toekomstige) plaats van "Whole Genome Sequencing" in de moleculaire epidemiologie van tuberculose?

Om de resolutie van typering van *M. tuberculosis* complex te verhogen worden sinds enkele jaren studies gedaan met Whole Genome Sequencing (WGS). Deze studies hebben aangetoond dat een klein aantal mutaties aanwezig is in het core genoom (genen die bij alle stammen van het species voorkomen) van isolaten met identieke RFLP en VNTR patronen. Deze kunnen gebruikt worden om afzonderlijke transmissieketens in RFLP/VNTR clusters van elkaar te onderscheiden ([Bryant, 2013](#); [Schurch, 2010](#)). In Nederland werden binnen het 'Harlingen' cluster, dat meer dan honderd isolaten bevat met identieke RFLP/VNTR patronen, met succes een aantal mutaties opgespoord waarmee de transmissie vanuit individuele gevallen kon worden vastgesteld ([Schurch, 2010](#)).

Dit riep de vraag op hoe regelmatig deze mutaties optreden in het genoom van *M. tuberculosis*. Daarom werden circa 200 *M. tuberculosis* isolaten uit Amsterdam, met al dan niet epidemiologisch bevestigde links en identieke RFLP of VNTR patronen en een bekend tijdsinterval, onderworpen aan WGS. Hierbij bleken de mutaties zeer onregelmatig op te treden in deze relatief korte tijd, en verschilde de mutatiefrequentie

per cluster ([Bryant, 2013](#)). Toch werd hieruit een gemiddelde mutatiefrequentie berekend van 0,36 mutaties per genoom per jaar. Dit is in overeenstemming met de uitkomsten van een soortgelijke studie in Engeland, waarbij een frequentie van 0,5 mutaties per genoom per jaar werd gevonden ([Walker, 2013](#)). Er zal dus rekening mee moeten worden gehouden dat het core genoom van *M. tuberculosis* zeer stabiel is en dat er stammen circuleren in Nederland die zelfs met WGS niet van elkaar te onderscheiden zijn, terwijl er geen directe epidemiologische link is tussen de respectievelijke tuberculose patiënten. Toch biedt WGS de hoogste resolutie in typering, en zodra het polymorfisme dat geassocieerd is met repeterende DNA sequenties ook in deze methode zichtbaar gemaakt kan worden lijkt dit de meest ideale typering-methode te worden. Met deze techniek kunnen dan identificaties op (sub) species niveau worden uitgevoerd, maar ook indicatieve gevoeligheidsbepalingen en typering op stamniveau. Om dit mogelijk te maken dient de analyse van WGS data sterk te worden verbeterd en versneld. Daarnaast dient deze techniek idealiter toepasbaar te zijn op kleinere aantallen bacteriën, liefst in klinisch materiaal.

Conclusies	
Niveau 1	De huidige wereldwijde standaard in typering van het <i>M. tuberculosis</i> complex is 24-loci VNTR typering.
Niveau 2	Het discriminerend vermogen van de VNTR typering is iets lager dan de <i>IS6110</i> RFLP typering, maar de resultaten van de VNTR typering lijken beter te passen bij de transmissieroutes zoals die bij bronopsporings- en clusteronderzoek worden gevonden.
Niveau 2	De reproduceerbaarheid van VNTR typering is sterk afhankelijk van de wijze van uitvoering en is een punt van zorg.
Niveau 4	Whole Genome Sequencing is veelbelovend maar nog niet gereed voor gebruik als moleculaire typering van <i>M. tuberculosis</i> complex in nationale surveillance programma's.

Aanbevelingen	
Gezien het belang van de nationale surveillance van tbc voor het inperken van transmissie wordt aanbevolen om alle positieve <i>M. tuberculosis</i> complex kweken door het RIVM te laten typeren.	
Op basis van nu beschikbare gegevens wordt aanbevolen om voor de nationale surveillance vast te houden aan de nu gebruikte VNTR typering	

Om bronopsporings- en clusteronderzoek zo efficiënt mogelijk te laten verlopen wordt aanbevolen om *M. tuberculosis* complex isolaten zo snel mogelijk op te sturen voor typering.

Parallel hieraan dient geïnvesteerd te worden in het gebruik van WGS als typeringstechniek. Hiervoor is het noodzakelijk dat er een (gecureerde) internationale database komt met daarin sequenties van *M. tuberculosis* complex stammen wereldwijd.

Praktische handreikingen

- Na binnenkomst bij het RIVM is na gemiddeld 11 dagen het VNTR patroon bekend.
- De VNTR typering wordt kosteloos uitgevoerd door het RIVM.
- VNTR typering is tot op heden niet uitvoerbaar direct op patiëntenmateriaal met uitzondering van microscopisch sterk positieven (minstens 10 zuurvaste staafjes per gezichtsveld).
- Een cluster wordt gedefinieerd als 2 of meer volledig identieke 24-loci VNTR patronen van verschillende patiënten.
- Clustering van individuele isolaten (mogelijke transmissie) wordt via de verpleegkundig consulent surveillance, die als interface dient tussen het RIVM en de GGD'en, aan de betreffende GGD'en gerapporteerd.
- Wanneer bij meerdere kweken van een laboratorium, met een afnamedatum die niet meer dan een week verschilt, identieke DNA fingerprints door het RIVM worden opgemerkt is er mogelijk sprake van een laboratorium kruis-contaminatie. Bij verdenking hierop worden zowel het microbiologische laboratorium als de betrokken GGD door het RIVM op de hoogte gesteld.

Referenties

Allix-Béguet C, Fauville-Dufaux M, Supply P. Three-year population-based evaluation of standardized mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2008; 46:1398-406.

Bidovec-Stojkovic U, Zolnir-Dovc M, Supply P. One year nationwide evaluation of 24-locus MIRU-VNTR genotyping on Slovenian Mycobacterium tuberculosis isolates. *Respir Med* 2011; 105 Suppl 1:S67-73.

Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, Kremer K, van Hijum SA, Siezen RJ, Borgdorff M, Bentley SD, Parkhill J, van Soolingen D. Inferring patient to patient transmission of Mycobacterium tuberculosis from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 2013; 13:110.

de Beer JL, Ködmön C, van Ingen J, Supply P, van Soolingen D; Global Network for Molecular Surveillance of Tuberculosis 2010. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of Mycobacterium tuberculosis complex. *Int J Tuberc Lung Dis* 2014; 18:594-600.

de Beer JL, Kremer K, Ködmön C, Supply P, van Soolingen D; Global Network for the Molecular Surveillance of Tuberculosis 2009. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains. *J Clin Microbiol* 2012; 50:662-9.

De Beer JL, van Ingen J, de Vries G, Erkens C, Sebek M, Mulder A, Sloot R, van den Brandt A-M, Enaimi M, Kremer K, Supply P, van Soolingen D. Comparative study of IS6110 restriction fragment length polymorphism and variable-number tandem-repeat typing of Mycobacterium tuberculosis isolates in the Netherlands, based on a 5-year nationwide survey. *J. Clin. Microbiol* 2013; 51:1193-1198.

Roetzer A, Schuback S, Diel R, Gasau F, Ubben T, di Nauta A, Richter E, Rüsck-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Mycobacterium tuberculosis typing methods in a 4-year study in Schleswig-Holstein, Northern Germany. *J Clin Microbiol* 2011; 49:4173-8.

Savine E, Warren RM, van der Spuy GD, Beyers N, van Helden PD, Locht C, Supply P. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2002; 40:4561-6.

Schurch AC, Kremer K, Daviana O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, van Soolingen D. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol* 2010; 48:3403-6.

Referenties

Sloot R, Borgdorff MW, de Beer JL, van Ingen J, Supply P, van Soolingen D. Clustering of tuberculosis cases based on Variable-Number Tandem-Repeat typing in relation to the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2013; 51:2427–31.

Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, Savine E, de Haas P, van Deutekom H, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, van Soolingen D. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006; 44:4498–510.

van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001; 249:1–26.

Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, Eyre DW, Wilson DJ, Hawkey PM, Crook DW, Parkhill J, Harris D, Walker AS, Bowden R, Monk P, Smith EG, Peto TE. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis* 2013; 13:137–46.

Hoofdstuk 8

RESISTENTIE

Resistentieonderzoek van mycobacteriën

Uitgangsvragen

1. Wat is de optimale fenotypische methode om de gevoeligheid van *Mycobacterium tuberculosis* voor antibiotica op betrouwbare wijze vast te stellen?
2. Hoe presteren beschikbare methoden voor moleculaire detectie van resistentie in gebieden met lage TB incidentie en lage resistentiepercentages?
3. In welke klinische setting is het raadzaam om moleculaire detectie van resistentie uit te laten voeren?
4. Wat is de optimale fenotypische methode om de gevoeligheid van nontuberculeuze mycobacteriën voor antibiotica op betrouwbare wijze vast te stellen?

Inleiding

Gevoeligsbepalingen voor *M. tuberculosis* complex bacteriën zijn zinvol, omdat in vitro resistentie voor veel gangbare tuberculostatika direct gecorreleerd is aan falen van therapie in vivo ([WHO, 2014b](#)). Deze relatie is vooral sterk voor rifampicine, maar ook voor isoniazide. Resistentieonderzoek is dus van groot belang voor de therapiebegeleiding, maar ook voor (inter)nationale surveillance. Er is veel discussie over de te hanteren breekpunten in de gevoeligsbepalingen van *M. tuberculosis* complex bacteriën ([Schön, 2009](#); [Gumbo, 2010](#)).

Naast de fenotypische gevoeligsbepalingen, zijn er moleculaire testen om mutaties aan te tonen die gerelateerd zijn aan resistentie tegen de belangrijkste eerstelijnsmiddelen isoniazide en rifampicine. Er is ook een commercieel beschikbare reverse line blot methode voor tweedelijnsmiddelen (fluoroquinolonen, aminoglycosiden/injectables) en ethambutol. De voorspellende waarde van deze testen verschilt per antibioticum en per genetisch target dat bekeken wordt. In Nederland is dermate veel ervaring opgedaan met deze sneldiagnostiek dat deze voorspellende waarden goed bekend zijn. Deze testen zijn met name waardevol in de sneldiagnostiek van multidrug resistente tuberculose (MDR-TB). Alleen de reverse line blot methode voor eerstelijnsmiddelen INH en rifampicine en de GeneXpert (detectie van rifampicine resistentie) worden door de WHO aanbevolen ([WHO, 2014b](#)).

Voor nontuberculeuze mycobacteriën (NTM) worden van oudsher technieken gebruikt afkomstig uit de algemene bacteriologie. Bij de NTM is de rol van de resistentiebepaling minder duidelijk, omdat er voor met name de eerstelijns antituberculose middelen geen duidelijke relatie tussen in vitro gevoeligheid en in vivo uitkomst van therapie lijkt te bestaan. Deze relatie is wel duidelijk voor veelgebruikte middelen zoals macroliden, aminoglycosiden, fluoroquinolonen en co-trimoxazol ([van Ingen, 2012](#)). Vooral voor het resistentieonderzoek dat gebruikt wordt voor directe therapiebegeleiding van patiënten, is kwaliteitsborging van het grootste belang.

Zoekvragen

1. Hoe presteren huidige breekpuntsbepalingen in vloeibare media voor fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor *M. tuberculosis* complex bacteriën ten opzichte van klassieke agar proportie en radiometrische BacTec460 methoden?
2. Hoe presteren huidige breekpuntsbepalingen in vloeibare media voor detectie van pyrazinamide resistentie bij *M. tuberculosis* complex bacteriën ten opzichte van deze klassieke methoden?
3. Hoe presteren moleculaire testen voor detectie van resistentie tegen isoniazide en rifampicine of fluoroquinolonen, aminoglycosiden/injectables en ethambutol in de Nederlandse setting?
4. Wat is de optimale methode voor fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor nontuberculeuze mycobacteriën?

Selectiecriteria literatuur

PubMed search dd. 12.06.2014: ("*Mycobacterium*" and "Drug Resistance, Bacterial")
Filters: Abstract available, Humans, English, tijdsperiode [1995-2013]. Vervolgens is er een selectie gemaakt van voor de zoekvraag relevante literatuur.

Literatuur per zoekvraag

Samenvatting van literatuur

1. Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor *M. tuberculosis*.

In 1963 verschijnt het eerste consensus document over methoden voor fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor *M. tuberculosis* ([Canetti, 1963](#)). Alle drie (Resistance Ratio, agar dilutie en proportie) beschreven methoden zijn gebaseerd op detectie en quantificering van groei van stammen op Löwenstein-Jensen (LJ) media gesuppleerd met oplopende concentraties van de dan gebruikte eerstelijnsmiddelen (PAS, INH, streptomycine). Enkele jaren later wordt het Middlebrook 7H10 medium ingevoerd voor dit type bepalingen, omdat *M. tuberculosis* daarop iets sneller groeit. Weer een decennium later worden de eerste semi-automatische vloeibare kweeksystemen ontworpen ([Middlebrook, 1977](#)). Hierin worden ook al snel gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd door groei in gesuppleerde vloeibare media te quantificeren en te vergelijken met groei van een verdund inoculum in medium zonder antibiotica (vloeibare proportie methode). Deze methodiek is inmiddels beschikbaar in de vorm van drie commerciële systemen (MB/BacT [BioMerieux], *Mycobacterium* Growth Indicator Tube [MGIT; Becton and Dickinson], VersaTrek [Trek Diagnostics]). Voor alle

drie deze methoden zijn assays voor breekpuntsbepalingen beschikbaar; in principe wordt voor ieder antibioticum alleen de breekpuntconcentratie getest, waarbij groei dus wordt geïnterpreteerd als resistentie. In verschillende studies zijn de meestgebruikte methoden vergeleken met de gouden standaard, de proportie methode op vaste media (LJ of Middlebrook 7H10/7H11). Over de MGIT en MB/BacT methoden bestaat de meeste literatuur. De resultaten van deze studies zijn beschreven in [Tabel 8.1](#) (Palaci, 1996; Bergmann, 1997; Bergmann, 1997b; Palomino, 1999; Kontos, 2004; Díaz-Infantes, 2000; Yew, 2001). Alle studies tonen dat de methoden in geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen veel sneller zijn. Een resultaat is na gemiddeld 8 dagen beschikbaar, versus 14-21 dagen voor de proportie methoden op vaste media. De radiometrische BacTec460 methode (Becton and Dickinson) is

Tabel 8.1 Overeenkomst resultaten MGIT en proportie methode op vaste media

Studie	Methode	Aantal isolaten	Streptomycine		Isoniazide		Rifampicine		Ethambutol	
			S	R	S	R	S	R	S	R
Palaci 1996	MGIT	25	23/23	2/2	19/19	6/6	20/20	5/5	22/22	3/3
Bergmann 1997	MGIT	89	ND	ND	74/74	13/15	70/70	19/19	ND	ND
Bergmann 1997	MGIT	74	55/60	14/14	ND	ND	ND	ND	58/63	9/11
Palomino 1999	MGIT	101	57/62	35/39	38/38	63/63	64/64	35/37	75/75	25/26
Kontos 2004	MGIT	177	149/151	26/26	145/147	30/30	163/164	13/13	161/165	12/12
Totaal MGIT		466	284/296	77/81	276/278	112/114	317/318	72/74	316/325	49/52
Diaz 2000	MB/BacT	83	65/66	15/17	57/57	26/26	63/63	20/20	66/71	9/12
Yew 2001	MB/BacT	105	49/49	55/56	50/55	50/50	81/81	24/24	ND	ND
Totaal MB/BacT		188	114/115	70/73	107/112	76/76	144/144	44/44	66/71	9/12

internationaal ook veel gebruikt voor gevoeligheidsbepalingen van *M. tuberculosis* complex; deze methode heeft in Nederland nooit veel ingang gevonden. Ook deze methode is als gouden standaard gebruikt in studies naar de prestaties van niet-radiometrische vloeibare kweeksystemen zoals MGIT en MB/BacT ([Rüsch-Gerdes, 1999](#); [Ardito, 2001](#); [Tortoli, 2002](#); [Scarpato, 2004](#); [Garrigó, 2007](#); [Tortoli, 2000](#); [Brunello, 2000](#); [Bemer, 2004](#)). De prestaties van de MGIT en MB/BacT methode ten opzichte van BacTec460 staan vermeld in [Tabel 8.2](#).

Tabel 8.2 Overeenkomst resultaten MGIT en MB/BacT en BacTec460 radiometrische methode

Studie	Methode	Aantal isolaten	Streptomycine		Isoniazide		Rifampicine		Ethambutol	
			S	R	S	R	S	R	S	R
Rüsch-Gerdes, 1999	MGIT	441	328/330	109/111	315/315	123/126	347/347	90/94	254/256*	52/56*
Ardito, 2001	MGIT	78	77/78	0/0	73/75	3/3	78/78	0/0	64/67	11/11
Tortoli, 2002	MGIT	133	120/122	11/11	111/114	19/19	124/125	7/7	124/127	4/6
Scarpato, 2004	MGIT	100	61/63	32/37	51/54	46/46	70/70	29/30	78/78	19/22
Garrigó, 2007	MGIT	82	61/64	17/18	34/34	45/48	67/68	14/14	70/70	11/12
Totaal MGIT		834	647/657	169/177	584/592	236/242	686/688	140/145	590/598	97/107
Tortoli, 2000	MB/BacT	113	95/98	14/15	86/86	26/27	95/96	17/17	94/97	14/16
Brunello, 2000	MB/BacT	120	115/115	5/5	103/103	15/17	116/116	4/4	109/114	6/6
Bemer, 2004	MB/BacT	166	139/141	24/25	130/130	35/36	148/148	18/18	151/151	12/15
Garrigó, 2007	MB/BacT	82	64/64	12/18	32/34	47/48	67/68	14/14	70/70	9/12
Totaal MB/BacT		481	413/418	55/63	351/353	123/128	426/428	53/53	424/432	41/49

*maar 312/441 stammen onderworpen aan ethambutol test

Deze resultaten in ogenschouw nemende kan voor de MGIT een categorische (S/R) concordantie ($=100 \times \frac{[\text{correct S} + \text{correct R}]}{[\text{totaal S} + \text{totaal R}]}$) van 95.8% voor streptomycine, 99.0% voor isoniazide, 99.2% voor rifampicine en 96.8% voor ethambutol worden berekend ten opzichte van de proportie methode op vaste media en 97.8% voor streptomycine, 98.3% voor isoniazide, 99.2% voor rifampicine en 97.4% voor ethambutol ten opzichte van de radiometrische BacTec460 methode.

Voor de MB/BacT berekenden wij een categorische concordantie van 97.9% voor streptomycine, 97.3% voor isoniazide, 100% voor rifampicine en 90.4% voor ethambutol ten opzichte van de proportiemethode en 97.3% voor streptomycine, 98.5% voor isoniazide, 99.6% voor rifampicine en 96.7% voor ethambutol ten opzichte van de radiometrische BacTec460 methode.

De discrepanties tussen verschillende technieken vinden –ten dele– hun oorsprong in de vastgestelde breekpunten voor *M. tuberculosis*. [Tabel 8.3](#) geeft een overzicht van de breekpunten voor de MGIT methode voor eerste en tweedelijnsmiddelen die op dit moment (december 2014) door de WHO worden ondersteund en in Nederland worden gehanteerd. Van oudsher zijn enkelvoudige breekpunten vastgesteld, voor onderscheid tussen gevoelig en resistent. Veel van deze breekpunten zijn gebaseerd op wild type MIC verdelingen uit de periode voor de opkomst van resistentie bij *M. tuberculosis*. Dit concept is voor vele middelen inmiddels achterhaald, omdat voor vele middelen geldt dat de verschillende mutaties in de verschillende aangrijppunten van de middelen ieder leiden tot specifieke MIC verdelingen, waarvan sommigen het breekpunt doorkruisen. Voor vele middelen (isoniazide, ethambutol, streptomycine, prothionamide, maar ook rifampicine) geldt dus dat er ook 'intermediaire gevoeligheid' kan bestaan in een kleine minderheid van stammen. Deze intermediaire gevoeligheid wordt niet herkend als alleen een breekpuntsbepaling zoals de commerciële systemen met vloeibare kweek wordt verricht. Voor isoniazide is een uitbreiding beschikbaar waarin twee concentraties worden getest ([Tabel 8.3](#)) ([Böttger, 2011](#)).

Veel van de breekpunten staan momenteel ter discussie door deze nieuwe inzichten in resistentie mechanismen, maar ook in de wild type MIC distributies, klinische uitkomsten, farmacokinetiek, en farmacodynamiek ([Schön, 2009](#); [Gumbo, 2010](#); [Böttger, 2011](#)). Deze matige kwaliteit van huidige breekpunten is ook de achtergrond van de sporadisch waargenomen discrepanties tussen mutatie-analyse van het drug target en de resultaten van de fenotypische gevoeligheidsbepaling (zie onder). Om deze beperking te ondervangen kan er ook een bepaling worden uitgevoerd met een beperkte concentratiereeks per antibioticum, waarmee een meer kwantitatieve gevoeligheidsbepaling kan worden uitgevoerd. Voor het MGIT systeem is speciale software (TBeXist®) ontwikkeld om deze kwantitatieve bepaling te kunnen automatiseren ([Springer, 2009](#)).

Tabel 8.3 Overzicht van breekpuntconcentraties (mg/L) voor eerste en tweede-lijns antituberculose middelen zoals gebruikt in de MGIT bepaling

Antibioticum	Breekpuntconcentratie
Isoniazide	0.1 / 0.4*
Rifampicine	1.0
Rifabutin	0.5
Ethambutol	5.0
Pyrazinamide	100
Streptomycine	1.0
Amikacine	1.0
Kanamycine	2.5
p-aminosalicylzuur	4.0
Moxifloxacin	0.5
Capreomycine	2.5
Prothionamide	2.5 / 5.0
Linezolid	1.0
Clofazimine	1.0

* Isoniazide; =< 0.1mg/l is gevoelig, 0.1-0.4 mg/l is intermediair, >0.4 is resistent

2. Pyrazinamide

Het bepalen van de gevoeligheid van *M. tuberculosis* complex isolaten voor pyrazinamide is zeer foutgevoelig. Het inactieve pyrazinamide wordt alleen bij een lage pH omgezet in het actieve pyrazinoëzuur. De fenotypische gevoeligheidsbepaling dient dus te worden uitgevoerd in aangezuurde media (pH 5,9-6,0). Deze lage pH remt echter ook de groei van *M. tuberculosis* complex bacteriën. Daarnaast hebben de hiervoor gebruikte media een beperkte buffercapaciteit, dus verzuring van het medium door actief metaboliserende bacteriën kan leiden tot verdere groeiremming ([Pfyffer, 2002](#)). Ook voor pyrazinamide is een breekpuntsbepaling beschikbaar voor de geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen. Alleen de breekpuntsbepaling voor de MGIT is in een serie studies vergeleken met de door de WHO destijds gepropageerde

BacTec460 en resistentie ratio methode of vaste media ([Pfyffer, 2002](#); [Kontos, 2003](#); [Johansen, 2004](#); [Krüüner, 2006](#)). De resultaten daarvan zijn opgenomen in [Table 8.4](#).

Table 8.4 Pyrazinamide gevoeligheidsbepaling; MGIT vs BacTec460 of Resistance Ratio methode

Studie	Methode	Aantal stammen	BacTec460		Resistance op vast medium		Ratio Methode op vast medium	
			S	R	S	R	S	R
Pfyffer, 2002	MGIT	116	89/92	23/24	-	-	-	-
Kontos, 2003	MGIT	150	144/144	6/6	-	-	-	-
Scarparo, 2004	MGIT	100	66/69	27/31	-	-	-	-
Johansen, 2004	MGIT	57	46/46	11/11	-	-	-	-
Krüüner, 2006	MGIT	195	-	-	158/161	26/34	-	-

Deze resultaten in ogenschouw nemende, kan voor de MGIT een categorische (S/R) concordantie ($=100 \times \frac{[\text{correct S} + \text{correct R}]}{[\text{totaal S} + \text{totaal R}]}$) van 94.4% voor pyrazinamide worden berekend ten opzichte van de Resistance Ratio methode op vaste media, en 97.4% ten opzichte van de radiometrische BacTec460 methode.

Onze meta-analyse laat zien dat de MGIT960 pyrazinamide bepaling redelijk accuraat is. Geobserveerde problemen zijn vooral het aantal fout-resistenten (major errors) en minder het aantal fout-gevoeligen (very major errors) ([Chedore, 2010](#); [Simons, 2012](#)). Bij het detecteren van pyrazinamide resistentie door middel van de MGIT bepaling is het dus raadzaam een tweede test ter confirmatie uit te voeren.

Vier testen zijn hiervoor bestudeerd:

1. confirmeren door middel van BacTec460 bepaling (inmiddels niet meer mogelijk)
2. herhalen van de MGIT bepaling zonder aanpassingen
3. uitvoeren van pncA gen sequentie analyse
4. herhalen van de MGIT bepaling met een gereduceerd inoculum

Een studie in Canada vond 57 PZA resistente stammen in een serie van 743 klinische isolaten (7.7%). Alle door de MGIT960 als resistent afgegeven stammen werden opnieuw getest met BacTec460. Deze bevestigde 33 isolaten (4.4%) als resistent, maar testte er 24 gevoelig (3.2%) ([Chedore, 2010](#)).

In een studie in Nederland werden 1650 *M. tuberculosis* isolaten gescreend op PZA gevoeligheid door middel van MGIT960. Hiervan werden 69 isolaten initieel resistent bevonden (4.2%), maar bij herhalen van de MGIT960 bepaling waren er nog slechts 22 resistent (68% fout-resistent gemeten). In deze studie werd pncA sequencing als alternatieve strategie getest bij initieel PZA resistent geteste isolaten. Bij 16 van de 22 resistente isolaten werd een niet-synonieme mutatie in het pncA gen aangetoond (sensitiviteit 73%, specificiteit 100%) ([Simons, 2012](#)); in een van de resistente stammen met een wild type pncA sequentie kon later een mutatie in het rpsA gen worden aangetoond ([Simons, 2013](#)).

In 1 studie werd de MGIT herhaald met een gereduceerd inoculum (0.25ml ipv 0.5 ml van een 24-48u oude positief gevlagde MGIT buis). Van de 211 stammen (waaronder 10 *M. bovis* stammen) werden er 55 pyrazinamide resistent bevonden met de standaard MGIT bepaling. Bij het inzetten met een verdund inoculum waren er nog maar 23 resistent, waaronder de *M. bovis* stammen. Deze 23 konden allemaal geverifieerd worden met de BacTec460 pyrazinamide gevoeligheidsbepaling ([Piersimoni, 2013](#)).

Een deel van discrepanties tussen methoden wordt veroorzaakt door stammen met MICs op of rond het breekpunt. Recent is door middel van simulaties op basis van trial data en hollow fiber model simulaties voorgesteld om het breekpunt in de MGIT960 te verlagen naar 50 mg/L ([Gumbo, 2014](#)).

Vanwege deze complexiteit van de fenotypische bepalingen is er gezocht naar andersoortige bepalingen. Een van de klassieke methoden is bepaling van pyrazinamidase (het aangrijppunt van pyrazinamide) activiteit volgens de methode van Wayne. Hierbij wordt een hoog inoculum *M. tuberculosis* 4 dagen geïncubeerd op pyrazinamide en pyruvaat houdende media, waarna het door pyrazinamidase geproduceerde pyrazinoëzuur zichtbaar wordt gemaakt met ijzer-ammoniumsulfaat. Vorming van een bruine neerslag bewijst aanwezigheid van inactief pyrazinamidase, een defect

hetgeen suggestief is voor pyrazinamide resistentie ([Wayne, 1974](#)). Recent is er veel onderzoek verricht naar moleculaire methoden, zoals het aantonen van mutaties in het *pncA* gen, dat codeert voor het pyrazinamidase enzym en het *rpsA* gen, dat codeert voor het S1 ribosomaal eiwit ([Simons, 2012](#); [Simons, 2013](#)).

Twee studies hebben de pyrazinamidase test volgens Wayne vergeleken met de MGIT PZA test, waarbij de laatste gold als gouden standaard. In de 2 studies gezamenlijk werden 533 isolaten getest. De pyrazinamidase test benoemde 205/226 isolaten correct gevoelig en 297/307 isolaten correct resistent, leidend tot een categorische concordantie van 94.2% ([Aono, 2002](#); [Cui, 2013](#)). Het sequencen van het *pncA* gen als screening voor PZA resistentie is ook bestudeerd. In een Nederlandse studie werden 166 *M. tuberculosis* isolaten (waarvan 7 resistent volgens MGIT960) getest. Sequencen van het *pncA* gen toonde niet-synonieme mutaties in 6/7 resistente stammen en 4/159 gevoelige stammen, en had dus een sensitiviteit van 86%, specificiteit van 98% en categorische concordantie van 97% ([Simons, 2012](#)). Op basis van de prestaties van de pyrazinamidase en moleculaire methoden concludeert een recente meta-analyse dat de moleculaire methode (*pncA* sequencing) waarschijnlijk de te prefereren methoden is, omdat de prestaties van de pyrazinamidase test in studies waarschijnlijk overschat is ([Chang, 2011](#)). De correlaties tussen verschillende genetische mutaties, in vitro MICs en uitkomsten van behandeling zijn nog onvoldoende bestudeerd om dit nu al routinematig te kunnen invoeren ([Simons, 2012](#); [Chang, 2011](#)). Wel is de verwachting dat whole genome sequencing zal leiden tot een snellere en betere vaststelling van (genetische) resistentie dan de fenotypische bepalingen.

Tweedelijnsmiddelen

Het bepalen van gevoeligheid voor tweedelijnsmiddelen wordt door zeer weinig laboratoria wereldwijd aangeboden. Deze bepalingen zijn vooral relevant voor multidrug-resistente *M. tuberculosis* complex isolaten. Ook hier hebben de geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen (m.n. MGIT960) hun intrede gedaan. In een vergelijkende studie in Nederland bleek deze methode goed te werken en bleken de resultaten zeer goed overeen te komen met de resultaten van de gouden standaard op dat moment, de absolute concentratie methode op Middlebrook 7H10 medium ([van Ingen, 2010](#)). Niet alle tweedelijnsmiddelen kunnen in alle media worden getest. Cycloserine bijvoorbeeld wordt geïnactiveerd in pyruvaat houdende media (zoals het MGIT medium) ([Tison, 1963](#)). Voor deze middelen blijft de absolute concentratiemethode in Middlebrook 7H10 medium dus noodzakelijk; het RIVM voert deze bepalingen routinematig uit. Het is van belang te onderkennen dat de relatie tussen in vitro MICs en in vivo uitkomsten van therapie voor de klassieke tweedelijnsmiddelen (clofazimine, prothionamide, cycloserine, PAS) niet in klinische studies is onderzocht. Voor de nieuwe tuberculostatika bedaquiline en delamanid is nog geen gestandaardiseerde methode voor resistentie bepaling aanwezig.

Kwaliteitscontrole

Voor kwaliteitscontrole is het raadzaam om regelmatig controlestammen mee te testen. Hierover zijn geen strikte richtlijnen geformuleerd. Via de American Type Culture Collection zijn *M. tuberculosis* stammen beschikbaar met monoresistentie tegen streptomycine (ATCC 35820), isoniazide (ATCC 35822), rifampicine (ATCC 35838) en ethambutol (ATCC 35837).

Voor pyrazinamide kan een *M. bovis* stam worden gebruikt of *M. tuberculosis* ATCC 35828. De tpeestam *M. tuberculosis* H37Rv is gevoelig voor alle eerstelijnsmiddelen en kan dus als controle worden gebruikt. Nontuberculeuze mycobacteriën (NTM) zijn ongeschikt voor kwaliteitscontrole. Door grote verschillen in groeisnelheid ten opzichte van *M. tuberculosis* dienen ze sterk verdund te worden ingezet. Dit proces is onvoldoende gestandaardiseerd.

Ook tweedelijnscontroles in de vorm van een geblindeerde uitwisseling van kweken met een bepaald resistentieprofiel zijn voor het testen van de lokale inter-laboratorium reproduceerbaarheid van belang.

Voor de derdelijns kwaliteitsborging van gevoeligheidsbepalingen kunnen WHO supra-nationale laboratoria deelnemen aan het de WHO proficiency study programma. In het kader hiervan worden jaarlijks 30 *M. tuberculosis* kweken geanalyseerd om internationale inter- en intralaboratorium reproduceerbaarheid te testen en de internationale standaardisatie te bevorderen ([Van Deun, 2011](#)).

Conclusies	
Niveau1	De commercieel beschikbare breekpuntsbepalingen voor geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen (MGIT, MB/BacT) geven een accurate en snelle indicatie van de gevoeligheid, met name voor isoniazide en rifampicine
Niveau2	De commercieel beschikbare breekpuntsbepalingen voor pyrazinamide zijn redelijk accuraat maar vereisen veel ervaring om fout-resistente uitslagen door klontering of een te groot inoculum te voorkomen
Niveau 4	Gevoeligheidsbepalingen voor tweedelijnsmiddelen zijn nog niet goed gestandaardiseerd en klinisch gevalideerd

Overige overwegingen

Er is nog geen consensus over de mate van centralisatie van tuberculosedagnostiek, inclusief de gevoeligheidsbepalingen voor *M. tuberculosis* complex bacteriën. Gezien

het beperkt aantal nieuwe kweek-bewezen tuberculose gevallen per jaar in Nederland is dit een belangrijke discussie om op regionaal en nationaal niveau te voeren. De complexiteit van met name de gevoeligheidsbepaling voor pyrazinamide en de tweedelijnsmiddelen maakt centralisatie hiervan raadzaam.

Een aantal belangrijke antituberculose middelen zijn instabiel in kweekmedia geïncubeerd bij 37 graden. Dit geldt met name voor rifampicine en isoniazide, maar ook voor streptomycine en ethionamide (J. van Ingen, manuscript ingestuurd voor publicatie). Antibiotica dienen dus zo kort mogelijk voor het inzetten van de gevoeligheidsbepaling in het medium te worden gebracht. De gemeten MIC is een factor 4 tot 8 hoger wanneer antibioticum bevattende media 7 of 14 dagen worden geïncubeerd.

Aanbevelingen

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen dienen ten minste van de eerste kweek van iedere nieuwe tuberculosepatiënt te worden uitgevoerd.

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor de eerstelijnsmiddelen behalve pyrazinamide dienen te worden uitgevoerd met commercieel beschikbare breekpuntsbepalingen in geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen. Met het oog op internationale standaardisatie is de MGIT960 methode aan te bevelen

Gevonden resistentie, discrepanties met moleculaire testen, of in het licht van kliniek en epidemiologie twijfelachtige resultaten van gevoeligheidsbepalingen dienen op referentielaboratorium niveau te worden geverifieerd middels een uitgebreidere bepaling waarin een grotere concentratiereeks per antibioticum kan worden getest, o.a. om ook intermediaire gevoeligheid aan te kunnen tonen.

Gevoeligheidsbepalingen voor pyrazinamide dienen te worden uitgevoerd door laboratoria met specifieke expertise en directe toegang tot een confirmatietest om fout-resistente uitslagen te voorkomen.

Gevonden pyrazinamide resistentie dient, als het geen *M. bovis* stam betreft, altijd te worden geconfirmeerd met een tweede test; dit kan een herhaling van de initiële test of *pncA* gen sequencing zijn.

Gevoeligheidsbepalingen voor de tweedelijnsmiddelen dienen gecentraliseerd te worden uitgevoerd in 1 laboratorium; in Nederland heeft het RIVM de specifieke expertise.

Kwaliteitscontrole van gevoeligheidsbepalingen voor de eerstelijnsmiddelen – behalve pyrazinamide – moet onderdeel zijn van de kwaliteitscontrole programma's van SKML.

3. Hoe presteren beschikbare commerciële methoden voor moleculaire detectie van resistentie in gebieden met lage TB incidentie en lage resistentiepercentages?

3.1 GeneXpert MTB/RIF

Het uitrollen van de Xpert MTB/RIF in hoog-endemisch TB gebied door de WHO heeft een revolutie in de diagnostiek van (MDR-)TB veroorzaakt ([WHO, 2014](#)). In een meta-analyse van 24 studies waarin de detectie van rifampicine resistentie is uitgezet tegen fenotypische detectie van rifampicine resistentie werden een gepoolde sensitiviteit van 95% en specificiteit van 98% gemeten ([Steingart, 2014](#)). In een theoretisch cohort van 1000 patienten met een prevalentie van rifampicine resistentie van 5% (in Nederland is dit 1%) betekent dit dat 3 van de 50 rifampicine resistente stammen niet als zodanig wordt herkend en dat 19 van de 950 gevoelige stammen onterecht als rifampicine resistent zou worden aangemerkt (PPV 71.2%, NPV 99.6%) ([Steingart, 2014](#)).

3.2 GenoType MTBDRplus

In een systematische review zijn 12 artikelen over de MTBDRplus test geanalyseerd ([Arentz, 2013](#)). Wanneer deze test werd gebruikt als indirecte test voor rifampicine resistentie had deze een sensitiviteit van 95.5% en een specificiteit van 98.5%, wanneer gevoeligheidsbepaling voor rifampicine op vaste of vloeibare media als referentietest werd gebruikt. Als directe test op klinisch materiaal had de test een sensitiviteit van 96.8% en een specificiteit van 96.4% ([Arentz, 2013](#)). In een cohort met een MDR-TB prevalentie van 3% (in Nederland is dit 1%) betekent dit een positief voorspellende waarde van 59.3% en een negatief voorspellende waarde van 99.9% ([Arentz, 2013](#)). Dit systematische review keek niet naar isoniazide resistentie. Een recente studie in Zweden, dat een met Nederland vergelijkbare epidemiologie van TB kent, vond een sensitiviteit van 89.6%, specificiteit van 100%, positief voorspellende waarde van 100% en negatief voorspellende waarde van 98.5% voor de detectie van isoniazide resistentie met de MTBDRplus assay ([Chryssanthou, 2012](#)).

De prestaties van deze test zijn ook specifiek in de de Nederlandse setting uitgezocht. Uit retrospectief geanalyseerde data van 2649 isolaten uit de jaren 2007-2012 komen een sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarde van 100%, 99%, 80% and 100% voor detectie van rifampicine resistentie naar voren. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarde van het vinden van een katG gen mutatie voor het detecteren van isoniazide resistentie was 55%, 100%, 100% and 94%. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarde van het vinden van een inhA gen mutatie voor het detecteren van isoniazide resistentie was 35%, 100%, 99%, 92%. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief

voorspellende waarden van het vinden van een katG danwel inhA mutatie voor het detecteren van isoniazide resistentie waren 88%, 100%, 100% en 98%, wanneer deze test als indirecte test werd toegepast en de fenotypische gevoeligheidsbepaling middels MGIT960 als gouden standaard werd aangehouden. Deze karakteristieken waren niet wezenlijk anders indien alleen risicogroepen getest werden in vergelijking met wanneer alle nieuw ingestuurde *M. tuberculosis* isolaten gescreend werden. (Sami Simons, Jakko van Ingen, Dick van Soolingen; manuscript ingestuurd voor publicatie).

3.3 GenoType MTBDRs/

De GenoType MTBDRsl detecteert een aantal bekende mutaties in het rrs (16S) gen (target van de aminoglycosiden en capreomycine), het gyrA gen (target van de fluoro-chinolonen) en het embB gen (een van de targets van ethambutol). De prestaties van deze bepaling zijn recent samengevat in een meta analyse voor de Cochrane Library. Uit data uit 21 publicaties, waaronder een in Nederland verrichte studie, werden een sensitiviteit en specificiteit van 87.9% en 99.5% voor amikacine resistentie, 66.9% en 98.6% voor kanamycine resistentie en 79.5% en 95.8% voor capreomycine gemeten. De sensitiviteit en specificiteit voor het aantonen van fluoroquinolon-resistentie waren 83.1% en 97.7%, respectievelijk. Deze waarden gelden indien de test indirect wordt uitgevoerd (dus op gekweekte stammen, niet op klinische materialen) ([Theron, 2014](#)).

Ook van deze test zijn de prestaties retrospectief geanalyseerd in Nederland. De sensitiviteit van het vinden van een rrs gen mutatie voor het detecteren van capreomycine resistentie was 50%, de specificiteit was 96%, met een positief voorspellende waarde van 71% en een negatief voorspellende waarde van 91%. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarden van het vinden van een rrs gen mutatie voor het detecteren van amikacine resistentie waren 86%, 99%, 86% en 99%. Voor detectie van moxifloxacin resistentie middels het aantonen van gyrA gen mutaties werd een sensitiviteit, specificiteit en positief en negatief voorspellende waarde van 100% gevonden. Sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarden voor het vinden van een embB gen mutatie voor het detecteren van ethambutol resistentie waren 62%, 71%, 58% en 74% (Sami Simons, Jakko van Ingen, Dick van Soolingen; manuscript ingestuurd voor publicatie).

Conclusies

Niveau1

GeneXpert en MTBDRplus hebben vergelijkbare prestaties m.b.t. het detecteren van rifampicine resistentie

Conclusies	
Niveau2	In een laag-endemische setting is de lage positief voorspellende waarde bij het detecteren van een <i>rpoB</i> gen mutatie voor zowel GeneXpert als MTBDRplus een zorg
Niveau1	Moleculaire detectie van isoniazide resistentie is minder gevoelig dan detectie van rifampicine resistentie
Niveau2	Moleculaire detectie van resistentie tegen aminoglycosiden, capreomycine en fluorochinolonen met de MTBDRsl test kent een beperkte sensitiviteit; de test kan met name worden gebruikt om resistentie uit te sluiten
Niveau2	Moleculaire detectie van resistentie tegen ethambutol met de MTBDRsl test kent een beperkte sensitiviteit en specificiteit en is daarmee klinisch niet bruikbaar

Overige overwegingen

De leden van de werkgroep zijn het er over eens dat de PPV van de directe, moleculaire rifampicine resistentie test op grond van alleen de GeneXpert MTB/RIF te laag is om deze in een regio met een lage prevalentie van rifampicine resistentie te adviseren en in de routine diagnostiek op te nemen ([WHO, 2013](#); [Steingart, 2013](#)). Het advies is om een positieve test altijd te laten bevestigen door een tweede test, liefst gebaseerd op een sequentie analyse van het *rpoB* gen ([McAlister, 2015](#)). Indien het eigen of regionale laboratorium deze moleculaire bepalingen niet zelf routinematig uitvoert, kan het materiaal naar referentielaboratoria worden gestuurd voor sneldiagnostiek; dit zijn o.a. het RIVM (voor MTBDRplus en MTBDRsl) en het Radboudumc (voor MTBDRplus). Het vinden van multidrug-resistentie of rifampicine monoresistentie middels moleculaire technieken is aanleiding voor nader overleg met een klinisch consulent in een van de twee gespecialiseerde MDR-TB klinieken (Beatrixoord in Haren en Dekkerswald in Groesbeek).

De werkgroep ondersteunt de aanbevelingen uit 2009 waarin snelle directe resistentie wordt geadviseerd in een groep van hoog-risico patiënten waarin de PPV van de XpertMTB/RIF acceptabel is ([Erkens, 2009](#)). Er wordt in de werkgroep echter wisselend gedacht over het adviseren van snelle moleculaire resistentie testen met screening en confirmatie op al het microscopisch positieve patiëntmateriaal, ongeacht de achtergrond van de patiënt. Met name vanuit de tbc bestrijding en de behandelars ligt het verzoek om alle microscopische positieve materialen aan een sneltest voor rifampicine resistentie te onderwerpen, omdat in de laatste jaren ook MDR-TB

gevonden wordt onder patiënten zonder risicoprofiel. Er zijn echter geen gepubliceerde data om te onderbouwen dat herkenning van snelle directe resistentie van *M. tuberculosis* voor rifampicine een invloed heeft op "patients outcome" en op de transmissie, zelfs niet in landen met een hoge prevalentie. Gepubliceerde data uit Nederland geven ook geen klinische steun om directe snelle resistentie bepalingen te adviseren voor alle microscopie positieve materialen ([van Altena, 2015](#)). De uitslagen van de snelle moleculaire testen worden door diverse behandelaars nog niet eenduidig geïnterpreteerd. En het is nog niet geïnventariseerd in hoeverre positieve uitslagen het behandelregime beïnvloeden.

De prestaties van de MTBDR*plus* test lijken beter te zijn dan die van de GeneXpert test en in deze test wordt ook INH resistentie op betrouwbare wijze gedetecteerd, maar een directe vergelijking ontbreekt nog. Een in Georgia verricht onderzoek waar een hoge prevalentie van MDR tuberculose heerst, toont dat de toepassing van MTBDR*plus* wel leidt tot een snellere start met adequate tweede lijn middelen en een eerder negatief worden van sputumkweek ([Kipiani, 2014](#)).

De werkgroep meent dat het zinvol is een apart advies op te stellen over het altijd toepassen van een moleculaire test direct op microscopisch positief patiëntmateriaal om INH en rifampicine resistentie te detecteren, met de daarbij behorende logistiek en de consequenties van de testresultaten voor de behandelaars, waaronder ook GGDen

Aanbevelingen

Moleculaire gevoeligheidsbepalingen dienen te worden uitgevoerd op directe materialen waarin al *M. tuberculosis* complex bacteriën zijn gedetecteerd van patiënten met een verhoogd risico op resistentie, door afkomst uit een gebied met veel (multi) resistentie of door een geschiedenis van eerdere behandeling(en) voor tuberculose. Lokaal kan worden afgesproken dit indicatiegebied te verbreden door bij alle positieve materialen een directe moleculaire resistentie te verrichten.

Bij verdenking op het bestaan van een infectie met resistente *M. tuberculosis*, dient met behulp van moleculaire technieken resistentie tegen rifampicine en tegen isoniazide onderzocht te worden.

Bij patiënten met een lage a priori kans of resistentie dient rekening te worden gehouden met de beperkte positief voorspellende waarde van de detectie van mutaties geassocieerd met rifampicine resistentie van zowel geneXpert als MTBDR*plus*.

4. Fenotypische resistentiebepaling voor NTM

De methodologie voor fenotypische resistentiebepaling voor NTM heeft altijd meer verwantschap gekend met de methoden uit de algemene bacteriologie dan met de methoden gebruikt voor *M. tuberculosis*. Het Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) raadt momenteel aan om de resistentiebepaling dmv microdilutie in cation-adjusted Mueller Hinton bouillon uit te voeren; breekpunten staan vermeld in [Tabel 8.5 \(CLSI, 2011\)](#). EUCAST heeft nog geen aanbevelingen over NTM gevoeligheidsbepalingen uitgegeven. Deze aanbeveling door CLSI is opgenomen in een behandelrichtlijn van ATS/IDSA ([Griffith, 2007](#)).

De achtergrond van deze aanbeveling is dat slechts twee methoden in klinische studies zijn gebruikt om correlaties tussen gevoeligheid voor middelen in vitro en de uit-

Tabel 8.5 Breekpunten voor microdilutie methode, volgens Clinical Laboratory Standards Institute

	MAC	<i>M. kansasii</i>	<i>M. marinum</i>	Snelle groeiers
Clarithromycine	≤8 S; 16 I; ≥32 R	>16 R	>16 R	≤2 S; 4 I; ≥8 R*
Amikacine	≤16 S; 32 I; ≥64 R	>32 R	>32 R	≤16 S; 32 I; ≥64 R**
Tobramycine	-	-	-	≤2 S; 4 I; ≥8 R**
Linezolid	≤8 S; 16 I; ≥32 R	>16 R	-	≤8 S; 16 I; ≥32 R
Moxifloxacin	≤1 S; 2 I; ≥4 R	>2 R	>2 R	≤1 S; 2 I; ≥4 R
Ciprofloxacin	-	>2 R	>2 R	≤1 S; 2 I; ≥4 R
Co-trimoxazol	-	>2/38 R	>2/38 R	≤2/38 S; ≥4/76 R
Tetracycline	-	-	>4 R	≤1 S; 2-4 I; ≥8 R
Cefoxitine	-	-	-	≤16 S; 32-64 I; ≥128 R
Imipenem	-	-	-	≤4 S; 8-16 I; ≥32 R
Rifampicine	-	>1 R	>1 R	-
Rifabutin	-	>2 R	>2 R	-
Ethambutol	-	>4 R	>4 R	-

komst van therapie met die middelen in vivo te bestuderen: de microdilutie methode in cation-adjusted Mueller Hinton bouillon en de radiometrische BacTec460 macrodilutie methode. Deze laatste is echter in 2011 uit productie genomen en kan niet meer worden gebruikt ([van Ingen, 2014](#)). Microdilutie is te prefereren boven E-testen voor NTM (evenals voor *Nocardia* spp) gezien de beperkte reproduceerbaarheid van E-testen ([Woods, 2000](#)).

Voor snel groeiende NTM (bijvoorbeeld *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*) zijn de correlaties tussen in vitro gevoeligheid en in vivo uitkomst van therapie redelijk sterk, ten minste bij extrapulmonale infecties ([Wallace, 1985](#)). Dit geldt met name voor cefoxitine, imipenem, amikacine, tobramycine, de tetracyclines (behalve tigecycline), co-trimoxazol en clarithromycine. Deze middelen dienen dus te worden getest en gerapporteerd. Hoewel tigecycline sporadisch wordt ingezet is hiervoor nog geen breekpunt gedefinieerd. De gevoeligheidsbepalingen voor snel groeiende NTM worden na 72 uur afgelezen. Macrolide-gevoelige stammen worden vervolgens nog 11 dagen geïncubeerd om induceerbare resistentie –op basis van een *erm* gen tegen macroliden te detecteren ([CLSI, 2011](#); [van Ingen, 2014](#)). Voor *M. abscessus* longinfecties geldt dat behandelresultaten van macrolide-gebaseerde regimes beter zijn bij ziekte door stammen met een door deletie niet-functioneel *erm* gen (in het verleden tot species niveau verheven als '*M. massiliense*'), hetgeen suggereert dat het detecteren van deze induceerbare resistentie klinisch relevant is ([van Ingen, 2014](#); [Koh, 2011](#)).

Voor de langzaam groeiende NTM zijn associaties tussen in vitro gevoeligheid en in vivo uitkomst van therapie ook waargenomen in klinische studies. Bij *M. avium* complex longinfecties is macrolide resistentie duidelijk gecorreleerd met slechte uitkomsten van het rifampicine-ethambutol-macrolide regime ([Wallace, 1996](#); [Tanaka, 1999](#)), en is amikacine resistentie geassocieerd met falen van het rifampicine-ethambutol-amikacine regime voor ziekte door macrolide-resistente *M. avium* complex bacteriën ([Brown-Elliott, 2013](#)). De relatie tussen macrolide-resistentie en falen van macrolide-gebaseerde regimes is ook gezien in trials met HIV-geassocieerde gedissemineerde *M. avium* complex infecties ([Chaisson, 1994](#); [Sison, 1996](#)). Hoewel ook breekpunten zijn geformuleerd voor moxifloxacin en linezolid ([CLSI, 2011](#)), is het testen en rapporteren van amikacine en clarithromycine het belangrijkste.

Voor *M. kansasii* is een in vitro-in vivo correlatie alleen bekend voor rifampicine ([Ahn, 1983](#)). Falen van het standaard rifampicine-ethambutol-isoniazide regime is vrijwel altijd gevolg van optreden van rifampicine resistentie, bijvoorbeeld door matige compliance. Rifampicine is dus het enige middel dat getest en gerapporteerd dient te worden. Bij het vinden van resistentie is het nuttig om secundaire middelen zoals macroliden, amikacine en co-trimoxazol te testen, en hiervoor zijn breekpunten ge-

formuleerd. Deze breekpunten zijn niet in klinische studies gevalideerd. Voor overige langzame groeiers zijn in vitro-in vivo correlaties minder duidelijk, omdat er geen trials of grote case series zijn waarin in vitro gevoeligheden zijn vergeleken met uitkomsten van therapie.

Conclusie

Niveau 3	Fenotypische gevoeligheidsbepalingen dmv microdilutie zijn voorspellend voor de uitkomst van therapie, maar de exacte waarde is bekend voor slechts enkele species en enkele klassen antibiotica.
----------	---

Overige overwegingen

Gevoeligheidsbepalingen zijn alleen zinvol wanneer een behandeling met antibiotica wordt overwogen. Daarbij is het alleen zinvol om middelen te testen die voor therapie van waarde kunnen zijn, waarvan variatie in MICs verwacht mag worden en waarbij de MICs ook enige mate van voorspelling van de uitkomst van therapie bieden.

Aanbevelingen

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor NTM dienen te worden uitgevoerd op isolaten van patiënten met bewezen NTM infectie.

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor NTM dienen te worden uitgevoerd d.m.v. microdilutie in cation-adjusted Mueller Hinton bouillon.

Voor NTM dienen alleen middelen te worden gerapporteerd waarvoor breekpunten zijn vastgesteld en waarvoor associaties tussen in vitro gevoeligheid en uitkomst van therapie in vivo zijn beschreven in klinische studies.

Referenties

Ahn CH, Lowell JR, Ahn SS, Ahn SI, Hurst GA. Short-course chemotherapy for pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii*. *Am Rev Respir Dis* 1983; 128: 1048-50.

Aono A, Hirano K, Hamasaki S, Abe C. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 347-52.

Ardito F, Posteraro B, Sanguinetti M, Zanetti S, Fadda G. Evaluation of BACTEC *Mycobacteria* Growth Indicator Tube (MGIT 960) automated system for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 4440-4.

Arentz M, Sorensen B, Horne DJ, Walson JL. Systematic review of the performance of rapid rifampicin resistance testing for drug-resistant tuberculosis. *PLoS One* 2013; 8: e76533.

Bemer P, Bodmer T, Munzinger J, Perrin M, Vincent V, Drugeon H. Multi-center evaluation of the MB/BACT system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar;42(3):1030-4.

Bergmann JS, Woods GL. *Mycobacterial* growth indicator tube for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 28: 153-6.

Bergmann JS, Woods GL. Reliability of *mycobacteria* growth indicator tube for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to ethambutol and streptomycin. *J Clin Microbiol* 1997b; 35: 3325-7.

Böttger EC. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1128-34.

Brown-Elliott BA, Iakhiaeva E, Griffith DE, Woods GL, Stout JE, Wolfe CR, Turenne CY, Wallace RJ Jr. In vitro activity of amikacin against isolates of *Mycobacterium avium* complex with proposed MIC breakpoints and finding of a 16S rRNA gene mutation in treated isolates. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 3389-94.

Brunello F, Fontana R. Reliability of the MB/BacT system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates to antituberculous drugs. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 872-3.

Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, Meissner G, Mitchison DA, Sula L. *Mycobacteria*: Laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. *Bull World Health Organ* 1963; 29: 565-78.

Referenties

Chaisson RE, Benson CA, Dube MP et al. Clarithromycin therapy for bacteremic *Mycobacterium avium* complex disease. *A randomized, double-blind, dose-ranging study in patients with AIDS. AIDS Clinical Trials Group Protocol 157 Study Team.* *Ann Intern Med* 1994; 121: 905-11.

Chang KC, Yew WW, Zhang Y. Pyrazinamide susceptibility testing in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review with meta-analyses. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4499-505.

Chedore P, Bertucci L, Wolfe J, Sharma M, Jamieson F. Potential for erroneous results indicating resistance when using the Bactec MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 300-1.

Chryssanthou E, Angeby K. The GenoType® MTBDRplus assay for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Sweden. *APMIS* 2012; 120: 405-9.

Clinical Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes: Approved Standard M24-A2. *Wayne, PA*, 2011.

Cui Z, Wang J, Lu J, Huang X, Zheng R, Hu Z. Evaluation of methods for testing the susceptibility of clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 1374-80.

Díaz-Infantes MS, Ruiz-Serrano MJ, Martínez-Sánchez L, Ortega A, Bouza E. Evaluation of the MB/BacT mycobacterium detection system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1988-9.

Erkens CGM, van Deutekom H, van Altena R, van Soolingen D. Criteria voor toepassing van moleculaire testen in de diagnostiek van MDR- en XDR-tuberculose *Tegen de Tuberculose*, jaargang 105, nr. 3, 2009

Garrigó M, Aragón LM, Alcaide F, Borrell S, Cardeñosa E, Galán JJ, González-Martín J, Martín-Casabona N, Moreno C, Salvado M, Coll P. Multicenter laboratory evaluation of the MB/BacT *Mycobacterium* detection system and the BACTEC MGIT 960 system in comparison with the BACTEC 460TB system for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 1766-70.

Griffith DE, Aksmit T, Brown-Elliott BA, Catanzaro A, Daley C, Gordin F, Holland SM, Horsburgh R, Huitt G, Iademarco MF, Iseman M, Olivier K, Ruzos S, Fordham von Reyn C, Wallace RJ Jr., Winthrop K. *An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases.* *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 367-416.

Referenties

Gumbo T, Chigutsa E, Pasipanodya J, Visser M, van Helden PD, Sirgel FA, McIlleron H. The pyrazinamide susceptibility breakpoint above which combination therapy fails. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2420-5.

Gumbo T. New susceptibility breakpoints for first line antituberculosis drugs, based on antimicrobial PK/PD science and population pharmacokinetic variability. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 1484-91.

Johansen IS, Thomsen VØ, Marjamäki M, Sosnovskaja A, Lundgren B. Rapid, automated, nonradiometric susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis complex to four first-line antituberculous drugs used in standard short-course chemotherapy. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 50: 103-7.

Kipiani M, Mirtskhulava V, Tukvadze N, Magee M, Blumberg HM, Kemper RR. Significant clinical impact of a rapid molecular diagnostic test (Genotype MTBDRplus assay) to detect multidrug-resistant tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2014;59:1559-66.

Koh WJ, Jeon K, Lee NY, Kim BJ, Kook YH, Lee SH, Park YK, Kim CK, Shin SJ, Huitt GA, Daley CL, Kwon OJ. Clinical significance of differentiation of Mycobacterium massiliense from Mycobacterium abscessus. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 183: 405-410.

Kontos F, Maniati M, Costopoulos C, Gitti Z, Nicolaou S, Petinaki E, Anagnostou S, Tselentis I, Maniatis AN. Evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for the susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs: a multicenter study. *J Microbiol Methods* 2004; 56: 291-4.

Kontos F, Nicolaou S, Kostopoulos C, Gitti Z, Petinaki E, Maniati M, Anagnostou S, Raftopoulou A, Papageorgiou P, Scrioubellou A, Tselentis I, Maniatis AN. Multicenter evaluation of the fully automated Bactec MGIT 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide: comparison with the radiometric Bactec 460TB system. *J Microbiol Methods* 2003; 55: 331-3.

Krüüner A, Yates MD, Drobniewski FA. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 811-8.

McAlister AJ, Driscoll J, Metchock B. DNA sequencing for the confirmation of rifampin resistance detected by Cepheid Xpert® MTB/RIF Assay. *J Clin Microbiol*. 2015 Mar 4. pii: JCM.03433-14. [Epub ahead of print]

Referenties

Middlebrook G, Reggiardo Z, Tigertt WD. Automatable radiometric detection of growth of Mycobacterium tuberculosis in selective media. *Am Rev Respir Dis* 1977; 115, 1066-9.

Palaci M, Ueki SY, Sato DN, Da Silva Telles MA, Curcio M, Silva EA. Evaluation of mycobacteria growth indicator tube for recovery and drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis isolates from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 762-4.

Palomino JC, Traore H, Fissette K, Portaels F. Evaluation of Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) for drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 1999; 3: 344-8.

Pfyffer GE, Palicova F, Rüsç-Gerdes S. Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1670-4.

Piersimoni C, Mustazzolu A, Giannoni F, Bornigia S, Gherardi G, Fattorini L. Prevention of false resistance results obtained in testing the susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide with the Bactec MGIT 960 system using a reduced inoculum. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 291-4.

Rüsç-Gerdes S, Domehl C, Nardi G, Gismondo MR, Welscher HM, Pfyffer GE. Multicenter evaluation of the mycobacteria growth indicator tube for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to first-line drugs. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 45-8.

Scarparo C, Ricordi P, Ruggiero G, Piccoli P. Evaluation of the fully automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide, streptomycin, isoniazid, rifampin, and ethambutol and comparison with the radiometric BACTEC 460TB method. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1109-14

Schön T, Juréen P, Giske CG, Chryssanthou E, Sturegård E, Wengren J et al. Evaluation of Wild-type MIC distributions as a tool for determination of clinical breakpoints for Mycobacterium tuberculosis. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 786-93.

Simons SO, Mulder A, van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D. Role of rpsA gene sequencing in diagnosis of pyrazinamide resistance. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 382.

Referenties

Simons SO, van Ingen J, van der Laan T, Mulder A, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D. Validation of pncA gene sequencing in combination with the MGIT method to test susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 428-34.

Sison JP, Yao Y, Kemper CA, Hamilton JR, Brummer E, Stevens DA, Deresinski SC. Treatment of Mycobacterium avium complex infection: do the results of in vitro susceptibility tests predict therapeutic outcome in humans? *J Infect Dis* 1996; 173: 677-683.

Springer B, Lucke K, Calligaris-Maibach R, Ritter C, Böttger EC. Quantitative drug susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis by use of MGIT 960 and EpiCenter instrumentation. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1773-80.

Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 1: CD009593.

Steingart KR, Sohn H, Schiller I, Kloda LA, Boehme CC, Pai M, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jan 31;1:CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub2

Tanaka E, Kimoto T, Tsuyuguchi K, Watanabe I, Matsumoto H, Niimi A, Suzuki K, Murayama T, Amitani R, Kuze F. Effect of clarithromycin regimen for Mycobacterium avium complex pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 866-872.

Theron G, Peter J, Richardson M, Barnard M, Donegan S, Warren R, Steingart KR, Dheda K. The diagnostic accuracy of the GenoType(®) MTBDRsl assay for the detection of resistance to second-line anti-tuberculosis drugs. *Cochrane Database Syst Rev* 2014; 10: CD010705.

Tison F, Tacquet A, Guillaume J, Devulder B. [Unsuitability of the Basic Coletsos Medium for the Measurement of Sensitivity to Cycloserine. *Inactivation of Cycloserine by Sodium Pyruvate*]. *Ann Inst Pasteur Lille* 1963; 14: 117-124. Frans.

Tortoli E, Benedetti M, Fontanelli A, Simonetti MT. Evaluation of automated BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to four major antituberculous drugs: comparison with the radiometric BACTEC 460TB method and the agar plate method of proportion. *J Clin Microbiol.* 2002 Feb;40(2):607-10.

Referenties

Tortoli E, Mattei R, Savarino A, Bartolini L, Beer J. Comparison of Mycobacterium tuberculosis susceptibility testing performed with BACTEC 460TB (Becton Dickinson) and MB/BacT (Organon Teknika) systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; 38: 83-6.

van Altena R, de Vries G. Haar CH, de Lange WCM, Magis-Escurra C, van den Hof S, van Soolingen D, Boeree MJ, van der Werf TS. *Highly successful treatment outcome of multidrug-resistant tuberculosis in the Netherlands, 2000–2009.* In *J Tuberc Lung Dis* 2015; 19(4);406-12 <http://dx.doi.org/10.5588/ijtld.14.0838>

Van Deun A, Wright A, Zignol M, Weyer K, Rieder HL. Drug susceptibility testing proficiency in the network of supranational tuberculosis reference laboratories. *Int J Tuberc Lung Dis* 2011; 15: 116-24.

van Ingen J, Boeree M, van Soolingen D, Mouton J. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat* 2012; 15: 149-61.

van Ingen J, Kuijper EJ. Drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Future Microbiology* 2014;9:1095-110.

van Ingen J, Simons S, de Zwaan R, van der Laan T, Kamst-van Agterveld M, Boeree MJ, van Soolingen D. Comparative study on genotypic and phenotypic second line drug resistance testing of Mycobacterium tuberculosis complex isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2749-53.

Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE, Girard WM, Murphy DT. Clarithromycin regimens for pulmonary Mycobacterium avium complex: the first 50 patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153: 1766-1772.

Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Bulen MG. Treatment of nonpulmonary infections due to Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium chelonae on the basis of in vitro susceptibilities. *J Infect Dis* 1985; 152: 500-14.

Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1974; 109: 147-51.

Woods GL, Bergmann JS, Witebsky FG, Fahle GA, Boulet B, Plaunt M, Brown BA, Wallace RJ Jr, Wanger A. Multisite reproducibility of Etest for susceptibility testing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium chelonae, and Mycobacterium fortuitum. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 656-661.

Referenties

World Health Organization. Automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB in adults and children. *Policy Update. Geneva, World Health Organization, 2014.* http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112472/1/9789241506335_eng.pdf

World Health Organization. Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. *Geneva, World Health Organization, 2014b.* http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/130918/1/9789241548809_eng.pdf

Yew WW, Tong SC, Lui KS, Leung SK, Chau CH, Wang EP. Comparison of MB/BacT system and agar proportion method in drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39:229-32.

Hoofdstuk 9

INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAY (IGRA)

Praktische uitvoering van laboratoriumdiagnostiek voor infecties met tuberculosebacteriën door middel van Interferon Gamma Release Assays

Uitgangsvraag

Wat is de optimale uitvoering van een Interferon Gamma Release Assay?

Inleiding

Voor de sensitiviteit en specificiteit van de laboratoriumdiagnostiek met behulp van Interferon Gamma Release Assays (IGRA) en voor de indicatiestelling van IGRA testen verwijzen we naar de uitgebreide "Richtlijn Interferon gamma release assays bij de diagnostiek van tuberculose", versie april 2011, van de IGRA werkgroep van de Commissie voor Praktische Tuberculosebestrijding (CPT). [Ref: www.nvmm.nl/Kwaliteit/Richtlijnen]

In de richtlijn wordt geconcludeerd dat IGRA de bestaande diagnostiek voor actieve tuberculose niet kan vervangen en dat een negatieve IGRA actieve tuberculose niet uitsluit. Voor diagnostiek van latente tuberculose-infecties heeft de IGRA aanvullende waarde.

Deze NVMM diagnostiekrichtlijn geeft adviezen voor de praktische uitvoering van de IGRA testen in het laboratorium. De richtlijn gaat nader in op de interpretatie van de afkappunten in verschillende subpopulaties en analyseert de invloed van voorafgaande huidtesten op de resultaten van IGRA ("boosting"). Tot slot worden schommelingen van de IGRA waarden rond het afkappunt ('wobbling around the cutoff point') bij serieel testen besproken met de noodzaak tot het rapporteren van kwantitatieve uitslagen. Daar waar er sprake is van overlap met deze richtlijn en die van de CPT of er uit de literatuur verschillende opties mogelijk waren, is gekozen om de CPT richtlijn zoveel mogelijk te volgen.

Na de totstandkoming van deze aanbevelingen werd duidelijk dat een nieuwe versie van QuantiFERON-testen op de markt komt. Op dit moment zijn er geen gepubliceerde of gepresenteerde data over de performance van deze versie die in deze richtlijn konden worden opgenomen.

Beschrijving van de verschillende testen

IGRA's maken gebruik van de eigenschap van gesensitiseerde CD8+ en CD4+ T-lymfocyten om interferon gamma (INF- γ) af te geven, indien gestimuleerd met synthetische specifieke peptiden van specifieke leden van het *Mycobacterium tuberculosis*-complex. Zij meten expositie met *M. tuberculosis*, maar niet met *M. bovis* BCG. Alleen in *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*, en *M. riyadhense* zijn genen aangetoond die kruisreactiviteit kunnen geven ([van Ingen, 2009](#)). Gezien de overeenkomstige ziektebeelden en de frequentie van voorkomen heeft dit vooral klinische impli-

caties voor infecties met *M. kansasii* ([Arend, 2005](#)). De T-SPOT.TB meet de aantallen reactieve lymfocyten in de fractie perifere mononucleaire bloedcellen (PBMC), de QuantiFERON-TB meet de concentratie van vrijgekomen INF- γ in supernatant van volbloedkweek. Beide testen zijn goedgekeurd door de FDA en hebben een Europese CE (Conformité Européenne) markering.

QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay

De QuantiFERON-TB Gold In-Tube assay (QFT-GIT; Cellestis Ltd, Australia/Qiagen GmbH, Germany; Ref: [Cellestis, 2007](#)), is de vervanger van de QuantiFERON-TB Gold assay. Voor de QFT-GIT dient in 3 verschillende buisjes 1 mL bloed te worden afgenomen die alleen heparine (negatieve of Nil-controle) of heparine, dextrose en phytohemagglutinin (PHA, positieve of mitogen controle) of heparine, dextrose en *M. tuberculosis* antigenen bevatten. Deze antigenen bestaan uit een mix van synthetische peptiden ESAT-6, CFP10 en TB7.7 (Rv 2654, peptide 4) in één buisje. Na menging van antigeen en bloed worden de buisjes zo snel mogelijk en binnen 12-16 uur in een incubator bij 37 °C geplaatst. Na 16-24 uur rechtop staand incuberen worden de buisjes gecentrifugeerd. De INF- γ -concentratie in het plasma kan vervolgens worden bepaald met een ELISA. Voor de QFT-GIT hanteert de fabrikant een afkapwaarde van 0,35 IU/ml.

T-SPOT.TB assay

De T-SPOT.TB (T-SPOT; Oxford Immunotec, UK; [Oxford Immunotec, 2009](#)) meet het aantal IFN- γ producerende T-cellen na stimulatie met peptiden van *M. tuberculosis* antigenen ESAT-6 en CFP-10, en is gebaseerd op de ELISPOT assay. Uit gehepariniseerd volbloed worden eerst witte bloedcellen geïsoleerd, meermalen gewassen, geteld, en vervolgens wordt een vooraf bepaald aantal cellen bij 37 °C geïncubeerd in kweekmedium met of zonder antigeen. Na 16-24 uur incuberen wordt de test voltooid door het wassen van de platen en het kleuren van gebonden INF- γ . De test geeft een apart resultaat voor reacties op ESAT-6 en CFP-10 en bevat altijd een positieve controle. Voor de T-SPOT is de afkapwaarde 6 spots meer dan in de negatieve controle.

“Indeterminate” of onbepaalde uitslagen kunnen in beide testen ontstaan door een hoge achtergrondreactie in de negatieve controle, door een lage respons in de positieve controle buis of door ondeskundige behandeling van het monster (zie [Tabel 9.1](#))

Deelvragen

1. Welke testcondities zijn van invloed op de uitslag van een IGRA?
2. Wat is de testvariatie van de IGRA?
3. Wat is de optimale afkapwaarde bij het gebruik van IGRA's in Nederland?
4. Wat is de definitie van een con- en reversie bij serieel testen met IGRA?
5. Heeft vermelding van kwantitatieve uitslagen meerwaarde?

Tabel 9.1 definities van een indeterminate uitslag

M. tuberculosis antigeenbuis			Nil	Mitogen	
QFT-GIT inclusief Mitogen	<0,35 IU/ml		≤8,0 IU/ml	<0,5 IU/ml	
	>0,35 IU/ml en <25% van de Nil		≤8,0 IU/ml	<0,5 IU/ml	
	Alle waarden		>8.0 IU/ml	Alle waarden	
QFT-GIT exclusief Mitogen	Alle waarden		>8.0 IU/ml	-	
	ESAT 6		CFP-10	Nil	Mitogen
T-SPOT	≤6	en	≤6	≤10	<20
	5, 6 of 7	en	≤5	≤10	>20
	≤5	en	5, 6 of 7	≤10	>20
	Alle waarden			>10	Alle waarden

Selectiecriteria literatuur (Tot en met december 2014)

("interferon-gamma release tests"[MeSH Terms] OR ("interferon-gamma"[All Fields] AND "release"[All Fields] AND "tests"[All Fields]) OR "interferon-gamma release tests"[All Fields] OR ("interferon"[All Fields] AND "gamma"[All Fields] AND "release"[All Fields] AND "assay"[All Fields]) OR "interferon gamma release assay"[All Fields]) AND ("tuberculosis"[MeSH Terms] OR "tuberculosis"[All Fields]) AND (hasabstract[text] AND ("1990/01/01"[PDAT] : "2013/12/31"[PDAT]) AND "humans"[MeSH Terms])

Samenvatting van de literatuur per zoekvraag**1. Welke condities zijn van invloed op de uitslag van een IGRA ?**

De QFT-GIT is een test op volbloed. Het aantal lymfocyten in een volbloedbloedmonster kan variëren, hetgeen kan bijdragen aan de testvariatie. De T-SPOT corrigeert voor aantallen PBMC door het monster te verdunnen op basis van een celtelling. Dit kan vooral belangrijk zijn in immuungecompromitteerde patiëntenpopulaties, waarbij lage lymfocyten aantallen de testresultaten kunnen beïnvloeden ([Karam, 2008](#); [Rangaka, 2007](#)).

Terwijl de tuberculine huidtest (THT) maar vijf meetmomenten vergt om tot een resultaat te komen (bepaling van het PPD-volume om te injecteren, de diepte van de injectie, de tijd van injectie de tijd tot aflezen en de meting van de induratie) vergt de QFT-GIT op zijn minst 126 meetmomenten tot de uitslag ([Powell, 2011](#)). Met zoveel metingen en handelingen is het makkelijker te begrijpen dat technische fouten kunnen ontstaan.

Een lage mitogen controle (<0,5 IU/ml) en verhoogde INF- γ spiegels in de Nil controle (bijv. >0,7 IU/ml) kunnen ontstaan door fouten in het productieproces. Deze invloeden vallen buiten het bestek van dit hoofdstuk. In de volgende paragrafen worden variabelen in patiënten(-populaties), tijd tot incubatie, incubatie parameters (duur en temperatuur) en overige variabelen beschreven.

Hoge Nil-waarden (4,4%), lage mitogen waarden (2,4%) en lage antigeen responsen (0,8%) komen regelmatig voor, maar worden in minder dan 25% van de gevallen opnieuw gevonden bij herhaling van de test op een nieuw bloedmonster ([Powell, 2011](#)).

Er is meer literatuur over de effecten van condities op de testprocedures bij de QFT-GIT dan bij de T-SPOT.

Conclusies	
Niveau 3	De IGRA's zijn complexe testen met veel handelingen die de testresultaten kunnen beïnvloeden.
Niveau 3	Hoge Nil-waarden, lage mitogen waarden en lage antigeen responsen komen regelmatig voor, maar worden in minder dan 25% van de gevallen opnieuw gevonden bij herhaling van de test op een nieuw bloedmonster

Overige overwegingen

Geen

Aanbevelingen
Volg de richtlijnen voor interpretatie van de fabrikant. Er zijn echter aanwijzingen dat bepalingen met te lage INF- γ metingen in de mitogen controle (<0,5 IU/ml) of verhoogde INF- γ spiegels in de Nil controle moeten worden geïnterpreteerd als indeterminate ongeacht de gemeten respons tegen de <i>M. tuberculosis</i> antigenen.

Aanbevelingen	
De werkgroep beveelt aan dat bij een patiënt zonder bekende immuunstoornis en met een indeterminate uitslag de IGRA wordt herhaald met hulp van een nieuw afgenomen bloedmonster.	
Gebruik standaardcommentaren om de aanvrager te helpen de uitslag te interpreteren	
Antigen positief	Een positieve IGRA test wijst op een doorgemaakte infectie met <i>M. tuberculosis</i> . De test is niet geschikt om actieve tuberculose aan te tonen dan wel uit te sluiten
Mitogen <0,5	In de positieve controlebuis is onvoldoende interferon-gamma productie gemeten. De IGRA kan niet worden geïnterpreteerd en dient te worden herhaald
0,2 < Antigen <0,35 IU/ml	Vanwege een testwaarde die dicht tegen het afkappunt van de test ligt, adviseert de werkgroep om bij de patiënt na 4 weken opnieuw een IGRA af te nemen in geval van een patiënt.
0,35 < Antigen <0.7 IU/ml bij serieel testen	Let op: uit meerdere studies is gebleken dat een IGRA van een gezondheidsmedewerker met een testwaarde net boven het afkappunt (>0,35 IU maar <0,7 IU) niet zonder meer als positief moet worden geïnterpreteerd. Advies: verwijzing tuberculosedeskundige

Patiëntvariabelen die de testresultaten kunnen beïnvloeden

Het is belangrijk te beseffen dat een positieve respons tegen phytohemagglutinine betekent dat er T-cellen aanwezig zijn die in staat zijn tot productie van INF- γ ; dit geeft geen uitsluitel over de respons tegen de geselecteerde *M. tuberculosis* complex specifieke antigenen, vooral niet bij immuungecompromitteerde patiënten.

In de meeste studies waarin de IGRA is verricht bij immuungecompromitteerde patiënten (zowel HIV als andere redenen van immuunsuppressie) met actieve TB zijn de resultaten niet gestratificeerd voor immuunstatus en is vergelijking met immuuncompetente individuen niet mogelijk.

In een studie naar de waarde van de T-SPOT voor de diagnose actieve tbc in HIV-patiënten waarbij wel is gestratificeerd op basis van CD4+-aantallen ([Clark, 2007](#)) was de sensitiviteit van de T-SPOT in patiënten met CD4+-aantallen/ μ l van <300, <200 en <100 respectievelijk 95,4%, 92,9% en 87,5%. De specificiteit was

100% in alle groepen. De patiëntenaantallen waren klein en toonden geen significante verschillen aan. In een Zambiaanse studie was een lage CD4+ telling bij HIV-positieve TB patiënten geassocieerd met zowel "indeterminate" resultaten als fout-negatieve resultaten ([Raby, 2008](#)).

De sensitiviteit en specificiteit van de T-SPOT voor de diagnose actieve TB bij chronische dialyse patiënten in Taiwan waren 91,7% en 64,7% ([Lai, 2009](#)). In Zuid-Korea ([Kim, 2009](#)) is de prestatie van de T-SPOT voor de diagnose extrapulmonale TB vergeleken bij immuuncompetente en immuungecompromitteerde patiënten (HIV, longkanker, levercirrhose, chronisch nierfalen en immuunsuppressieve therapie). De sensitiviteit en specificiteit (95% CI) van de T-SPOT waren 96% (87-100) en 64% (51-76%) in immunocompetente patiënten en 88% (68-97%) en 69% (51-83%) voor immuungecompromitteerde patiënten. De auteurs vonden dus geen verschil voor beide groepen ($p=0.32$). De lage specificiteit in bovenstaande studies wordt waarschijnlijk verklaard door het grote aantal personen met een LTBI, zonder actieve ziekte.

In vitro data laten zien dat de aanwezigheid van adalimumab, in concentraties die te verwachten zijn bij therapeutisch gebruik, de INF- γ concentraties op een dosis-afhankelijke wijze significant reduceren ($p < 0,05$) ([Sauzullo, 2013](#)).

Rokers uit zowel Denemarken als Tanzania hadden een lagere IFN- γ antigeen respons (mediaan 0,9 vs. 4,2 IU/ml, $p = 0,04$ en 0,4 vs. 1,6, $p < 0,01$), minder positieve (50 vs. 86%, $p = 0,03$ en 48 vs. 75%, $p < 0.01$) en meer fout-negatieve (45 vs. 0%, $p < 0,01$ en 26 vs. 11%, $p = 0,04$) QFT resultaten. In patiënten uit Tanzania liet logistische regressieanalyse gecorrigeerd voor geslacht, leeftijd, HIV-status en alcoholgebruik een associatie zien met fout-negatieve (OR 17,1, CI: 3,0-99,1, $p < 0,01$) en "indeterminate" QFT resultaten (OR 5,1 CI: 1,2-21,3 $p = 0,02$). Roken van sigaretten is dus geassocieerd met foutnegatieve en "indeterminate" IGRA resultaten in zowel hoog- als laag-endemische landen voor tuberculose onafhankelijk van HIV-status ([Aabye, 2012](#)).

Bij de periodieke screening met de THT zonder duidelijke risicomomenten voor infecties met *M. tuberculosis* zijn omslagen van negatief naar positief beschreven, die verklaard worden door "boosting". Als ex-vivo test kunnen herhaalde IGRA's elkaar niet boosten maar een THT langer dan zeven dagen voor afname van de IGRA kan dat wel ([van Zyl-Smit, 2009a](#)). Leyten et al. ([Leyten, 2007](#)) hebben dit ook in een Nederlandse studie beschreven maar geen "boosting" van de QFT-GIT gevonden bij het aflezen binnen 3 dagen na een voorafgaande THT. In enkele in het verleden THT-positieve individuen werd door de THT een pre-existente INF- γ respons opgewekt. Ook een andere studie concludeerde dat de THT de uitkomst van een latere IGRA in een THT-negatieve populatie niet beïnvloedt, maar de INF- γ respons kan "boosten"

in een populatie die wel is gesensibiliseerd tegen tuberculoseantigenen maar initieel niet gedetecteerd wordt met een IGRA ([Sauzullo, 2011](#)). Hoewel dit voornamelijk gebeurt bij IGRA-positieve individuen, kan dit ook voorkomen bij IGRA-negatieve gevallen. De THT lijkt de IGRA pas na 3 dagen te kunnen beïnvloeden en dit boosting-fenomeen kan mogelijk enkele maanden aanhouden ([van Zyl-Smit, 2009b](#)). Er is veel voor te zeggen om in geval van screening op LTBI bij immuungecompromitteerde patiënten of screening voorafgaand aan immuunsuppressieve therapie de sensitiviteit en specificiteit te optimaliseren door een combinatie van de THT en een IGRA ([Whitworth, 2012](#))

Screening op tuberculose voordat therapie met anti-TNF-alfa wordt gestart bij patiënten met reumatische ziektebeelden wordt steeds vaker toegepast. Het exacte screeningsalgoritme is controversieel. In de review van Winthrop et al. ([Winthrop, 2012](#)) bleek de meeste studies klein en de uitkomsten variabel. Het is niet duidelijk of IGRAs betere resultaten geven dan huidtesten bij deze patiënten, doch zij stellen een algoritme voor met beide testen. Zie hiervoor verder de NVALT statement (2014). Er lijkt geen significant effect op de IGRA uitslag te zijn van kinderleeftijd ([Pavić, 2011](#)), van de in vitro aanwezigheid van tuberculostatika binnen het bereik van therapeutische concentraties ([Sauzullo, 2009](#)) en hemodialyse ([Hoogewerf, 2011](#)).

Conclusies	
Niveau 2	Verschillende patiëntvariabelen op het moment van afname hebben een effect op de hoogte van de IGRA uitslag, zoals verminderd CD4+-aantal bij HIV-infectie, medicatie (corticosteroiden, TNF- α blokkers), roken en voorafgaande THT test (vanaf 3 dagen na injectie). (B)
Niveau 2	THT beïnvloedt de uitkomsten van opvolgende IGRA's niet bij niet blootgestelde individuen, maar kan een INF- γ respons boosten bij individuen gesensibiliseerd tegen <i>M. tuberculosis</i> antigenen die niet eerder met behulp van een IGRA zijn geïdentificeerd. (A2)

Overige overwegingen

Geen

Aanbevelingen

De werkgroep beveelt aan om IGRA testen in het kader van contactonderzoek of periodieke screening binnen 3 dagen na het zetten van een THT uit te voeren om "boosting" te voorkomen.

Bij screening op LTBI bij immuungecompromitteerde patiënten of screening voorafgaand aan immuunsuppressieve therapie kan worden overwogen om een IGRA meer dan 3 dagen na een THT af te nemen om de sensitiviteit te verhogen.

Conditie tot incubatie in het laboratorium

De fabrikant van de QFT-GIT beveelt aan om de testbuizen zo snel mogelijk, maar uiterlijk binnen 16 uur na afname te incuberen bij 37 °C. Tot incubatie dienen de buizen te worden bewaard bij kamertempertuur.

Een vertraging van zes en twaalf uur veroorzaakt in respectievelijk 19% (5/26) en 22% (5/23) fout-negatieve testresultaten ([Doberne, 2011](#)). Deze verschillen benadrukken de noodzaak tot standaardisatie van het preanalytisch proces van de Quantiferon. Soortgelijke uitkomsten zijn gevonden in studies waarbij een vertraging van een tot vier uur tot incubatie leidde tot een significant lager aantal INF- γ producerende cellen. ([Doherty, 2005](#); [Hanekom, 2004](#); [Smith, 2009](#)). Onmiddellijke incubatie heeft ook een positieve invloed op de INF- γ waarde in de mitogen controlebuis en resulteert daarom in een lager aantal indeterminate uitslagen ([Herrera, 2010](#); [Shanaube, 2010](#)). Vertraging in incubatie van zes en twaalf uur leidde in respectievelijk 10% (2/20, $p=0,10$) en 17,1% (7/41, $p=0,01$) van de testen tot indeterminate resultaten. Deze toename van indeterminate resultaten was direct het gevolg van een afname van gemiddelde waarden voor de mitogen-Nil bij vertraagde incubatie voor zes uur ($p=0,004$) en twaalf uur ($p<0,001$). ([Herrera, 2010](#))

Snelle incubatie kan worden gerealiseerd door een incubator op de afnamelocatie of een mobiele incubator. Recentelijk is de toepassing van een draadloze en draagbare incubator geëvalueerd voor QFT-GIT bloedbuizen ([Dominguez, 2010](#)).

In een studie met 158 deelnemers hadden patiënten met een bloedafname in de avond vaker een positieve QFT-GIT dan patiënten met een bloedafname in de ochtend ($p=0,06$). De respons tegen *M. tuberculosis*-antigenen was significant hoger ($p=0,006$) bij bloedafname in de avond, vergeleken met de ochtend ([Mazurek, 2012](#)).

Volgens de handleiding van de fabrikant is de standaard QFT-GIT Vacutainer gekalibreerd om tussen de 0.8 en 1.2 ml bloed op te nemen tussen zeeniveau en 1000m hoogte. In een studie van Gaur et al. ([Gaur, 2013](#)) bleek het gemiddelde bloedvolume

bij 30 patiënten voor de Nil buis 0,923 ml (0,785-1,0 ml, coëfficiënt of variation 5,8%) en voor de TB-antigenbuis 0,930ml (0,810-1,010ml, CV 4,7%). De gemiddelde IFN- γ TB respons (TB antigen minus negatieve controle) bleek significant hoger indien alle QFT-GIT buisjes waren gevuld met 0,8 ml bloed (1,04 IU/ml) vergeleken met 1,0 ml (0,85 IU/ml; $P=0,002$) of 1,2 ml (0,49 IU/ml; $P<0,001$) bij patiënten met LTBI. Vergeleken met 0,8 ml (11,8%), was er een groter aantal fout-negatieve resultaten met 1,0 ml (29,4%; $P=0,2$) en 1,2 ml (41,2%; $P=0,05$). Bij niet-geïnfecteerde controles had bloedvolume geen effect op het aantal positieve IGRAs.

Door schudden met behulp van een vortexmixer versus handmatig schudden direct na afname van de testbuizen daalde het aantal indeterminate resultaten significant ($p=0,02$) van 11% (168/1528) naar 7,9% (61/773) ([Miranda, 2009](#)).

In vergelijking met zwenken volgens de handleiding van de fabrikant van QFT-GIT buizen, was na 10 seconden handmatig schudden de gemiddelde INF- γ resultaten verhoogd in de negatieve controle (0,04 versus 0,06 IU/ml; $P<0,001$) en TB-antigeenbuis (0,12 versus 0,24 IU/ml; $P=0,004$). Het aantal positieve IGRAs was niet significant verschillend tussen zwenken (32,5%) en hard schudden (35%). Verschil in zwenken of schudden tussen de negatieve controle en TB-antigeenbuis had een significant effect op het aantal positieve IGRAs ([Gaur, 2013](#)).

Conclusies	
Niveau 1	Een vertraging tot incubatie van langer dan 4 uur na afname heeft een significant nadelig effect zowel op de TB-antigeentest als de positieve controle met als gevolg een grotere testvariatie en een hoger percentage indeterminate uitslagen (A2)
Niveau 3	Een bloedafname in de avond leidt tot een hogere percentage positieve uitslagen van de QFT-GIT dan een bloedafname de volgende ochtend bij dezelfde patiënten (B)
Niveau 3	QFT-GIT bloedbuizen gevuld met 0,8 ml bloed gaf de hoogste proportie positieve uitslagen in vergelijking met andere volumina (A2)
Niveau 3	het gebruik van een vortexmixer of krachtig schudden leidt tot een significante reductie van indeterminate uitslagen (B)

Overige overwegingen

Geen

Aanbevelingen

De werkgroep geeft ter overweging om QFT-GIT buizen direct na afname te incuberen om het percentage indeterminate uitslagen te minimaliseren. De werkgroep beveelt aan om samples waarbij meer dan 16 uur verstreken is tussen afname en start incubatie in principe niet te analyseren.

De werkgroep geeft ter overweging om in geval van verzending van een QFT-GIT naar een extern laboratorium bij een langere transporttijd dan 4 uur tot incubatie de QFT-GIT buizen decentraal te incuberen.

De werkgroep geeft ter overweging om de QFT-GIT buizen voor incubatie krachtig te schudden en waar mogelijk een vortex mixer te gebruiken.

Incubatiecondities

Een Nederlandse studie onder proefpersonen met een meer of minder recente THT omslag tijdens contactonderzoek of screening van hoog-risico groepen, laat zien dat in vergelijking met een zesdaagse incubatie, van een PBMC celweek, incubatie overnacht van de QFT-GIT en ELISPOT minder positieve testen oplevert ([Leyten, 2007a](#)). Dit wordt bevestigd door het onderzoek van Sauzullo ([Sauzullo, 2009](#)). Uit de resultaten blijkt dat de immuunrespons tegen elk van de antigenen significant hoger was na zes dagen incubatie dan na incubatie overnacht ($p= 0,004$ voor rRD1 en $p= 0,005$ voor PPD). Recent is het verschil in INF- γ respons met de QFT-GIT na 16, 20 of 24 uur niet significant gebleken ([Gaur, 2013](#)). Dit suggereert dat dit verschil niet na uren maar pas na dagen tot uiting komt.

Door de incubatietemperatuur te verhogen naar 39°C waren IFN- γ en IP-10 waarden bij tuberculosepatiënten respectievelijk 4,1- en 3,4-voudig verhoogd ten opzichte van incubatie bij 37°C ($P < 0,001$) ([Aabye, 2011](#)). Deze onbevestigde resultaten suggereren dat incubatie bij 39°C de immuunrespons na antigeenstimulatie en het aantal positieve testresultaten verhoogd.

Volgens de handleiding van de fabrikant kan de QFT-GIT direct na stimulatie met de *M. tuberculosis* antigenen worden uitgevoerd of met bewaard plasma (bij 4°C tot 1 maand of bij -80°C gedurende een langere tijdsperiode, niet gespecificeerd). Het is onderzocht dat deze uitgestelde bepaling de testresultaten niet significant beïnvloeden ([Detjen, 2009](#)). Dit komt overeen met de resultaten van een andere studie waarbij met één week tussentijd monsters zijn getest die bij 4°C werden bewaard ([Veerapathran, 2008](#)).

Conclusies	
Niveau 3	Incubatie bij 39 graden versus 37 graden geeft mogelijk hogere TB-antigeenuitslagen (B)
Niveau 2	Het opslaan van geïncubeerd plasma bij 4 graden tot 1 week heeft geen significant nadelig effect op de testwaarden ten opzichte van direct testen (A2)

Overige overwegingen

Geen

Aanbevelingen
De werkgroep beveelt aan om de instructies van de fabrikant over de incubatieduur te volgen.
Het dagelijks beoordelen van de temperatuurregistratie van de incubatiestof en het afkeuren van testen met een waarde $0,2 < x < 0,7$ IU/ml indien de temperatuur te laag is geweest.
De werkgroep beveelt aan om de instructies van de fabrikant over de opslagduur en -omstandigheden te volgen.

Overige condities

Hoewel het precieze mechanisme achter de afname van betrouwbare resultaten door vertraging in incubatie niet is opgehelderd, hebben verschillende onderzoekers het gebruik van een T-cel stabilisator (T-cell Xtend TM) geëvalueerd voor verlengde houdbaarheid (tot 48 uur bij kamertemperatuur) van gehepariniseerd volbloed voor de T-spot.TB ([Lenders, 2010](#); [Wang, 2010](#); [Bouwman, 2012](#); [Wang, 2012](#); [Talbot, 2012](#)). Dit blijkt mogelijk zonder significant verlies van sensitiviteit en leidt tot een reductie van "indeterminate" uitslagen.

Conclusie	
Niveau 1	T-cell Xtend maakt verlenging van de tijd tot incubatie van de T-SPOT.TB test mogelijk tot 48 uur zonder verlies van sensitiviteit en met een reductie van "indeterminate" uitslagen (A2)

Overige overwegingen

Geen

Aanbeveling

De werkgroep beveelt aan bij een transportduur tot incubatie van 8-48 uur T-cell Xtend te gebruiken voor de T-SPOT.TB.

2. Wat is de testvariatie van de IGRA?

De handleidingen van beide IGRA's geven geen informatie over de variatie van een positieve respons, vooral rondom de afkapwaarde. De testvariatie is een combinatie van de "repeatability" (het herhalen van de test op hetzelfde monster in hetzelfde laboratorium onder identieke omstandigheden), de "reproducibility" (herhalen van de test op hetzelfde monster in een ander laboratorium) en de "within-person variability" (het herhalen van de test bij één persoon op verschillende momenten). De testvariatie zou volgens de literatuur niet groter moeten zijn dan 20% voor elk type immunoassay. ([Lock, 2006](#)).

Repeatability

IGRA testen zijn ontworpen als eenmalige individuele testen en lenen zich derhalve slecht voor een evaluatie van het herhalen van dezelfde test op hetzelfde monster in hetzelfde laboratorium onder identieke omstandigheden. Dit geldt ook voor het herhalen van de test op hetzelfde monster in een ander laboratorium. De gegevens zoals aangeleverd door de fabrikant aan de Federal Drug Administration (FDA) vertonen een hoge "repeatability"; de coefficient of variation (CV) was slechts 8% ([Celles-tis, 2006](#)). Veerapathan ([Veerapathan, 2008](#)) vond een uitstekende overeenkomst in dichotome testresultaten (pos-neg) tussen twee testen die op dezelfde afnames waren uitgevoerd: van 54 van de 56 monsters kwamen de hertest resultaten overeen ($k=0,94$). Discordantie werd voornamelijk gevonden in waarden rond de cutoff. Hierbij werden zowel afnames als toenames geconstateerd. Als naar de absolute waarden werd gekeken, bleek er een tendens van hogere INF- γ uitslagen in de hertest dan in het originele monster te bestaan. Personen met een negatieve QFT-GIT uitslag bleven over het algemeen negatief, terwijl bij de positieve resultaten meer variatie over de tijd werd waargenomen.

Testvariatie is nog recenter beschreven voor de GFT-GIT. Men vond wederom een CV van 8% discordante uitslagen bij herhalen van de QFT-GIT op hetzelfde mon-

ster onder identieke omstandigheden ("repeatability") en variatie in uitslagen tot +/- 0,24 IU/ml in het "grijze gebied" tussen 0,25-0,80 IU/ml en +/- 0,60 IU/ml voor alle testresultaten. Kortom, wederom dichotome omslagen positief naar negatief of omgekeerd voornamelijk rond het afkappunt van 0,35 IU/ml. De auteurs concluderen dat "positieve" QFT-GIT uitslagen tussen 0,35-0,60 IU/ml bij enkelvoudige testen kritisch moeten worden beoordeeld ([Metcalf, 2013](#)).

Reproducibility

Whitworth et al. ([Whitworth, 2012](#)) vonden een CV van 7,7% discordantie bij her-testen van het zelfde monster in verschillende laboratoria. Een grotere variabiliteit tussen verschillende laboratoria was geassocieerd met handmatige data invoer en hogere IFN- γ waarden. Handmatige invoer van gegevens zou volgens deze auteurs moeten worden vermeden. Een strikte naleving van de standard operation procedures (SOP) leidde volgens Tuuminen ([Tuuminen, 2010](#)) tot een verbetering van de testvariatie. De totale onnauwkeurigheid van T-SPOT en op ELISA gebaseerde IGRAs was maximaal 37,8% voor de monsters met matige en hoge reactiviteit. Analytische fouten door variabiliteit in aflezers tussen verschillende laboratoria is eveneens onderzocht in Nederlands onderzoek en hieruit bleek het vooral een probleem van de T-SPOT.TB en niet zozeer van de GFT-GIT ([Franken, 2009](#)).

Within-person variability

In de literatuur is wel veel informatie voorhanden over het herhalen van de test bij één persoon op verschillende momenten. Hieronder volgt een overzicht uit de literatuur en de conclusies en aanbevelingen hieruit. Grotere test variatie kan worden verwacht bij verschillende batches van testen en reagentia, verschillend personeel, instrumenten en laboratoria en bij serieel testen bij grotere verschillen in tijdstippen. Deze uitkomsten worden gesteund door eerder onderzoek (A2; [Pai, 2006](#), [van Zyl-Smit, 2009a](#), [Herrmann, 2009](#), [Ringshausen, 2011](#)).

Bij de introductie van de QFT-GIT in Vietnam is een grote within-person variability aangetoond die significant geassocieerd bleek met zowel de persoon die bloed afnam als de analist die de test uitvoerde. Na een interventie, die bestond uit:

1. herzien van alle procedures van bloedafname en ELISA-test,
2. herzien en aanscherpen van standaard procedures,
3. nazien van de ELISA-machines,
4. ontwikkeling van een checklist voor controle,

was de "within-person variability" significant afgenomen ($P < 0,0001$) en de foutvariatie niet langer afhankelijk van het laboratoriumpersoneel. ([Hang, 2009](#)).

Totale Testvariatie

Bij serieel uitvoeren van IGRA testen kunnen interpretatie-problemen vooral optreden bij uitslagen rond de afkapwaarde. In een grote studie met 8 seriële IGRA testen in minder dan 3 maanden, gecombineerd met een THT, beschreven Van Zyl-Smit et al ([van Zyl-Smit, 2009a](#)) het fenomeen van "zwabberen rond het afkappunt" ("wobbling around the cutoff"), dat wil zeggen het optreden van "spontane" of "test-inherente" conversies en reversies. Hierdoor lijkt er een grijs gebied rond het afkappunt te bestaan (de "borderline" of "uncertainty" zone) waarin door spontane variatie de interpretatie van de IGRA uitslagen is bemoeilijkt. Dit grijze gebied wordt vaak gedefinieerd als tussen 0,20 IU/ml en 0,70 IU/ml ([Ringshausen, 2010](#); [Schablon, 2010](#) [Torres Costa, 2011](#); [Fong, 2012](#)). De conversies en reversies lijken vaker op te treden bij de IGRA vergeleken met de THT en er zijn verschillende verklaring gesuggereerd:

1. de T-"effector" cellen van de IGRA zouden gevoeliger zijn voor variatie dan de T-"memory" cellen van de THT,
2. variatie in laboratorium en test procedures (bijvoorbeeld tijd tot incubatie),
3. spontane eliminatie van de LTBI of
4. cyclische expressie in tijd van antigenen door *M. tuberculosis* ([Pai, 2007](#)).

Hoe dienen periodieke IGRA uitslagen te worden geïnterpreteerd in dit grijze gebied? Allereerst is er de discussie wat een "LTBI" eigenlijk is. Het is op zijn best een "blijvende *M. tuberculosis* immuun respons" en niet noodzakelijk een echte latente infectie met levende micro-organismen en het potentiële risico om de ziekte tuberculose te ontwikkelen ([Schablon, 2010](#)). Vervolgens komt de vraag dat wanneer herhaalde IGRA uitslagen instabiel kunnen zijn wat dan de definitie van een IGRA conversie en IGRA reversie is. Pai et al. ([Pai, 2006](#)) beschrijven dat conversie van < 0,20 IU/ml naar > 0,50 IU/ml het best past bij een "echte" LTBI. Andere auteurs hanteren dezelfde ondergrens maar stellen dan weer dat conversie van < 0,20 IU/ml naar > 0,70 IU/ml het best past bij een "echte" LTBI bij gezondheidswerkers ([Torres Costa, 2010](#)). Ook de door de fabrikant vastgestelde ondergrens wordt beschreven in de literatuur: conversie van < 0,35 IU/ml naar > 0,70 IU/ml past het best bij een "echte" LTBI ([van Zyl-Smit, 2009a](#); [Ringshausen, 2010](#)). Sommige auteurs stellen al dat een waarde van > 1,0 IU/ml is suggestief voor "echte" LTBI bij gezondheidswerkers ([Fong, 2012](#)). Hoge IGRA waarden zouden een betere positief voorspellende waarde hebben voor progressie van LTBI naar de ziekte tuberculose ([Andersen, 2007](#); [Diel, 2008](#)).

Een recente studie onder 9.153 gezondheidswerkers in de Verenigde Staten concludeerde dat het afkappunt van 0,35 IU/ml tot een overschatting van het aantal conversies leidt. Om een vergelijkbare proportie omslagen te krijgen als in het verleden met de THT zou de cutoff significant opgehoogd dienen te worden, tot wellicht

5,3 IU/ml ([Slater, 2013](#)). Het verhogen van het afkappunt zal de sensitiviteit voor de detectie van werkelijk geïnfekteerde patiënten verlagen, maar dit moet worden gezien in de context van een kans om ziek te worden na een LTBI van ten hoogste 10% bij immunocompetente gezondheidswerkers. Tenslotte wordt voorgesteld om voor IGRA uitslagen een risicostratificatie met betrekking tot het afkappunt te gebruiken in analogie aan de THT waar voor hoog, gemiddeld en laag risico respectievelijk afkappunten van 5mm, 10mm en 15 mm werden gehanteerd ([Mancuso, 2013](#)). Recent is een samenvatting verschenen van een meeting in Atlanta van een groep Amerikaanse experts over de variatie rond het afkappunt bij de toepassing van seriële IGRA testen ([Daley, 2013](#)). Er bestaat grote behoefte aan nationale richtlijnen om de onverwacht grote hoeveelheid positieve IGRA resultaten bij serieel testen in laag-risico populaties goed te begeleiden en effectief te onderscheiden van recent geïnfekteerde personen. Onlangs is in Nederland een richtlijn verschenen met betrekking tot het screenen van ziekenhuismedewerkers, maar deze behandelt met name de indicatiestelling voor periodiek onderzoek op LTBI. In het NVMM Tijdschrift voor Medische Microbiologie zijn de controversen rondom screening van gezondheidswerkers nog recenter beschreven ([van Hest, 2014](#)).

Conclusies	
Niveau 3	Manuale dataverhandeling is geassocieerd met grotere interlaboratoriumvariabiliteit (reproducability)
Niveau 3	Het is aangetoond dat zowel analisten als testprocedure significant bijdragen aan "within-person variability"
Niveau 1	Er bestaan nog steeds controversen bij de interpretatie van resultaten rondom de afkapwaarde van de screening op LTBI. Verder onderzoek naar de betekenis van conversies en reversies van de IGRAs, in het bijzonder testuitslagen rond het afkappunt, is noodzakelijk.

Overige overwegingen

Geen

Aanbevelingen

De werkgroep beveelt aan patiëntgegevens, testprocedures en uitslagverwerking te automatiseren.

De werkgroep beveelt aan om alleen met daarvoor aangewezen en geautoriseerde analisten een IGRA uit te voeren, stringent standaardprocedures na te leven en checklijsten aan te leggen.

De werkgroep beveelt aan bij serieel testen in immuuncompetente volwassenen op basis van de huidige literatuur het gebied van 0,20 IU/ml tot 0,70 IU/ml in de QTF-GIT als grijs gebied te beschouwen waarbij rekening dient te worden gehouden met mogelijke spontane conversie en reversie.

3. Is vermelding kwantitatieve uitslagen van meerwaarde?

De IGRA richtlijn van de Centers for Disease Control and Prevention Guidelines wordt aanbevolen dat klinische laboratoria naast kwalitatieve uitslagen ook kwantitatieve uitslagen doorgeven ([Mazurek, 2010](#)). Een alternatief is om alleen kwantitatieve IGRA resultaten door te geven zoals gebruikelijk bij de THT. Dit voorkomt de interpretatie van de uitslag volgens algoritmen zonder daarbij de klinische context te overwegen. Uit bovenstaande blijkt dat de interpretatie van IGRA uitslagen bij periodieke screening van gezondheidswerkers moet worden voorbehouden aan een (beperkte) groep deskundigen met specifieke expertise met deze materie. Dit geldt overigens ook voor het gebruik van IGRA bij contactonderzoek bij jonge kinderen (< 5 jaar oud), pre-TNF-alfa blokkerende medicatie screening of pre-organtransplantatie screening. In deze (klinische) context dient geen "uncertainty zone" te worden gehanteerd en wordt "boosting" juist gestimuleerd om tot een maximale sensitiviteit van het onderzoek te komen.

Bij elke uitslag moet de mogelijkheid van overleg met een inhoudsdeskundige op het gebied van IGRA en interpretatie van uitslagen worden geboden. Dit kan iemand op het uitvoerende lab zijn, die evt doorverwijst naar een 'IGRA consulent' binnen of buiten de instelling.

Conclusie

Niveau 4

Het doorgeven van kwantitatieve uitslagen naast kwalitatieve uitslagen kan voor betere interpretaties leiden.

Overige overwegingen

Geen

Aanbeveling

Laboratoria dienen een volledige IGRA uitslag te geven aan de aanvrager, dat wil zeggen de absolute uitslag in IU/ml en niet alleen "positief" of "negatief", waarbij in geval van mogelijke immunestoornissen de uitslag van de mitogenbuis bijdragend is.

Referenties

Aabye MG, Hermansen TS, Ruhwald M, Praygod G, Faurholt-Jepsen D, Jeremiah K, Faurholt-Jepsen M, Range N, Friis H, Chagalucha J, Andersen AB, Ravn P. Negative effect of smoking on the performance of the QuantiFERON TB gold in tube test. *BMC Infect Dis.* 2012 Dec 27;12:379. doi: 10.1186/1471-2334-12-379.

Aabye MG, Ravn P, Johansen IS, Eugen-Olsen J, Ruhwald M. Incubation of whole blood at 39°C augments gamma interferon (IFN- γ)-induced protein 10 and IFN- γ responses to Mycobacterium tuberculosis antigens. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Jul;18(7):1150-6. doi: 10.1128/CVI.00051-11. Epub 2011 May 25.

Andersen P, Doherty TM, Pai M, Weldingh K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med.* 2007 May;13(5):175-82. Epub 2007 Apr 5. Review.

Arend, SM, de Haas, P, Leyten, E, Rosenkrands, I, Rigouts, L, Andersen, P, Mijs, W, van Dissel, JT, van Soolingen, D. ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of Mycobacterium kansasii. *J Infect Dis* 191, 2005; 1301-1310.

Baussano I et al. Tuberculosis among health care workers. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:488-494

Bouwman JJ, Thijsen SF, Bossink AW. Improving the timeframe between blood collection and interferon gamma release assay using T-Cell Xtend®. *J Infect.* 2012 Feb;64(2):197-203. doi: 10.1016/j.jinf.2011.10.017. Epub 2011 Nov 18.

Cellestis. Validation report QuantiFERON-TB Gold In-Tube: reproducibility study. 2006. Available from: <http://www.cellestis.com/IRM/Company/ShowPage.aspx/PDFs/1359-1000000/ValidationReportQFTInTubeReproducibilityStudy>

Cellestis. Carnegie, Victoria, Australia: c2007. QuantiFERON-TB Gold In-Tube Results Interpretation Guide. Available from: <http://www.cellestis.com/IRM/Company/ShowPage.aspx?CPID=1215>

Clark SA, Martin SL, Pozniak A, et al. Tuberculosis antigen-specific immune responses can be detected using enzyme-linked immunospot technology in human immunodeficiency virus (HIV)-1 patients with advanced disease. *Clin Exp Immunol* 2007;150:238-44.

Daley et al. A summary of meeting proceedings on addressing variability around the cut point in serial interferon- γ release assay testing. *Infect control Hosp Epidemiol* 2013; 34 (6): 625-630

Referenties

Detjen AK, Loebenberg L, Grewal HM, Stanley K, Gutschmidt A, Kruger C, Du Plessis N, Kidd M, Beyers N, Walzl G, Hesselning AC. Short-term reproducibility of a commercial interferon gamma release assay. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Aug;16(8):1170-5. doi: 10.1128/CVI.00168-09. Epub 2009 Jun 17.

Diel R, Goletti D, Ferrara G, Bothamley G, Cirillo D, Kampmann B, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis. *Eur Respir J.* 2011 Jan;37(1):88-99.

Diel R et al. Predictive value of a whole blood IFN-gamma assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with Mycobacterium tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:1164-70.

Diel R, Loddenkemper R, Nienhaus A. Evidence-based comparison of commercial interferon-gamma release assays for detecting active TB: a metaanalysis. *Chest.* 2010 Apr;137(4):952-68. doi: 10.1378/chest.09-2350. Epub 2009 Dec 18. Review.

Doberne D, Gaur RL, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. *J Clin Microbiol.* 2011 Aug;49(8):3061-4. doi: 10.1128/JCM.01136-11. Epub 2011 Jun 22.

Doherty, T M, et al. Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to Mycobacterium tuberculosis in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J. Immunol. Methods* 2005; 298:129–141.

Dominguez, M, et al. The MIT D-lab electricity-free PortaTherm incubator for remote testing with the QuantiFERON(R)-TB Gold In-Tube assay. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 2010; 14:1468–1474.

Fong KS, Tomford JW, Teixeira L, Fraser TG, van Duin D, Yen Lieberman B, Gordon SM, Miranda C. Challenges of interferon- γ release assay conversions in serial testing of health-care workers in a TB control program. *Chest* 2012;142:55-62.

Franken WP, Thijsen S, Wolterbeek R, Bouwman JJ, el Bannoudi H, Kik SV, van Dissel JT, Arend SM. Variation in T-SPOT-TB spot interpretation between independent observers from different laboratories. *Clin. Vaccine Immunol.* 16:1439–1442. 2009; <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.00456-08>.

Gaur RL, Pai M, Banaei N. Impact of blood volume, tube shaking, and incubation time on reproducibility of QuantiFERON-TB gold in-tube assay. *J Clin Microbiol.* 2013 Nov;51(11):3521-6. doi: 10.1128/JCM.01627-13. Epub 2013 Aug 21.

Referenties

Hanekom, WA, et al. Novel application of a whole blood intracellular cytokine detection assay to quantitate specific T-cell frequency in field studies. *J. Immunol. Methods* 2004; 291:185–195.

Hang N, Ishizuka N, Keicho N, et al. Quality assessment of an interferon-gamma release assay for tuberculosis infection in a resource-limited setting. *BMC Infect Dis* 2009; 9: 66.19

Herrmann JL, Belloy M, Porcher R, Simonney N, Aboutaam R, Lebourgeois M, Gaudelus J, De Losangeles L, Chadelat K, Scheinmann P, et al. Temporal dynamics of interferon gamma responses in children evaluated for tuberculosis. *PLoS ONE* 2009;4:e4130.

Herrera V, Yeh E, Murphy k, Parsonnet J, Banaei N. Immediate incubation reduces indeterminate results for QuantiFERON-TB Gold in-tube assay. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48:2672–2676.

van Hest R, Mulder B. Controversen bij de screening op Tuberculose bij laboratoriumpersoneel en andere werkers in de gezondheidszorg. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2014, 22, nr 2.

Hoogewerf M, Boland GJ, Hoepelman AI, Boer WH, Mudrikova T. No influence of haemodialysis on interferon production in the QuantiFERON-TB Gold-In-Tube test. *J Nephrol.* 2011 Sep-Oct;24(5):625-30. doi: 10.5301/JN.2011.6325.

van Ingen J, de Zwaan R, Dekhuijzen R, Boeree M, van Soolingen D. Region of difference 1 in nontuberculous Mycobacterium species adds a phylogenetic and taxonomical character. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5865-7. doi: 10.1128/JB.00683-09. Epub 2009 Jul 17.

Leussenkamp R, Akkerman O, Van der Valk P, Toumanian S., Van der Zanden A, Mulder B. Use of Quantiferon assay in *M. tuberculosis* infection and adaptation of cutoff value. *IUATLD 2009 Conference abstract.*

Karam F, Mbow F, Fletcher H, Senghor CS, Coulibaly KD, LeFevre AM, Ngom Gueye NF, Dieye T, Sow PS, Mboup S, Lienhardt C. Sensitivity of IFN- γ release assay to detect latent tuberculosis infection is retained in HIV-infected patients but dependent on HIV/AIDS progression. *PLoS ONE* 2008; 3:e1441.

Kim SH, Song KH, Choi SJ, et al. Diagnostic usefulness of a T-cell-based assay for extrapulmonary tuberculosis in immunocompromised patients. *Am J Med* 2009;122:189-95.

Referenties

Lai CC, Tan CK, Liao CH, Chou CH, Huang YT, Hsueh PR. Diagnosis of pulmonary tuberculosis among dialysis patients by enzyme-linked immunospot assay for interferon-gamma. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2605-6.

Lenders LM, Meldau R, van Zyl-Smit RN, Woodburne V, Maredza A, Cashmore TJ, Semple PL, Badri M, Zumla A, Dheda K. Comparison of same day versus delayed enumeration of TB-specific T cell responses. *J Infect.* 2010 May;60(5):344-50. doi: 10.1016/j.jinf.2010.01.012. Epub 2010 Feb 10.

Leyten EM, Arend SM, Prins C, Cobelens FG, Ottenhoff TH, van Dissel JT. Discrepancy between Mycobacterium tuberculosis-specific gamma interferon release assays using short and prolonged in vitro incubation. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Jul;14(7):880-5. Epub 2007 May 16. 2007a

Leyten EM et al. Effect of tuberculin skin testing on a Mycobacterium tuberculosis specific interferon gamma assay. *Eur Respir J* 2007;29:1212-16 2007b

Lock RJ. My approach to internal quality control in a clinical immunology laboratory. *J Clin Pathol* 2006, 59:681- 684.

Mazurek GH, Jereb J, Vernon A, LoBue P, Goldberg S, Castro K. Updated guidelines for using interferon gamma release assays to detect Mycobacterium tuberculosis infection—United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep* 2010;59:1–25.

Mazurek GH, Whitworth WC, Goodwin DJ. Effect of blood collection time on QuantiFERON-TB Gold In-Tube test variability, pA4735, C61. 2012. In Immunodiagnosics for latent tuberculosis infection and tuberculosis. American Thoracic Society, New York, NY.

Menzies D et al. Risk of tuberculosis infection and disease associated with work in health care settings. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11:593-605

Metcalfe et al. Test variability of the Quantiferon-TB Gold In-Tube Assay in clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:206-11

Miranda C, et al. Reducing the rates of indeterminate results of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube test during routine preemployment screening for latent tuberculosis infection among healthcare personnel. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30:296-8.

Oxford Immunotec. T-SPOT.TB technical handbook. Abingdon, UK: Oxford Immunotec; 2009. Available from: <http://www.oxfordimmunotec.com/UK%20Technical%20Handbook>.

Referenties

Pai M, et al. Serial Testing of Health Care Workers for Tuberculosis Using Interferon- γ Assay", *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2006; 174: 349-355.

Pai et al. Serial testing of tuberculosis: can we make sense of T-cell assay conversions and reversions? *Plos One* 2007;4:e208.

Pavić I, Topić RZ, Raos M, Aberle N, Dodig S. Interferon- γ release assay for the diagnosis of latent tuberculosis in children younger than 5 years of age. *Pediatr Infect Dis J.* 2011 Oct;30(10):866-70. doi: 10.1097/INF.0b013e318220c52a.

Powell RD 3rd, Whitworth WC, Bernardo J, Moonan PK, Mazurek GH. Unusual interferon gamma measurements with QuantiFERON-TB Gold and QuantiFERON-TB Gold In-Tube tests. *PLoS One.* 2011;6(6):e20061.

Raby E, Moyo M, Devendra A, Banda J, De Haas P, Ayles H, Godfrey-Faussett P. The effects of HIV on the sensitivity of a whole blood IFN-gamma release assay in Zambian adults with active tuberculosis. *PLoS One.* 2008 Jun 18;3(6):e2489. doi: 10.1371/journal.pone.0002489.

Ringshausen F et al. Predictors of persistently positive Mycobacterium-tuberculosis-specific interferon-gamma responses in the serial testing of health care workers. *BMC Infect Dis*, 2010; 10:220

Ringshausen FC, Nienhaus A, Torres Costa J, Knoop H, Schlosser S, Schultze-Werninghaus G, Rohde G. Within-subject variability of Mycobacterium tuberculosis-specific gamma interferon responses in German health care workers. *Clin Vaccine Immunol* 2011;18:1176-1182.

Rangaka MX, Diwakar L, Seldon R, van Cutsem G, Meintjes GA, Corroni D, Mouton P, Shey MS, Maartens G, Wilkinson KA, Wilkinson RJ. Clinical, immunological, and epidemiological importance of antituberculosis T cell responses in HIV-infected Africans. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44:1639-1646.

Sauzullo I, Mengoni F, Lichtner M, Massetti AP, Rossi R, Iannetta M, Marocco R, Del Borgo C, Soscia F, Vullo V, Mastroianni CM. In vivo and in vitro effects of antituberculosis treatment on mycobacterial interferon-gamma T cell response. *PLoS One.* 2009;4(4):e5187. doi: 10.1371/journal.pone.0005187. Epub 2009 Apr 13.

Referenties

Sauzullo I, Massetti AP, Mengoni F, Rossi R, Lichtner M, Ajassa C, Vullo V, Mastroianni CM. Influence of previous tuberculin skin test on serial IFN- γ release assays. *Tuberculosis (Edinb)*. 2011 Jul;91(4):322-6. doi: 10.1016/j.tube.2011.05.004. Epub 2011 Jun 12.

Sauzullo I, Mengoni F, Marocco R, Potenza C, Skroza N, Tieghi T, Lichtner M, Vullo V, Mastroianni CM. Interferon- γ release assay for tuberculosis in patients with psoriasis treated with tumour necrosis factor antagonists: in vivo and in vitro analysis. *Br J Dermatol*. 2013 Nov;169(5):1133-40. doi: 10.1111/bjd.12544.)

Schablon et al. Serial testing with an interferon- γ release assay in German health-care workers. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär* 2010;5:1-8

Slater ML et al. Challenges with QuantiFERON-TB Gold assay for large-scale, routine screening of U.S. healthcare workers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:1005-10.

Shanaube K et al. Intra-assay reliability and robustness of Quanti-FERON(R)-TB Gold In-Tube test in Zambia. *Int. J. Tuberc. Lung Dis*. 2010; 14:828-833

Smith SG, et al. Identification of major factors influencing ELISpotbased monitoring of cellular responses to antigens from Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One* 2009; 4:e7972.

Talbot EA, Maro I, Ferguson K, Adams LV, Mtei L, Matee M, von Reyn CF. Maintenance of Sensitivity of the T-SPOT-TB Assay after Overnight Storage of Blood Samples, Dar es Salaam, Tanzania. *Tuberc Res Treat*. 2012;2012:345290. doi: 10.1155/2012/345290. Epub 2012 Feb 6.

Torres Costa J et al. Comparison of interferon- γ release assay and tuberculin test for screening in healthcare workers. *Revista Portuguesa de Pneumologia*: 2010;16:211-21

Torres Costa J et al. Screening for tuberculosis and prediction of disease in Portuguese healthcare workers. *Int Arch Occup Environ Health*, 2011; 6:19

Tuuminen T, Tavast E, Väisänen R, Himberg JJ, Seppälä I. Assessment of Imprecision in gamma interferon release assays for the detection of exposure to Mycobacterium tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Apr;17(4):596-601. doi: 10.1128/CVI.00320-09. Epub 2010 Feb 24.

Referenties

Veerapathran A1, Joshi R, Goswami K, Dogra S, Moodie EE, Reddy MV, Kalantri S, Schwartzman K, Behr MA, Menzies D, Pai M. T-cell assays for tuberculosis infection: deriving cut-offs for conversions using reproducibility data. *PLoS One*. 2008 Mar 26;3(3):e1850. doi: 10.1371/journal.pone.0001850.

Wang, SH et al. Evaluation of a modified interferon-gamma release assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in adult and paediatric populations that enables delayed processing. *Scand. J. Infect. Dis.* 4 2010; 2:845–850.

Wang SH, Stew SS, Cyktor J, Carruthers B, Turner J, Restrepo BI. Validation of increased blood storage times with the T-SPOT.TB assay with T-Cell Xtend reagent in individuals with different tuberculosis risk factors. *J Clin Microbiol.* 2012 Jul;50(7):2469-71. doi: 10.1128/JCM.00674-12. Epub 2012 Apr 18.

Whitworth WC, Hamilton LR, Goodwin DJ, Barrera C, West KB, Racster L, Daniels LJ, Chuke SO, Campbell BH, Bohanon J, Jaffar AT, Drane W, Maserang D, Mazurek GH. Within-subject interlaboratory variability of QuantiFERON-TB gold in-tube tests. *PLoS One*. 2012;7(9):e43790. doi: 10.1371/journal.pone.0043790. Epub 2012 Sep 6.

Winthrop KL, Weinblatt ME, Daley CL. You can't always get what you want, but if you try sometimes (with two tests—TST and IGRA—for tuberculosis) you get what you need. *Ann. Rheum. Dis.* 71:1757–1760. 2012. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2012-201979>.van

van Zyl-Smit RN et al. Within-subject variability and boosting of T-cell Interferon- γ responses after tuberculin skin testing. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009a.

van Zyl-Smit RN et al. Within-subject variability of Interferon- γ assay results and boosting effect of tuberculin skin testing A systematic review. *PLOS one* 2009b.

Mancuso JD, Bernardo J, Mazurek GH. The elusive “gold” standard for detecting Mycobacterium tuberculosis infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:122-4.

Hoofdstuk 10

COMMUNICATIE

Organisatie en communicatie

De communicatie tussen behandelaar, laboratorium en GGD is bij tuberculose in sommige opzichten complexer dan bij andere infectieziekten. Niet alle laboratoria verrichten het hele diagnostische pakket van microscopie, PCR, directe moleculaire resistentie, kweek, identificatie en fenotypische gevoeligheidsbepaling van *M. tuberculosis*. Landelijk (RIVM) zijn er faciliteiten om *M. tuberculosis* isolaten te laten onderzoeken en te typeren (VNTR).

In sommige regio's vindt een toenemende centralisering plaats van de diagnostiek van tuberculose. Laboratoria die de diagnostiek, identificatie en gevoeligheidsbepalingen voor andere laboratoria verzorgen, melden hun bevindingen rechtstreeks (telefonisch of via internet, maar altijd ook schriftelijk) aan het aanvragende laboratorium. Hierbij is een principeafspraken dat het laboratorium waar patiëntmateriaal als eerste wordt aangeboden verantwoordelijk is voor communicatie met de inzenders en de GGD. De eerste melding door het laboratorium aan de behandelaar van een uitslag die op tuberculose wijst dient altijd telefonisch te geschieden. In principe is dit bij een positieve *M. tuberculosis* complex PCR op patiëntenmateriaal, maar sommige laboratoria geven een positief microscopisch preparaat al door.

Uitslagen die van een regionaal/centraal laboratorium komen zullen dus via het lokaal laboratorium worden doorgestuurd naar de aanvragers en de GGD, zoals gevoeligheidsbepalingen en moleculaire uitslagen. Het lokale laboratorium kan het Nationale Referentielaboratorium (RIVM) toestemming geven direct met de inzenders en GGD te communiceren over uitslagen, zoals identificatie en gevoeligheidsbepalingen.

Genotyperingen (VNTR) en gevoeligheidsbepalingen, uitgevoerd door het RIVM (zowel moleculair als fenotypisch), worden direct zowel aan de inzendende laboratoria als aan de GGD'en teruggekoppeld.

Wetgeving en melding

In de Wet publieke gezondheid (WPG, 2008) is de meldingsplicht van laboratoria van infectieziekten geregeld in artikel 25, lid 2 t/m 5.

1. Onverminderd artikel 22 meldt het hoofd van het laboratorium de vaststelling van een verwekker van een infectieziekte behorend tot groep A, B1, B2 of C aan de gemeentelijke gezondheidsdienst van de gemeente waarin de arts die het onderzoek bij het laboratorium heeft aangevraagd zijn praktijk heeft.
2. De melding bevat de volgende gegevens: de ziekteverwekker, de naam van de arts en de naam, de geboortedatum en het burgerservicenummer van de betrokken persoon.

3. Indien de melding betrekking heeft op een persoon die zijn verblijfplaats heeft in een andere gemeente, geeft de gemeentelijke gezondheidsdienst deze melding direct door aan de gemeentelijke gezondheidsdienst van de verblijfplaats van de betrokkene.
4. Op verzoek van de gemeentelijke gezondheidsdienst zorgt het hoofd van het laboratorium ervoor dat nader onderzoek wordt gedaan naar de ziekteverwekker, en dat de gemeentelijke gezondheidsdienst van het resultaat op de hoogte wordt gesteld.

De wettelijke melding aan de GGD is de verantwoordelijkheid van het laboratorium dat als eerste het patiëntmateriaal voor diagnostiek ontvangt.

GGD (mede)behandelaar

Bij de behandeling van een patiënt met tuberculose is de GGD altijd ten minste als medebehandelaar betrokken en heeft de laboratoriumuitslagen nodig voor:

- het bepalen van de besmettelijkheid van de patiënt voor zijn (onmiddellijke) omgeving;
- het ondersteunen en adviseren omtrent aanpassingen van de medicatie; soms is de GGD zelf hoofdbehandelaar;
- de preventieve behandeling van geïnfecteerden en eventuele primaire profylaxe;
- het vaststellen van de transmissieroutes
- De GGD heeft daartoe de volgende gegevens van de laboratoria nodig:
- patiëntmaterialen met een positieve PCR voor *M. tuberculosis* complex;
- de positieve resultaten van de directe microscopie;
- in overleg met het lokale laboratoria een gekwantificeerde uitslag van de microscopie en/of NAAT;
- de resistentie-uitslagen; zowel de snelle moleculaire bepalingen als de conventionele fenotypische testen (ongeacht waar deze zijn verricht)
- de VNTR-uitslagen van het RIVM.

De GGD die de melding ontvangt van een laboratorium over een nieuwe tuberculosepatiënt laat het laboratorium weten naar welk (email)adres alle vervolguitslagen van de betreffende patiënt moeten worden gestuurd. Er wordt gestreefd naar één centraal (e-mail)adres per regio, waarbij deze GGD (in de nabije toekomst het REC; Regionale Expertise Centrum) de verantwoordelijkheid heeft voor het doorsturen van de uitslagen naar de GGD waar de patiënt is gemeld.

Aanbevelingen

Het laboratorium meldt de eerste uitslag, die op tuberculose wijst, ook (indien van toepassing) aan de tuberculose coördinator van het ziekenhuis waar de arts die het onderzoek bij het laboratorium heeft aangevraagd zijn praktijk heeft. Meestal is dit bij een positieve *M. tuberculosis* complex PCR op patiëntmateriaal.

Het laboratorium adviseert op de eerste uitslag die op tuberculose wijst, de arts die het onderzoek bij het laboratorium heeft aangevraagd (wettelijke) aangifte te doen bij de GGD en een HIV test te verrichten

Hoofdstuk 11

KWALITEIT

Kwaliteitscontrole

Het micro-organisme *Mycobacterium tuberculosis* is internationaal aangemerkt als risicoklasse 3 ([TLBM, 2012](#)). Vanwege de kans op besmetting en op verspreiding moet *M. tuberculosis* onder strikte veiligheidscondities worden gekweekt. De normen voor deze veiligheidscondities zijn omschreven als BioSafety Levels (BSL); *M. tuberculosis* valt onder BSL-3 ([TLBM, 2012](#); [IGz, 2014](#)). Wel kan onder BSL-2 condities het patiëntmateriaal worden bewerkt en geënt op kweekmedium en daarna naar een BSL-3 laboratorium worden verstuurd voor kweek en verdere analyse ([Werkgroep TB-diagnostiek, 2012](#)).

Om het kwaliteitsniveau van de diagnostische hulpverlening in stand te houden dienen laboratoria:

1. CCKL-geaccrediteerd te zijn en te voldoen aan de normen voor het veilig onder BSL-3 condities werken met mycobacteriële kweken ([de Boer, 2010](#))
 - Dit wordt gesteund door de NVMM. De 6 meest kritische normen worden door alle MML's nageleefd
 - Nederland kent een systeem van CCKL (Stichting voor de bevordering van de kwaliteitsbeheersing op het gebied van laboratoriumonderzoek in de gezondheidszorg)-accreditatie van laboratoria voor de medische microbiologie. Uit het IGZ-onderzoek bleek dat van de MML's die *M. tuberculosis* complex kweken slechts één MML niet was geaccrediteerd; deze had accreditatie wel aangevraagd en dat is inmiddels (december 2014) toegekend.
2. Deel te nemen aan kwaliteitsrondzendingen ([de Boer, 2010](#))
 - Volgens het IGZ-onderzoek deden alle MML's die *M. tuberculosis* complex kweken mee aan SKML (Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratorium-diagnostiek) en/of internationale rondzendingen van monsters ten behoeve van kwaliteitscontrole. Van de 28 MML's, namen er 25 deel aan rondzendingen voor moleculaire tuberculosedagnostiek.
 - Naast het RIVM zijn er een aantal MML's die ook fenotypische gevoeligheidsbepalingen verrichten. Geen van deze MML's neemt deel aan rondzendingen om de kwaliteit van de gevoeligheidsbepaling te bepalen.
 - De uitkomsten van de rondzendingen van monsters zijn niet openbaar. De inspectie vindt dat de MML's deze gegevens zelf openbaar moeten maken, maar het NVMM bestuur deelt deze mening niet. De rondzendingen dienen voor een kwaliteitsverbetering en niet voor kwaliteitsmeting.
3. Het (na-)scholingsniveau van het laboratorumpersoneel te waarborgen ([de Boer, 2010](#))

4. Voldoende kwantiteit te hebben in diagnostische verrichtingen
- Tijdens drie landenvisitaties, die elke vijf jaar in het veld van de Nederlandse tbc-bestrijding worden uitgevoerd, werd door internationale review teams opgemerkt dat het aantal MML's dat tuberculose laboratoriumdiagnostiek verricht onevenredig groot is ([WHO/ECDC, 2014](#)).
 - In het IGZ-rapport staat dat een uitspraak moet worden gedaan over het vereiste minimale aantal kweken per jaar dat een MML moet uitvoeren om de kwaliteit van de tuberculosedagnostiek op peil te houden ([IGZ, 2014](#)).
 - Ook in het RIVM-NVMM rapport 'Veilig werken aan betere kwaliteit' wordt gesteld dat laboratoria voldoende kwantiteit in diagnostische verrichtingen moeten hebben om het kwaliteitsniveau op peil te houden, waarbij gesteld werd dat de ondergrens nog dient te worden vastgesteld ([Werkgroep TB-diagnostiek, 2012](#)). Inmiddels heeft de NVMM deze ondergrens bepaald.
 - Een handvat voor het vaststellen van die ondergrens is de studie van De Boer et al. waarbij werd aangetoond dat laboratoria die jaarlijks minder dan 3000 monsters onderzochten significant vaker foutpositieve kweekresultaten hadden ([de Boer, 2002](#)). De inspectie berekende dat 27 MML's minder dan 3000 tuberculosekweken (8 minder dan 1000) verrichtten; 6 MML's zetten jaarlijks meer dan 3000 kweken in. De NVMM heeft geadviseerd om een minimum vast te stellen van 375 kweken per jaar ([NVMM, 2014](#)).

Voorgestelde kwaliteitsnormen

Alle MML's die *M. tuberculosis* complex kweken, dienen een BSL-3 laboratorium te hebben en CCKL-geaccrediteerd te zijn.

Alle MML's die *M. tuberculosis* complex kweken en moleculair detecteren met een NAT, dienen deel te nemen aan SKML of internationale rondzendingen.

Alle MML's die fenotypische gevoeligheidsbepalingen van *M. tuberculosis* complex isolaten verrichten, dienen deel te nemen aan rondzendingen om de kwaliteit van deze gevoeligheidsbepaling te waarborgen.

Kweken op *M. tuberculosis* complex dienen alleen in MML's verricht te worden die jaarlijks minimaal 375 *M. tuberculosis* complex kweken inzetten.

Referenties

Tuberculosis Laboratory Biosafety Manual [Internet]. World Health Organization; 2012. *Report No.: WHO/HTM/TB/2012.11.* Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77949/1/9789241504638_eng.pdf

Veiligheid bij het kweken van Mycobacterium tuberculosis in medisch microbiologische laboratoria kan en moet beter. Utrecht: Inspectie voor de Gezondheidszorg; 2014.

Veilig werken aan betere kwaliteit. Laboratoriumdiagnostiek van tuberculose in de praktijk. *Rapport werkgroep TB-diagnostiek NVMM/CIb*; 2012.

de Boer A, de Vries G. Nationaal Plan Tuberculosebestrijding 2011-2015. *Inhoudelijke kaders. Bilthoven: RIVM*; 2010.

Report of the joint WHO and ECDC programme review of the national TB control programme in the Netherlands. 30 September - 4 October 2013 [Internet]. *Copenhagen: WHO Regional Office for Europe*; 2014. Available from: <http://www.euro.who.int/en/health-topics/communicable-diseases/tuberculosis/publications/2014/report-of-the-joint-who-and-ecdc-programme-review-of-the-national-tb-control-programme-in-the-netherlands>

de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE, Sebek MM, Lambregts-van Weezenbeek KS, Dessens M, et al. False-positive mycobacterium tuberculosis cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. *J Clin Microbiol.* 2002;40:4004-9.

Brief bestuur NVMM aan Inspectie voor de Volksgezondheid. 24 november 2014

Bijlage

AANBEVELINGEN

Aanbevelingen - Microscopie

De werkgroep raadt aan een fluorescentiekleuring op gedecontamineerd en gecontamineerd respiratoir materiaal uit te voeren omdat dit de sensitiviteit van de microscopie verhoogd.

De werkgroep is van mening dat auramine-preparaten in zijn geheel moet worden beoordeeld en adviseert bij microscopisch onderzoek altijd een positieve controle mee te nemen en bij minder of gelijk aan drie preparaten ook een negatieve controle. Voor de beoordeling van een ZN-kleuring is 15 min (totaal 300 velden) gebruikelijk.

Met fluorochroom gekleurde preparaten dienen dezelfde dag nog beoordeeld te worden omdat de fluorescentie-intensiteit snel vermindert. Cito-auramines moeten dezelfde dag worden gerapporteerd; bij sterke verdenking op tuberculose ook in het weekend.

Voor zowel respiratoire en niet-respiratoire materialen is een fluorochroomkleuring eerste keus, bij voorkeur de auramine O-rhodamine B kleuring.

Auramine-positieve preparaten hoeven niet langer geconfirmeerd te worden door middel van een ZN-kleuring, maar dienen wel met een moleculaire test te worden onderzocht voor identificatie van *M. tuberculosis* complex

Bij de microscopische uitslag zal ook een schatting van de hoeveelheid aanwezige mycobacteriën gerapporteerd moeten worden (zie [Tabel 3.1](#)). Het verdient aanbeveling om in overleg met de lokale GGD de wens voor gradering op direct materiaal in een convenant op te nemen.

Aanbevelingen - Kweek		
	Immuuncompetente patiënten	Immuungecompromitteerde patiënten en patiënten met chronische longziekte
Respiratoir materialen: sputum, BAL-vloeistof	Alleen Mtb (deel 1A)	Mtb en NTM (deel 1A en 2)
Niet-respiratoire materialen: liquor, pleurabiopt, pleuravocht, ascites, urine, peritoneumbiopt, darmbiopt, huid, pericardvocht, maaginhoud lymfeklieren	Mtb en NTM (deel 1B en 2)	Mtb en NTM (deel 1B en 2)
Bij de kweken van Mtb uit respiratoire samples is een vloeibare kweek alleen voldoende. Potentiele meerwaarde van het gebruik van vaste kweekmedia lijkt zo gering dat het niet opweegt tegen het meerwerk en de extra kosten.		
Bij de kweek vanuit extra-pulmonale samples (waarbij NTM in de differentiaal diagnose staat) is kweken met alleen vloeibare media niet voldoende en moet er kweek op vaste media worden ingezet (zie hiervoor het hoofdstuk diagnostiek NTM).		
Gebruik voor de voorbereiding van Mtb kweken NALC(1-2%)-NaOH(1%).		
Om het effect van de voorbereiding te monitoren is jaarlijkse controle van de contaminatiegraad van de kweken noodzakelijk.		
De contaminatiegraad van vloeibare kweken dient tussen 2 en 5% te bedragen.		
Identificatie van <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex moet tot op het (sub)species niveau worden verricht.		

Aanbevelingen - Kweek NTM

Bij de kweek voor detectie van nontuberculeuze mycobacteriën is de vloeibare kweek alleen niet voldoende en zullen er vaste media moeten worden ingezet; specifieke supplementen kunnen nodig zijn.

Een door geautomatiseerde kweeksystemen als 'negatief' aangemerkte kweek dient visueel te worden geïnspecteerd op groei alvorens de buis wordt vernietigd

NTM kweken van respiratoire materialen moeten worden geïncubeerd bij een temperatuur van 35°C-37°C

NTM kweken van huid, bot of lymfekliermaterialen moeten worden geïncubeerd bij een temperatuur van 30°C en 35-37°C

Aanbevelingen - Identificatie

Een identificatie tot het subspecies niveau van *M. tuberculosis* complex isolaten is van belang voor de behandeling van de patiënt en het contactonderzoek.

Een juiste identificatie van NTM wordt aanbevolen om de behandeling van de patiënt te optimaliseren en voor epidemiologisch onderzoek.

Voor de identificatie van de (sub)species van *M. tuberculosis* complex en van NTM zijn de reverse line blot assays van Hain en Innogenetics/Fujirebio aan te bevelen.

Voor de identificatie van de (sub)species van NTM kan additionele sequentie analyse van 1 of meerdere genomische targets nodig zijn.

Alle geïsoleerde NTM dienen moleculair te worden geïdentificeerd.

Aanbevelingen - Moleculaire Detectie

Elk laboratorium moet de mogelijkheid bieden voor een cito-NAT op *M. tuberculosis* complex, ook in het weekend. De uitslag van een cito bepaling moet binnen 48 uur bekend zijn.

Auramine-positief respiratoir en niet-respiratoir materiaal dient met een in-house RT-PCR (mits gevalideerd en op schrift vastgesteld volgens de geldende certificatie regels), de AMTD test, de COBAS TaqMan *M. tuberculosis* test of de GeneXpert MTB/RIF te worden onderzocht op de aanwezigheid van *M. tuberculosis* complex. Bij het gebruik van *IS6110* als target dient men er bewust van te zijn dat *IS6110* bij sommige stammen ontbreekt. Dit kan leiden tot een fout-negatieve test.

Bij sterke verdenking op tuberculose, dient auramine-negatief respiratoir en niet-respiratoir materiaal ook met de bovengenoemde moleculaire technieken te worden onderzocht, omdat een positieve uitslag de tijd tot diagnose significant kan verkorten

Het analyseren van meerdere monsters per patiënt m.b.v. een NAT is zinvol, omdat daardoor de gevoeligheid van de NAT wordt vergroot. Bij verdenking pulmonale tuberculose, dienen er twee monsters per patiënt te worden geanalyseerd.

Een negatieve NAT mag niet worden gebruikt om tuberculose uit te sluiten, en een NAT kan de kweek niet vervangen.

De moleculaire detectie kan op zowel voorbehandeld als niet-voorbehandeld materiaal worden gebruikt mits er wel homogenisatie heeft plaatsgevonden. Een bevestigingstest (anders dan kweek) voor een positieve NAT is niet nodig, maar kan worden gebruikt als de kweek negatief blijft of niet mogelijk is. Moleculaire resistentiebepalingen kunnen worden gebruikt als bevestigingstest.

Een NAT kan de auramine-kleuring op respiratoir materiaal niet vervangen. Voor andere materialen zoals liquor en paraffine-coupes kan dit wel.

Elk laboratorium moet de mogelijkheid bieden voor het uitvoeren van een cito-NAT op *M. tuberculosis* complex ook in het weekend. Laboratoria die geen moleculaire diagnostiek doen, dienen een cito-regeling af te spreken met een ander laboratorium. De uitslag van een cito-uitslag moet in principe binnen 48 uur bekend zijn.

Aanbevelingen - Moleculaire Typering

Gezien het belang van de nationale surveillance van tbc voor het inperken van transmissie wordt aanbevolen om alle positieve *M. tuberculosis* complex kweken door het RIVM te laten typeren.

Op basis van nu beschikbare gegevens wordt aanbevolen om voor de nationale surveillance vast te houden aan de nu gebruikte VNTR typering

Om bronopsporings- en clusteronderzoek zo efficiënt mogelijk te laten verlopen wordt aanbevolen om *M. tuberculosis* complex isolaten zo snel mogelijk op te sturen voor typering.

Parallel hieraan dient geïnvesteerd te worden in het gebruik van WGS als typeringstechniek. Hiervoor is het noodzakelijk dat er een (gecureerde) internationale database komt met daarin sequenties van *M. tuberculosis* complex stammen wereldwijd.

Aanbevelingen - Resistentie

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen dienen ten minste van de eerste kweek van iedere nieuwe tuberculosepatiënt te worden uitgevoerd.

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor de eerstelijnsmiddelen behalve pyrazinamide dienen te worden uitgevoerd met commercieel beschikbare breekpuntsbepalingen in geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen. Met het oog op internationale standaardisatie is de MGIT960 methode aan te bevelen

Gevonden resistentie, discrepanties met moleculaire testen, of in het licht van kliniek en epidemiologie twijfelachtige resultaten van gevoeligheidsbepalingen dienen op referentielaboratorium niveau te worden geverifieerd middels een uitgebreidere bepaling waarin een grotere concentratiereeks per antibioticum kan worden getest, o.a. om ook intermediaire gevoeligheid aan te kunnen tonen.

Gevoeligheidsbepalingen voor pyrazinamide dienen te worden uitgevoerd door laboratoria met specifieke expertise en directe toegang tot een confirmatietest om fout-resistente uitslagen te voorkomen.

Gevonden pyrazinamide resistentie dient, als het geen *M. bovis* stam betreft, altijd te worden geconfirmeerd met een tweede test; dit kan een herhaling van de initiële test of pncA gen sequencing zijn.

Gevoeligheidsbepalingen voor de tweedelijnsmiddelen dienen gecentraliseerd te worden uitgevoerd in 1 laboratorium; in Nederland heeft het RIVM de specifieke expertise.

Kwaliteitscontrole van gevoeligheidsbepalingen voor de eerstelijnsmiddelen – behalve pyrazinamide – moet onderdeel zijn van de kwaliteitscontrole programma's van SKML.

Moleculaire gevoeligheidsbepalingen dienen te worden uitgevoerd op directe materialen waarin al *M. tuberculosis* complex bacteriën zijn gedetecteerd van patiënten met een verhoogd risico op resistentie, door afkomst uit een gebied met veel (multi) resistentie of door een geschiedenis van eerdere behandeling(en) voor tuberculose. Lokaal kan worden afgesproken dit indicatiegebied te verbreden door bij alle positieve materialen een directe moleculaire resistentie te verrichten.

Bij verdenking op het bestaan van een infectie met resistente *M. tuberculosis*, dient met behulp van moleculaire technieken resistentie tegen rifampicine en tegen isoniazide onderzocht te worden.

Aanbevelingen - Resistentie

Bij patiënten met een lage a priori kans of resistentie dient rekening te worden gehouden met de beperkte positief voorspellende waarde van de detectie van mutaties geassocieerd met rifampicine resistentie van zowel geneXpert als MTBDRplus.

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor NTM dienen te worden uitgevoerd op isolaten van patiënten met bewezen NTM infectie.

Fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor NTM dienen te worden uitgevoerd d.m.v. microdilutie in cation-adjusted Mueller Hinton bouillon.

Voor NTM dienen alleen middelen te worden gerapporteerd waarvoor breekpunten zijn vastgesteld en waarvoor associaties tussen in vitro gevoeligheid en uitkomst van therapie in vivo zijn beschreven in klinische studies.

Aanbevelingen - IGRA

Volg de richtlijnen voor interpretatie van de fabrikant. Er zijn echter aanwijzingen dat bepalingen met te lage INF- γ metingen in de mitogen controle (<0,5 IU/ml) of verhoogde INF- γ spiegels in de Nil controle moeten worden geïnterpreteerd als indeterminate ongeacht de gemeten respons tegen de *M. tuberculosis* antigenen.

De werkgroep beveelt aan dat bij een patiënt zonder bekende immuunstoornis en met een indeterminate uitslag de IGRA wordt herhaald met hulp van een nieuw afgenomen bloedmonster.

Gebruik standaardcommentaren om de aanvrager te helpen de uitslag te interpreteren

Antigen positief	Een positieve IGRA test wijst op een doorgemaakte infectie met <i>M. tuberculosis</i> . De test is niet geschikt om actieve tuberculose aan te tonen dan wel uit te sluiten
Mitogen <0,5	In de positieve controlebuis is onvoldoende interferon-gamma productie gemeten. De IGRA kan niet worden geïnterpreteerd en dient te worden herhaald
0,2 < Antigen <0,35 IU/ml	Vanwege een testwaarde die dicht tegen het afkappunt van de test ligt, adviseert de werkgroep om bij de patiënt na 4 weken opnieuw een IGRA af te nemen in geval van een patiënt.
0,35 < Antigen <0,7 IU/ml bij serieel testen	Let op: uit meerdere studies is gebleken dat een IGRA van een gezondheidsmedewerker met een testwaarde net boven het afkappunt (>0,35 IU maar <0,7 IU) niet zonder meer als positief moet worden geïnterpreteerd. Advies: verwijzing tuberculosedeskundige

De werkgroep beveelt aan om IGRA testen in het kader van contactonderzoek of periodieke screening binnen 3 dagen na het zetten van een THT uit te voeren om "boosting" te voorkomen.

Bij screening op LTBI bij immuungecompromitteerde patiënten of screening voorafgaand aan immuunsuppressieve therapie kan worden overwogen om een IGRA meer dan 3 dagen na een THT af te nemen om de sensitiviteit te verhogen.

De werkgroep geeft ter overweging om QFT-GIT buizen direct na afname te incuberen om het percentage indeterminate uitslagen te minimaliseren. De werkgroep beveelt aan om samples waarbij meer dan 16 uur verstreken is tussen afname en start incubatie in principe niet te analyseren.

Aanbevelingen - IGRA

De werkgroep geeft ter overweging om in geval van verzending van een QFT-GIT naar een extern laboratorium bij een langere transporttijd dan 4 uur tot incubatie de QFT-GIT buizen decentraal te incuberen.

De werkgroep geeft ter overweging om de QFT-GIT buizen voor incubatie krachtig te schudden en waar mogelijk een vortex mixer te gebruiken.

De werkgroep beveelt aan om de instructies van de fabrikant over de incubatieduur te volgen.

Het dagelijks beoordelen van de temperatuurregistratie van de incubatiestof en het afkeuren van testen met een waarde $0,2 < x < 0,7$ IU/ml indien de temperatuur te laag is geweest.

De werkgroep beveelt aan om de instructies van de fabrikant over de opslagduur en -omstandigheden te volgen.

De werkgroep beveelt aan bij een transportduur tot incubatie van 8-48 uur T-cell Xtend te gebruiken voor de T-SPOT.TB.

De werkgroep beveelt aan patiëntgegevens, testprocedures en uitslagverwerking te automatiseren.

De werkgroep beveelt aan om alleen met daarvoor aangewezen en geautoriseerde analisten een IGRA uit te voeren, stringent standaardprocedures na te leven en checklijsten aan te leggen.

De werkgroep beveelt aan bij serieel testen in immuuncompetente volwassenen op basis van de huidige literatuur het gebied van 0,20 IU/ml tot 0,70 IU/ml in de QFT-GIT als grijs gebied te beschouwen waarbij rekening dient te worden gehouden met mogelijke spontane conversie en reversie.

Laboratoria dienen een volledige IGRA uitslag te geven aan de aanvrager, dat wil zeggen de absolute uitslag in IU/ml en niet alleen "positief" of "negatief", waarbij in geval van mogelijke immuunstoornissen de uitslag van de mitogenbuis bijdragend is.

Aanbevelingen - Communicatie

Het laboratorium meldt de eerste uitslag, die op tuberculose wijst, ook (indien van toepassing) aan de tuberculose coördinator van het ziekenhuis waar de arts die het onderzoek bij het laboratorium heeft aangevraagd zijn praktijk heeft. Meestal is dit bij een positieve *M. tuberculosis* complex PCR op patiëntmateriaal.

Het laboratorium adviseert op de eerste uitslag die op tuberculose wijst, de arts die het onderzoek bij het laboratorium heeft aangevraagd (wettelijke) aangifte te doen bij de GGD en een HIV test te verrichten

Voorgestelde kwaliteitsnormen

Alle MML's die *M. tuberculosis* complex kweken, dienen een BSL-3 laboratorium te hebben en CCKL-geaccrediteerd te zijn.

Alle MML's die *M. tuberculosis* complex kweken en moleculair detecteren met een NAT, dienen deel te nemen aan SKML of internationale rondzendingen.

Alle MML's die fenotypische gevoeligheidsbepalingen van *M. tuberculosis* complex isolaten verrichten, dienen deel te nemen aan rondzendingen om de kwaliteit van deze gevoeligheidsbepaling te waarborgen.

Kweken op *M. tuberculosis* complex dienen alleen in MML's verricht te worden die jaarlijks minimaal 375 *M. tuberculosis* complex kweken inzetten.

