

# Mikrobiološka dijagnostika tuberkuloze od Kocha do "point-of-care" testa

Vera KATALINIĆ-JANKOVIĆ<sup>1)</sup>, prim., dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom

Mihaela OBROVAC<sup>1)</sup>, dr. sc., mag. medicinske biokemije

Ljiljana ŽMAK<sup>1)</sup>, dr. sc., dr. med., specijalist medicinske mikrobiologije s parazitologijom

<sup>1)</sup>Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb

## Ključne riječi

tuberkuloza  
laboratorijska dijagnostika  
molekularni testovi  
IGRA

## Key words

tuberculosis  
laboratory diagnostics  
molecular tests  
IGRA

Primljeno: 2013-04-04

Received: 2013-04-04

Prihvaćeno: 2013-06-20

Accepted: 2013-06-20

## Uvod

Tuberkuloza je kroz povijest, a i danas, jedan od vodećih pojedinačnih uzroka smrti od zaraznih bolesti. Iako prati ljudski rod od davnine, u 17. stoljeću započinje veliki epidemijski val s visokim pobolom i smrtnosti. Godine 1882. Robert Koch otkriva uzročnika tuberkuloze, *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tbc*), a kratko nakon toga i metodu bojanja bacila čineći ga time vidljivim pod svjetlosnim mikroskopom. Taj događaj predstavlja rođenje dijagnostike tuberkuloze. Tuberkulozu uzrokuju vrste koje su članovi *M. tuberculosis* kompleksa (MTBC), dominantno *M. tuberculosis*, a znatno rjeđe *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii* ili *M. caprae*. Druge dvije vrste, *M. microti* i *M. pinnipedii* su gotovo isključivo uzročnici bo-

Pregledni rad

Prema podacima Svjetske zdravstvene organizacije trećina svjetske populacije inficirana je s *M. tuberculosis* te je bolest koju on uzrokuje, tuberkuloza, jedna od najvažnijih infektivnih bolesti današnjice. Brza, dostupna i pouzdana dijagnostika izrazito je važna u prekidanju lanca prijenosa te suzbijanju zaraze. Klasična laboratorijska dijagnostika, koja se sastoji od direktne mikroskopije, kultivacije te testa osjetljivosti, u posljednjih je desetak godina dobila značajnu podršku u novim molekularnim testovima. Nakon brojnih hibridizacijskih testova, pravu je revoluciju 2010. godine donio test Xpert MTB/RIF, automatizirani sistem koji u dva sata direktno iz kliničkog uzorka može detektirati *M. tuberculosis* te rezistenciju na rifampicin. U novije vrijeme umjesto kožnog testa sve se više koriste IGRA testovi za otkrivanje latentne infekcije. Trenutno se najviše radi na brzom, pouzdanom i jeftinom "point-of-care" testu kojim bi se tuberkuloza mogla dijagnosticirati kod prvog susreta bolesnika s liječnikom.

## Microbiological diagnostics of tuberculosis from Koch to "point-of-care" test

Review article

According to the World Health Organization, one third of the world's population is infected with *M. tuberculosis*, making tuberculosis, the disease it causes, one of the most significant infectious diseases. Quick, accessible and reliable diagnostics is a key in breaking transmission chains and preventing infection. In the last 10 years, new molecular tests have considerably supported classical laboratory diagnostics that include microscopy, cultivation and drug susceptibility testing. In 2010, a revolutionary new test Xpert MTB/RIF was introduced. This closed system simultaneously detects *M. tuberculosis* and its resistance to rifampicin directly in clinical samples. Recently, there has been an increase in using IGRA tests (instead of skin test) to detect latent infection. The current focus of interest is the development of a rapid, reliable and inexpensive point-of-care test that could enable diagnosis of tuberculosis during the patient's first visit to the doctor.

lesti u drugih vrsta, *M. microti* u glodavaca, a *M. pinnipedii* u tuljana [1]. Pristup u borbi protiv tuberkuloze mora biti multidisciplinarnan. Uz kliničare i epidemiologe, vrlo je važna uloga laboratorija. Brzo otkrivanje samog uzročnika dovodi do pravovremene reakcije svih stručnjaka uključenih u kontrolu bolesti. Premda se smatra da ova "stara dama" pripada prošlosti, pokazatelji kako iz Svijeta, a tako i Hrvatske govore drugačije.

## Tuberkuloza u Svijetu

Iako je uzročnik tuberkuloze poznat više od 130 godina, a postoje i djelotvorni lijekovi, ipak je prema procjeni Svjetske zdravstvene organizacije (SZO) u 2012. godini

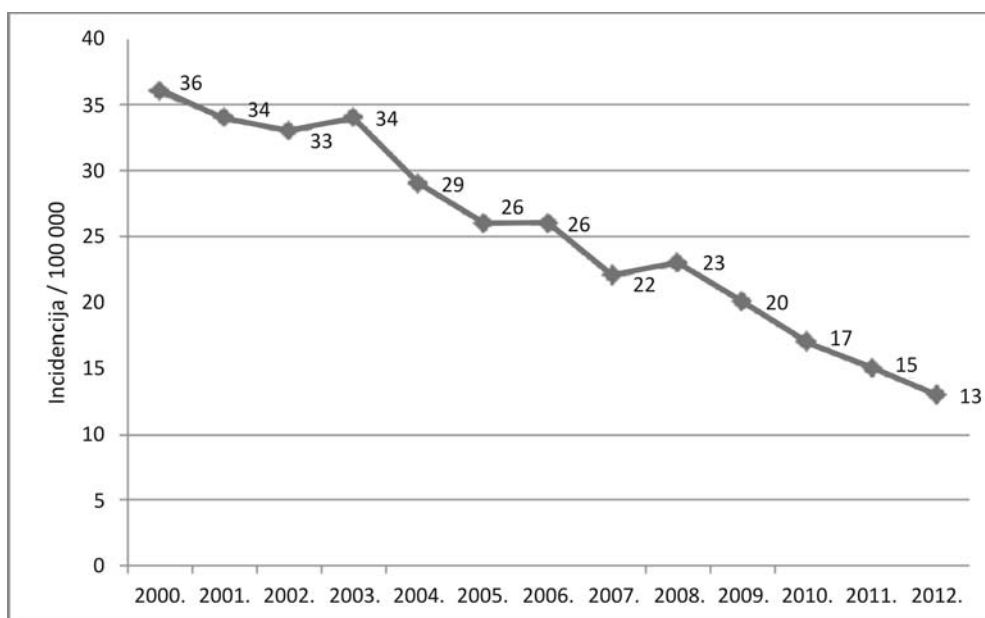
oko 8,6 milijuna ljudi oboljelo (incidencija 122 na 100 000 stanovnika), a 1,3 milijuna umrlo od ove bolesti [2]. Procjenjuje se da je u oko 3 milijuna ljudi propušteno postaviti dijagnozu tuberkuloze što predstavlja poseban problem jer je smrtnost od neliječene tuberkuloze oko 50%. Pritom, jedan bolesnik s direktno mikroskopski pozitivnim nalazom iskašljaja može zaraziti 10 do 15 novih osoba što se moglo spriječiti pravovremenom dijagnozom bolesti. Vrlo je važno kod svake novooboljele osobe odrediti profil osjetljivosti na antituberkulske lijekove (ATL) kako bi terapija bila ciljana i učinkovita. Nažalost, u dijelovima svijeta s najvećom incidencijom tuberkuloze, ispitivanje osjetljivosti na ATL najčešće nije dostupno pa se procjenjuje da samo oko 5% bolesnika ima rezultat testa ispitivanja osjetljivosti. Izazov su liječenju rezistentni oblici tuberkuloze, a osobito multirezistentni oblik (MDR, od engl. *multi drug resistant*) kod kojeg je prisutna rezistencija najmanje na izoniazid i rifampicin. Podaci iz 2012. godine pokazuju da je među 450 000 bolesnika s rezistentnom tuberkulozom u svijetu bilo 94 000 s MDR oblikom bolesti, a liječenje nije bilo dostupno za svakog petog bolesnika [2]. Pojava HIV-a početkom osamdesetih godina prošlog stoljeća dala je novi zamah epidemiji tuberkuloze. Tako u Africi oko 40% oboljelih od tuberkuloze ima koinfekciju HIV-om. Kako HIV ima značajno imunomodulatorno djelovanje, u oboljelih se stvaraju povoljni uvjeti za aktivaciju *M. tbc*. Zbog ovih alarmantnih podataka, mnoge su se humanitarne zaklade i međunarodne agencije aktivno uključile u suzbijanje tuberkuloze. Premda su se zbog opsežnog zalaganja svih uključenih očekivali iznimni rezultati, zabilježeni godišnji pad incidencije od 1% ne zadovoljava ciljeve postavljene u Milenijskoj dekla-

raciji SZO [2, 3]. Tako i u izvješću SZO za 2013. godinu stoji da je tuberkuloza jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u Svijetu, a problem rezistentne, posebno MDR tuberkuloze je u porastu [2, 4]. Brojne međunarodne inicijative, kao što su programi SZO i Globalnog programa za tuberkulozu, predstavili su nedavno još ambicioznije ciljeve. Za razdoblje "Post-2015", cilj je Svijet bez tuberkuloze i nijedna smrt uslijed tuberkuloze [5, 6].

## Tuberkuloza u Hrvatskoj

U odnosu na Svijet, s incidencijom od 12,5 na 100 000 u 2012., Hrvatska spada u zemlje s niskom incidencijom tuberkuloze (Slika 1) [7]. Taj podatak je ohrabrujući, ali donosi i nove izazove. Visoki postotak bolesnika s direktno pozitivnim mikroskopskim nalazom govori u prilog tome da liječnici ne sumnjaju dovoljno rano na dijagnozu tuberkuloze jer s njom dolaze u kontakt sve rjeđe. Zato je potrebno održati svijest o važnosti tuberkuloze te predstaviti mogućnosti pravovremene dijagnostike i praćenja. Zabrinjavajuća je značajno viša incidencija u nekim županijama u odnosu na ostatak zemlje što ukazuje na potrebu pojačane aktivnosti na suzbijanju prijenosa infekcije [7]. Sveobuhvatni pregled mjera protiv tuberkuloze, od kliničkog otkrivanja preko laboratorijske dijagnostike do epidemiološkog praćenja, sadržan je u Naputku za suzbijanje i praćenje tuberkuloze [8].

U Hrvatskoj postoji dobro definirana mreža od ukupno 14 mikobakterioloških laboratorija. O godišnjem obimu rada te izoliranim sojevima *M. tbc* i netuberkuloznih mikobakterija (NTM) laboratoriji izvještavaju Hrvatski



**Slika 1.** Incidencija tuberkuloze u Hrvatskoj od 2000. do 2012. godine  
**Figure 1.** Tuberculosis incidence in Croatia in the period 2000–2012

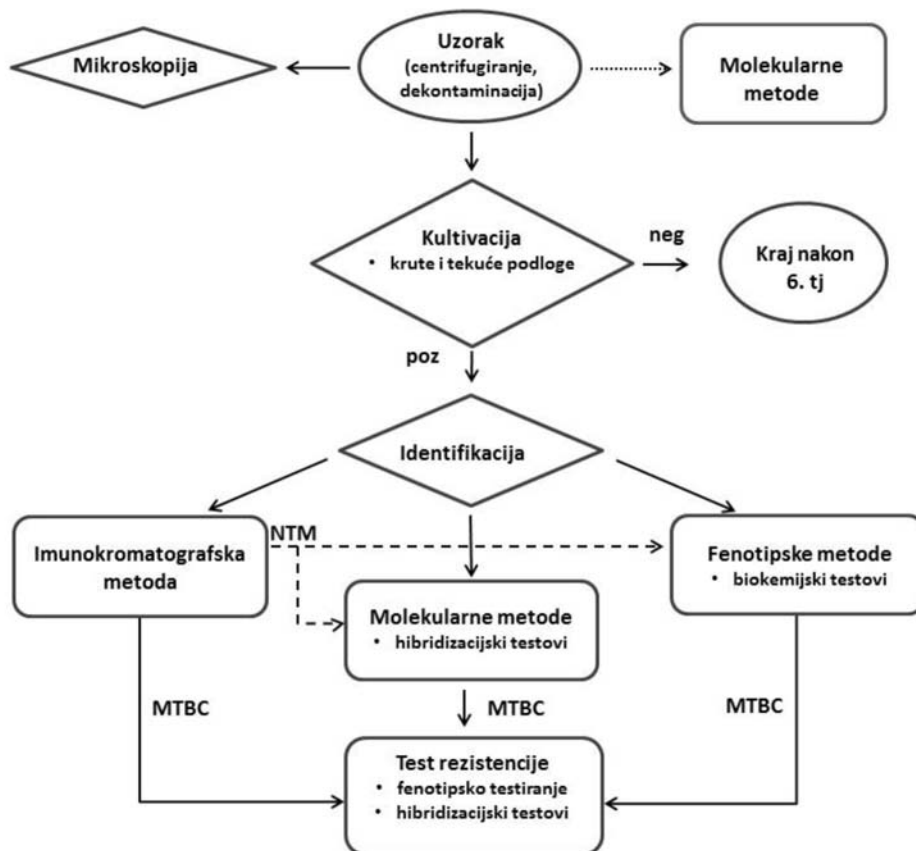
zavod za javno zdravstvo (HZJZ) i Nacionalni referentni laboratorij (NRL) za tuberkulozu. Apsolutni broj pregledanih uzoraka se kretao od 94 864 u 2000. godini do 43 974 u 2012. godini što predstavlja pad broja uzoraka od 46 %. *M. tuberculosis* je još uvijek dominantna mikobakterija s 46 264 (92,6 %) izolata, iako broj izoliranih sojeva NTM pokazuje stalni porast. Od ukupnog broja bakteriološki potvrđenih bolesnika medijana dobi 54,3 godine, oko 62 % bilo je muškog, a 38 % ženskog spola. Za razliku od nekih dijelova Svijeta gdje značajan dio bolesnika ima rezistentni oblik bolesti, u Hrvatskoj udio takvih bolesnika za sada je nizak te iznosi oko 6 % [7]. Osobito je nizak udio bolesnika s MDR oblikom bolesti tako da se godišnje otkrije dva do tri nova bolesnika, a u 2013. godini po prvi puta nije zabilježen niti jedan novi slučaj MDR tuberkuloze (podaci HZJZ). Uvriježeno je mišljenje da tuberkuloza u Hrvatskoj više pogađa stariju populaciju, međutim pokazalo se da su značajno pogođene i mlađe dobne skupine [9]. Premda je broj oboljelih u najmlađim dobnim skupinama nizak, uznemirujući je podatak da veliki postotak (oko 58 %) od ukupnog broja oboljelih spada u skupinu radno sposobnog stanovništva [9]. Da bi se lanac prijenosa što prije prekinuo, važno je što prije posumnjati te laboratorijski potvrditi zarazu s *M. tuberculosis*.

## Dijagnostika aktivne tuberkuloze

Osnova dijagnostike i jedini sigurni dokaz bolesti je izolacija uzročnika *M. tuberculosis* u biološkom materijalu. Budući da tuberkuloza osim pluća može u oko 10 % slučajeva zahvatiti bilo koje sjelo u tijelu, za analizu se ciljano šalju uzorci s mjesta infekcije: iskašljaj, mokraćna, pleuralni izljev, cerebrospinalni likvor, različiti punktati, bioptati i dr. Temelj je uspješne laboratorijske dijagnostike kvaliteta uzorka koji se analizira. Kod uzorkovanja je potrebno paziti da se uzorak ne uklopi u transportni medij (parafin, formalin i sl) koji bi onemogućio kasniji rast *M. tuberculosis*. Uzorak je potrebno uzeti u sterilnu posudicu, odgovarajuće pohraniti te transportirati u što kraćem roku [8, 10, 11]. Nakon primitka uzorka radi se klasičan algoritam pretraga, što uključuje mikroskopiju, kultivaciju, identifikaciju uzročnika te test rezistencije (Slika 2).

## Mikroskopija

Mikroskopija acidorezistentnih bacila (ARB) prvi je korak u dijagnostici tuberkuloze već desetljećima. Jedina su iznimka uzorci urina i želučanih lavata koji se zbog



**Slika 2.** Shema dijagnostičkih pretraga na mikobakterije  
**Figure 2.** Mycobacteria diagnostics scheme

niske osjetljivosti i velikog broja lažno pozitivnih rezultata ne pregledavaju direktno mikroskopski nego se nakon obrade odmah kultiviraju. Postoje jasne preporuke o brzini javljanja nalaza pa se prema standardu direktni nalazi mikroskopije moraju javiti u roku od 24 sata od primitka uzorka [10]. Kod direktnog mikroskopiranja uzorka koriste se dvije različite tehnike. Prva je detekcija svjetlosnim mikroskopom (bojanje karbol-fuksinom po Ziehl-Neelsenu), a druga je detekcija fluorescentnim mikroskopom (bojanje auraminom). Obje su tehnike visoko specifične, ali detekcija fluorescentnim mikroskopom dozvoljava brže mikroskopiranje manjeg broja vidnih polja i preporučuje se radi više osjetljivosti i brzine za laboratorije s većim brojem uzoraka. Dodatno je fluorescentna mikroskopija poboljšana uvođenjem mikroskopa s diodama koje emitiraju svjetlost. Za ove mikroskope nisu potrebne tamne prostorije, a lampe su znatno jeftinije i dugotrajne. Iako je mikroskopija brza metoda dokaza ARB, zbog njene niske osjetljivosti i specifičnosti mora je slijediti kultivacija (Tablica 1). Jedino se kultivacijom mogu razlikovati mikroskopski pozitivni uzorci *M. tuberculosis* od NTM te otkriti mikroskopski negativni bolesnici.

### Kultivacija

Kultivacija *M. tuberculosis* iz kliničkih uzoraka je osjetljivija od mikroskopije i trenutno dostupnih molekularnih testova. Kultivacijom se može detektirati oko 10–100 bacila u mililitru uzorka (Tablica 1). Danas je standard dijagnostike mikobakterija uporaba krutih podloga, kao što su Loewenstein-Jensen i njegove modifikacije, te tekućih podloga, kao što je MGIT (od engl. *mycobacteria growth indicator tube*). Uzorci se kultiviraju ukupno 6 tjedana, a nakon tog se vremena (ukoliko nema porasta kolonija) javlja negativan nalaz. Vrijeme javljanja pozitivnog nalaza ovisi o broju bacila u samom uzorku te o vrstama podloga koje se koriste. Tako je prosječno vrijeme javljanja poziti-

vnog nalaza u krutoj podlozi 16–29 dana, a u tekućoj 8–16 dana. Osim što je vrijeme kultivacije u tekućim podlogama kraće, i osjetljivost im je do 10 % viša u odnosu na krute podloge. SZO je 2007. preporučila uporabu tekućih podloga za sve uzorke u kombinaciji s testovima za brzu identifikaciju vrste *M. tuberculosis*. Međutim, ovi dijagnostički sistemi su skupi, tekuće podloge podložne većoj kontaminaciji, a laboratoriji moraju biti uključeni u sustav vanjske kontrole kvalitete svog rada [12]. Primjenom tekućih podloga za sve uzorke u svim laboratorijima u Hrvatskoj u budućnosti će biti moguće bakteriološki potvrditi *M. tuberculosis* u postotku većem od sadašnjih 75 % [7]. Uz mikroskopiju, kultivacija je još uvijek neophodna da bi se iz poraslih kolonija mogle identificirati različite vrste mikobakterija i ispitati osjetljivost *M. tuberculosis* na ATL.

### Identifikacija vrsta mikobakterija

Nakon porasta mikobakterija na podlogama potrebno je načiniti identifikaciju vrste unutar roda *Mycobacterium*. Određeni udio mikobakterija već se na temelju morfologije kolonija razlikuje od MTBC, međutim vrstu nije moguće odrediti samo na osnovu izgleda i brzine rasta kolonija. U identifikaciji i razdvajanju MTBC i NTM koriste se biokemijske i molekularne metode. Iako su biokemijski testovi dugo vremena bili jedini način identifikacije vrste, u posljednjih nekoliko godina zamjenjuju ih molekularne metode. Dostupni su komercijalni hibridizacijski testovi (LPA, od engl. *line probe assay*) za tridesetak najvažnijih mikobakterija [13]. Ostale se vrste mogu diferencirati određivanjem slijeda nukleotida (sekvencioniranje), tehnikom koja se primjenjuje u visoko specijaliziranim centrima.

### Ispitivanje osjetljivosti na ATL

Nakon identifikacije vrste slijedi ispitivanje osjetljivosti na ATL. Radi velike mogućnosti stvaranja infek-

**Tablica 1.** Osjetljivost mikrobioloških pretraga i vrijeme javljanja rezultata

**Table 1.** Microbiology testing sensitivity and results reporting time

	Osjetljivost / Sensitivity ARB/mL	Vrijeme javljanja rezultata / Results reporting time	Vrijeme javljanja testa osjetljivosti / DST reporting time
Mikroskopija (M) / Microscopy	> 5000	2 sata/hours	
Kultivacija – krute podloge / Cultivation – solid media	≥ +/-100	16 dana/days (M poz.) 29 dana/days (M neg.)	6 tjedana/weeks
Kultivacija – tekuće podloge / Cultivation – liquid media	≥ +/-10	8 dana/days (M poz.) 16 dana (M neg.)	2 tjedna/weeks (M poz.) 2 tjedna/weeks (M neg.)
Automatizirani PCR u stvarnom vremenu / Automated RT-PCR in real time	≥ +/-10	2 sata/hours	2 sata/hours (samo rifampicin/ only rifampicin)

ARB – acidorezistentni bacili/acidoresistant bacilli

DST – od engl. *Drug Sensitivity Testing*

tivnog aerosola, ispitivanje bi se trebalo raditi u uvjetima koji odgovaraju razini biozaštite 3 [8]. Sve do nedavno, rutinska metoda ispitivanja osjetljivosti na ATL bila je metoda proporcije po Canetti-u na krutoj podlozi po Loewenstein-Jensenu. Metoda proporcije zasniva se na usporedbi porasta *M. tuberculosis* na podlozi u koju je dodana kritična koncentracija ATL i porasta na podlozi bez ATL. Soj se smatra rezistentnim ukoliko je proporcija rezistentnih bacila u ispitivanom soju jednaka ili iznad kritične proporcije od 1 % [14]. Veliki nedostatak ove metode je dugo vrijeme koje je potrebno za rast *M. tuberculosis* na krutim podlogama pa se na rezultat čeka i do mjesec dana. Zbog toga je danas kao standard ispitivanja osjetljivosti uvedeno ispitivanje na tekućim podlogama u automatiziranim sistemima. Time je vrijeme javljanja rezultata skraćeno na prosječno dva tjedna. Ukoliko se fenotipskim metodama otkrije rezistencija ili ukoliko postoji sumnja da bolesnik ima rezistentni oblik bolesti, potvrda rezistencije radi se molekularnim testovima. Komercijalno su dostupni LPA za detekciju rezistencije na izoniazid i rifampicin, kao i na ATL druge linije, fluorokinolone i aminoglikozide [15, 16].

Iako su komercijalni molekularni testovi korisni za brzo određivanje rezistencije, osjetljivost im nije na razini fenotipskih metoda te se njima za sada ne mogu otkriti svi rezistentni sojevi.

Neki molekularni testovi imaju više namjena pa tako Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) uz detekciju *M. tuberculosis* direktno iz kliničkih uzoraka, otkriva i rezistenciju na rifampicin [17]. Velika je prednost ovog zatvorenog sistema potpuna automatizacija postupka i brzina dobivanja rezultata unutar dva sata. Iako je Xpert MTB/RIF dobar početni dijagnostički test, osjetljivost mu još uvijek nije na razini kultivacije uzorka na tekućim podlogama. Svi se uzorci iz tog razloga i kultiviraju.

## Dijagnostika latentne tuberkuloze

Od 100 osoba koje su došle u kontakt s *M. tuberculosis*, inficirat će se samo njih 10, a u jedne će doći do razvoja aktivne bolesti. Kod 90 % inficiranih tuberkuloza će ostati u latentnom obliku (LTBI, od engl. *latent TB infection*) bez kliničkih znakova bolesti [18]. U inficiranih osoba imunološki odgovor javlja se tri do osam tjedana nakon infekcije. Ovaj odgovor može se testirati na dva načina, kožnim testom ili testom iz krvi.

### Kožni test

Do unatrag nekoliko godina, jedini način testiranja izloženosti kontakata bacilu tuberkuloze i otkrivanja LTBI bio je kožni test koji koristi purificirane derivate proteina (PPD) [19]. Glavni su nedostaci ovog jeftinog testa niska osjetljivost i specifičnost. Dodatni je nedostatak nemo-

gućnost razdvajanja infekcije s *M. tuberculosis* i izloženosti drugim mikobakterijama uključujući i vakcinaciju sojem BCG (od *Bacillus Calmette-Guerin*).

### IGRA testovi

IGRA testovima (od engl. *interferon gamma release assay*) mjeri se razina interferona gama koji luče periferni limfociti u krvi nakon *in vitro* stimulacije antigenima *M. tuberculosis* [20]. Kako su ovi antigeni specifični za *M. tuberculosis*, te dodatno zbog uključivanja negativne i pozitivne kontrole kao dijela testa, osjetljivost i specifičnost IGRA testova su veći nego kod kožnog testa. Potrebno je naglasiti da kožno testiranje šest tjedana prije IGRA testiranja može dovesti do lažno pozitivnih rezultata. Indikacije za IGRA testiranje su isključivo obuhvat kontakata bolesnika s aktivnom tuberkulozom te testiranje prije primjene biološke terapije. Zbog visokog postotka negativnih nalaza kod bolesnika s tuberkulozom, ovaj se test ne preporučuje u algoritmu dijagnostike aktivne bolesti.

## Pogled u budućnost

Dijagnostika tuberkuloze je u posljednjih desetak godina znatno napredovala, ipak, još je daleki put do idealnog dijagnostičkog testa. Taj bi test trebao biti brz, pouzdan i jeftin te moguć za primjenu kod prvog kontakta bolesnika s liječnikom [21].

U razvoju je više takvih "point-of-care" (POC) testova koji su zasnovani na različitim principima. Jednim od takvih komercijalnih testova dokazuju se volatilni markeri tuberkuloze u izdahnutom zraku uređajem nalik onome za testiranje razine alkohola [22]. Glavna namjena ovog testa je brzi probir bolesnika, no niska osjetljivost metode još uvijek ne dozvoljava njegovu uporabu u rutinskoj dijagnostici. Postoji i brzi test dokaza specifičnih antigena u urinu koji također nije dovoljno osjetljiv [23].

Izgledno je da će u bliskoj budućnosti dijagnostika biti sekvencioniranje čitavog genoma *M. tuberculosis* direktno iz uzorka bolesnika [24]. Ova bi metoda mogla zamijeniti sve dosadašnje tehnike, budući da bi se uzročnik istovremeno mogao detektirati, identificirati i odrediti mu se osjetljivost na ATL. Dosadašnja razina razvoja ove metode nije još uvijek dovoljna za primjenu direktno na uzorku, ali se već primjenjuje u dijagnostici mikobakterija poraslih u kulturi.

Usprkos velikom tehničkom napretku u dijagnostici tuberkuloze, nikako se ne smije zanemariti ljudski faktor. Kod ove bolesti osobito je važan multidisciplinarni pristup i suradnja između kliničara, mikrobiologa i epidemiologa. Bez timskog rada, sam tehnološki napredak, ma koliko sofisticiran, neće doprinijeti promjeni globalne slike tuberkuloze.

## Literatura

- [1] Gandadharam PRJ i Jenkins PA. Mycobacteria: Basic Aspects. Chapman and Hall, New York, 1997.
- [2] World Health Organisation. Global tuberculosis control. WHO report 2013. WHO/HTM/TB/2013.11. Geneva, WHO, 2013.
- [3] World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2011. WHO/HTM/TB/2011.16. Geneva, WHO, 2011.
- [4] European Centre for Disease Prevention and Control. Progressing towards TB elimination. Stockholm: ECDC; 2010.
- [5] World Health Organisation. Global strategy and targets for tuberculosis prevention, care and control after 2015. Report by the Secretariat. Geneva, WHO, 2013.
- [6] D'Ambrosio L, Dara M, Tadolini M i sur. Tuberculosis elimination: theory and practice in Europe. Eur Respir J 2014 Jan 16. [Epub ahead of print]
- [7] Hrvatski zdravstveno-statistički ljetopis za 2012. godinu. Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2013.
- [8] Naputak za suzbijanje i sprečavanje tuberkuloze. Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Zagreb, 2010.
- [9] Žmak Lj, Obrovac M, Katalinić-Janković V. First insights into the molecular epidemiology of tuberculosis in Croatia during a three-year period, 2009 to 2011. Scand J Infect Dis 2014; 46: 123–9.
- [10] European Centre for Disease Prevention and Control. Mastering the basics of TB control: Development of a handbook on TB diagnostic methods. Stockholm: ECDC; 2011.
- [11] Katalinic-Jankovic V, Furci L, Cirillo DM. Microbiology of *Mycobacterium tuberculosis* and a new diagnostic test for TB. U: Tuberculosis. European Respiratory Society Monograph 2012; 58: 1–13.
- [12] World Health Organization. Use of Liquid TB Culture and Drug Susceptibility Testing (DST) in Low and Medium Income Settings. Summary report of the Expert Group Meeting. Geneva, WHO, 2007.
- [13] Mäkinen J, Marjamäki M, Marttila H, Soini H. Evaluation of a novel strip test, GenoType Mycobacterium CM/AS, for species identification of mycobacterial cultures. Clin Microbiol Infect 2006; 12(5): 481–3.
- [14] Canetti G, Froman S, Grosset J i sur. Mycobacteria: laboratory methods for testing drug sensitivity and resistance. Bull WHO 1963; 29: 565–78.
- [15] Ling D, Zwerling AA, Pai M. GenoType MTBDR assays for diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: A meta-analysis. Eur Respir J 2008; 32: 1165–74.
- [16] Ignatyeva O, Kontsevaya I, Kovalyov A i sur. Detection of resistance to second-line antituberculosis drugs by use of the genotype MTBDRsl assay: a multicenter evaluation and feasibility study. J Clin Microbiol 2012; 50: 1593–7.
- [17] Boehme CC, Nicol MP, Nabeta P i sur. Feasibility, diagnostic accuracy, and effectiveness of decentralised use of the Xpert MTB/RIF test for diagnosis of tuberculosis and multidrug resistance: a multi-centre implementation study. Lancet 2011; 377: 1495–505.
- [18] Mack U, Migliori GB, Sester M i sur. LTBI: latent tuberculosis infection or lasting immune responses to *M. tuberculosis*? A TBNET consensus statement. Eur Respir J 2009; 33: 956–73.
- [19] Dacso CC. Skin Testing for Tuberculosis. U: Walker HK, Hall WD, Hurst JW, editors. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990. Chapter 47.
- [20] Diel R, Goletti D, Ferrara G i sur. Interferon- $\gamma$  release assays for the diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir J 2011; 37: 88–99.
- [21] Pai NP, Vadnais C, Denking C, Engel N, Pai M. Point-of-Care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low and middle-income countries. PLOS Med 2012; 9: e1001306. doi:10.1371/journal.pmed.1001306
- [22] Phillips M, Basa-Dalay V, Blais J i sur. Point-of-care breath test for biomarkers of active pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb) 2012; 92: 314–20.
- [23] Swaminathan S, Rekha VV. Antigen detection as a point-of-care test for TB: the case of lipoarabinomannan. Future Microbiol 2012; 7(5): 559–64.
- [24] Menzies D. Molecular methods for tuberculosis trials: time for whole-genome sequencing? Lancet Respir Med 2013; 1(10): 759–61.