

Nieuwe ontwikkelingen voor tuberculosedagnostiek bij kinderen

Else Bijker, Elisabeth Schölvinck

Samenvatting

De diagnostiek naar tuberculose is bij kinderen lastiger dan bij volwassenen vanwege het geringe aantal bacteriën en de invasieve methoden die meestal nodig zijn voor het verkrijgen van diagnostische materialen. Het accuraat en tijdig stellen van de juiste diagnose is cruciaal, omdat de prognose met behandeling goed is. Het ontwikkelen van nieuwe diagnostische middelen is historisch nooit een prioriteit geweest omdat jonge kinderen bijna nooit de bron voor transmissie van *Mycobacterium tuberculosis* zijn. Gelukkig is hier toenemend aandacht voor en zijn er hoopgevende ontwikkelingen. In dit artikel wordt een kort overzicht gegeven van het huidige diagnostische arsenaal en een perspectief voor mogelijkheden en kansen met behulp van nieuwe technieken in de nabije toekomst.

Summary

The diagnosis of tuberculosis in children is more complicated than in adults because of the paucibacillary nature of primary TB and the mostly invasive means and methods necessary to obtain representative specimens for microbiological workup. Development of TB diagnostics for children has historically never been a public health priority because they are not usually the source of *Mycobacterium tuberculosis* transmission. Fortunately, increasing attention to and inspiring developments in this field are on the horizon. This paper summarizes what is available now and gives a comprehensive overview of techniques and opportunities for the future of paediatric TB diagnosis.

Inleiding

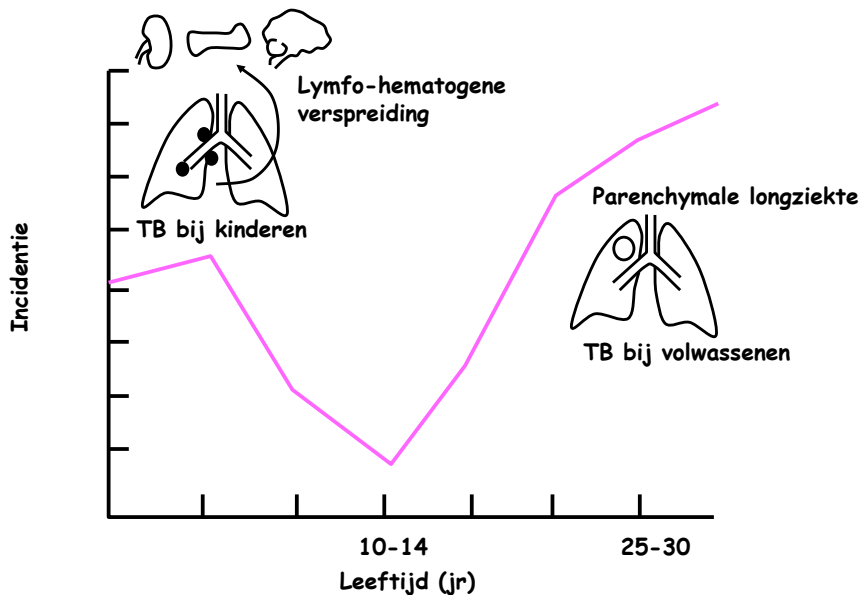
Jaarlijks krijgen 1,3 miljoen kinderen jonger dan 15 jaar tuberculose (tbc), van wie ongeveer de helft jonger is dan 5 jaar [1]. De transmissie van *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is op vrijwel alle leeftijden aerogeen. Desondanks is tbc bij jonge kinderen een andere ziekte dan bij adolescenten en volwassenen [2].

Primaire tbc bij kinderen is het gevolg van infectie van de terminale luchtwegen en disseminatie naar de hilaire lymfeklieren met als consequentie adenopathie (het 'primaire complex'). Dit laatste kan leiden tot compressie van bronchi en omliggend longweefsel. Dit is een paucibacillaire vorm van tbc met weinig aanleiding tot sputumproductie. Bovendien kunnen jonge kinderen (jonger dan vijf jaar) sputum niet goed ophoesten. Ze hebben daarnaast meer risico op hematogene verspreiding van de bacteriën en daarmee meer risico op extrapulmonale tbc dan gezonde volwassenen met een matuur immuunsysteem. Post-primaire tbc, zoals bij adolescenten en volwassenen, is in beginsel ziekte van het longparenchym met potentieel caviterende laesies, veel bacteriën en productieve hoest. De leeftijd waarop dit fenotype van de ziekte verandert is in het algemeen rond het begin van de puberteit, onafhankelijk van de regionale endemiciteit (zie *figuur 1, pagina 120*). Congenitale tbc is de enige uitzondering op aerogene transmissie: de besmetting verloopt hematogeen via de placenta en het primaire complex bevindt zich dan in de leverhilus.

Huidig perspectief van pediatrische tbc-diagnostiek

Kinderen zijn historisch gezien geen prioriteit binnen het tbc-onderzoek, mede omdat zij weinig bijdragen aan transmissie en daardoor minder belangrijk worden

MUMC+, MosaKids Kinderziekenhuis, afdeling Kindergeneeskunde, Maastricht, Nederland; University of Oxford, Oxford Vaccine Group, department of Paediatrics, Oxford, Verenigd Koninkrijk, dr. E.M. Bijker, kinderarts, fellow kinderinfectieziekten-immunologie. Beatrix Kinderziekenhuis / Universitair Medisch Centrum Groningen, dr. E.H. Schölvinck, kinderarts-infectioloog/immunoloog. Correspondentieadres: dr. E.H. Schölvinck (e.h.scholvinck@umcg.nl).



Figuur 1. Relatieve incidentie naar leeftijd en dominant fenotype van tuberculose (in figuur afgekort als TB).

geacht voor de publieke gezondheid. Nieuwe diagnostische testen worden veelal ontwikkeld en getest bij volwassenen en daarna per extrapolatie gebruikt voor kinderen, waarmee geen recht wordt gedaan aan de verschillen [3].

Tbc-diagnostiek kan globaal in drie groepen worden ingedeeld: pathogeengebaserde testen, gastheergebaserde testen en digitale technieken.

Pathogeengebaserde diagnostiek bij kinderen is beperkt door de moeilijkheid om representatieve monsters te verkrijgen waarbij, vanwege het geringe aantal bacteriën, de opbrengst van kweken ook laag is. Moleculaire technieken om *Mtb* aan te tonen hebben de afgelopen decennia winst opgeleverd en de optie om ook ontlasting als diagnostisch monster in te zetten betekent vooruitgang voor regio's met beperkte middelen. De specificiteit van Xpert Ultra op ontlasting is hoog (98 procent), maar de sensitiviteit is beperkt: 56 procent ten opzichte van kweek op een conventioneel monster (sputum of nuchtere maaginhoud) [4]. Het wordt daarom voor de Nederlandse setting niet aangeraden om een conventioneel monster te vervangen door ontlasting. De WHO adviseert in haar meest recente richtlijnen om, liever dan microscopie en kweek, primair moleculaire diagnostiek door middel van Xpert Ultra als diagnostische test voor tbc en detectie van rifampicineresistentie op maaginhoud of ontlasting in

te zetten alsook eventueel op (geïnduceerd) sputum of nasofaryngeaal aspiraat [5]. Hoewel we in Nederland zullen blijven streven naar materiaal voor kweek, blijft het verkrijgen van representatieve monsters bij jonge kinderen ook in onze setting vaak een uitdaging.

Bij gastheergebaserde testen wordt gezocht naar de immunologische reactie van de gastheer tegen *Mtb*. Bestaande voorbeelden hiervan zijn de huidtesten (Mantoux) en de Interferon-Gamma Release Assays (IGRAs: QuantiFERON-TB Gold Plus en T-Spot.TB). Ze hebben wisselende sensitiviteit en specificiteit en kunnen geen onderscheid maken tussen tbc-infectie (latente tbc) en actieve ziekte. De epidemiologische achtergrond van de patiënt is de belangrijkste factor voor de interpretatie van immunologische testen. Deze testen kunnen wel onderdeel zijn van de diagnostiek van zowel potentiële patiënten als de contacten van mensen met besmettelijke tbc. Tot die diagnostiek behoren ook de inventarisatie van klinische symptomen, X-thorax en het verkrijgen van diagnostische monsters voor microbiologisch onderzoek.

Nieuwe ontwikkelingen

Bij de ontwikkeling van nieuwe testen is een aantal factoren van belang. Niet alleen de diagnostische waarde (sensitiviteit, specificiteit, negatief en positief voorspellende waarde), maar ook de kosten, prak-

fische toepasbaarheid, betrouwbaarheid en de noodzaak voor apparatuur en training van personeel, spelen een rol bij de implementatiemogelijkheden in de dagelijkse praktijk.

[Pathogeengebaseerde testen](#)

Lipoarabinomannan (LAM) is een a glycolipide in de mycobacteriële celwand. Het is een virulentiefactor die bijdraagt aan het onderdrukken van de gastheer-afweerrespons, met name de macrofagen [6]. LAM wordt uitgescheiden in de urine en kan worden gebruikt in de diagnostiek van actieve tbc. Er is een laterale flow-immunochromatografische test beschikbaar (Alere Determine™ TB LAM Ag, AlereLAM; Abbott, Chicago, USA), waarmee LAM door middel van antistoffen gedetecteerd wordt. De test is simpel en goedkoop, maar heeft een suboptimale sensitiviteit, en is daarom niet geschikt in alle populaties. De sensitiviteit is hoger bij personen die leven met HIV, mogelijk vanwege een hogere bacteriële load en hogere kans op gedissemineerde ziekte, en de test wordt momenteel alleen voor die populatie aangeraden [7].

[Nieuwe urine-LAM-testen](#)

Er zijn diverse ontwikkelingen om de sensitiviteit van de urine-LAM-testen te verbeteren. Een voorbeeld hiervan is de Fujifilm SILVAMP TB LAM (FujiLAM, Tokyo, Japan), waarbij de detectie plaatsvindt door middel van monoklonale antistoffen met een hoge affiniteit en zilveramplificatie. In eerste studies bleek FujiLAM inderdaad een betere sensitiviteit te hebben ten opzichte van AlereLAM [8]. In volgende onderzoeken bleek echter dat er sprake was van onacceptabele variatie tussen verschillende partijen van de test, waardoor goedkeuring vertraging opliep. Fujifilm heeft inmiddels de oorzaak van deze variatie onderzocht en maatregelen genomen om constante kwaliteit te garanderen. Naar verwachting zullen begin 2025 voldoende data beschikbaar zijn voor WHO-beoordeling. Naast de FujiLAM zijn er diverse volgende generatie LAM-testen in ontwikkeling. Hierbij wordt gepoogd de diagnostische nauwkeurigheid te verbeteren door het optimaliseren van de detectietechniek of concentratie van de urine.

[Nieuwe point-of-care moleculaire assays](#)

Decentralisatie van tbc-diagnostiek heeft hoge prioriteit in lage- en middeninkomenslanden en snelle

moleculaire diagnostiek kan hier een rol in spelen. Het is belangrijk dat dit kan plaatsvinden in de primaire gezondheidscentra waar de meeste mensen zich melden. GeneXpert-instrumenten worden in lage- en middeninkomenslanden momenteel meestal op districtsniveau ingezet, vanwege de noodzaak tot betrouwbare elektriciteit, airconditioning en een stofvrije omgeving, waardoor transport van monsters noodzakelijk blijft, met vertraging en *loss-to-follow-up* als gevolg. Ook onderhoud van GeneXpert-instrumenten is duur en soms ontoereikend, waardoor instrumenten niet altijd beschikbaar zijn. Verschillende producenten zijn bezig met het ontwikkelen van instrumenten waarmee moleculaire diagnostiek daadwerkelijk bij de *point-of-care* verricht kan worden.

[Next-generation sequencing](#)

Next-generation sequencing kan gebruikt worden om het volledige mycobacteriële genoom in kaart te brengen of een selectie van relevante genen. Hiermee kunnen infecties met verschillende stammen en re-infecties met nieuwe stammen worden aangetoond en kunnen transmissieroutes in kaart worden gebracht. Gerichte sequencing is een belangrijk hulpmiddel voor gevoeligheidsbepalingen door het uitgebreid in kaart brengen van delen van het genoom met mutaties die ten grondslag liggen aan resistentievorming. Hoewel deze technologie relatief duur is en expertise en robuuste bio-informatica nodig zijn voor het verwerken en interpreteren van de resultaten, is de capaciteit voor dergelijke diagnostiek door de COVID-19-pandemie flink toegenomen en breder beschikbaar in hoge-inkomenslanden.

[Celvrij DNA, Mtb-peptiden en exosomen](#)

Celvrij DNA is extracellulair, ongebonden DNA dat in verschillende lichaamsvochten aanwezig is. Celvrij DNA afkomstig van *Mtb* kan worden aangetoond in plasma, urine, liquor, ascites en pleuravocht, met wisselende sensitiviteit [9]. Data van kinderen zijn nog beperkt maar veelbelovend, mede omdat tbc bij kinderen vaker extrapulmonaal of gedissemineerd is. CFP-10 en ESAT-6 zijn peptiden van de *Mtb*. Hoewel deze slechts in zeer lage concentraties in het bloed aanwezig zijn, kunnen ze gedetecteerd worden met behulp van nanodisks met antistoffen en massaspectrometrie [10]. Dit is nog slechts in kleine studies aangetoond, en momenteel vindt validatie in grotere studies plaats. Exosomen zijn kleine vesikels die

worden uitgescheiden door verschillende celtypes. Cellen die geïnfecteerd zijn met *Mtb* scheiden specifieke exosomen uit die kunnen worden aangetoond bij personen met tbc, maar er is nog een lange weg te gaan voordat dit kan worden toegepast als diagnostische test [11].

[Gastheergebaseerde testen](#) [Transcriptomics](#)

De laatste jaren zijn er diverse studies gedaan naar genexpressie middels mRNA in bloed voor gebruik als diagnosticum [12]. In een studie met bijna 3000 kinderen in Zuid-Afrika, Malawi en Kenia, bijvoorbeeld, werd een set van 51 transcripten geïdentificeerd waarmee tbc van andere infecties kon worden onderscheiden met een sensitiviteit van 83 procent en een specificiteit van 84 procent [13]. Op basis van een multicohort meta-analyse werden drie genen geïdentificeerd die, samen als *signature*, actieve tbc konden onderscheiden van latente tbc (area under ROC curve 0,88) en van andere ziekten [14].

In deze studies werden microarrays, RNA-sequencing of PCR gebruikt, technieken die niet toegankelijk noch op te schalen zijn voor gebruik in endemische landen. Vertaling naar een eenvoudig en bruikbaar platform is dus nodig voor implementatie. Dit is gedaan met de 3-genen *signature* van Sweeney et al: Cepheid heeft een cartridge ontwikkeld waarmee op het GeneXpert-platform de expressie van deze drie genen in bloed gemeten kan worden. In een eerste studie onder volwassenen in Zuid-Afrika, Gambia, Oeganda en Vietnam kon deze test goed onderscheid maken tussen tbc en andere respiratoire aandoeningen, met een sensitiviteit van 90 procent en een specificiteit van 86 procent [15]. Hiermee voldoet deze test aan de WHO-criteria voor een triagetest [16]. De data van kinderen zijn minder veelbelovend, met een sensitiviteit van 42 procent en specificiteit van 90 procent [17]. Gezien de verschillen in pathofysiologie tussen volwassenen en kinderen, zal het ontwikkelen van een specifieke *signature* voor kinderen waarschijnlijk noodzakelijk zijn.

[Verbeterde Mantoux, IGRAs en T-celstimulatieassays](#)

Hoewel IGRAs specifiek zijn voor tbc dan de Mantouxtest, vereisen zij een laboratorium en getrainde laboranten, zijn ze relatief kostbaar en is er relatief veel bloed voor nodig. Dit maakt toepassing van IGRAs in endemische landen niet eenvoudig. Vanwege

deze tekortkomingen worden pogingen gedaan om de toepasbaarheid van dit soort assays te vergroten.

Voor de Mantouxtest wordt momenteel *Purified Protein Derivate* (PPD) gebruikt, een mix van antigenen van *Mtb*. Voor de huidige IGRAs worden de eiwitten ESAT-6 en CFP-10 gebruikt. Een manier om deze testen te verbeteren is het aanpassen van de gebruikte antigenen. Zo zijn er huidtesten ontwikkeld waarbij geen PPD, maar ESAT-6 en CFP-10 of andere *Mtb*-specifieke eiwitten gebruikt worden, waardoor er minder kruisreactiviteit is met niet-tuberculeuze mycobacteriën. Deze testen worden inmiddels door de WHO aanbevolen [18].

Ook voor IGRAs worden experimenten gedaan met het toevoegen van andere antigenen. Of dit inderdaad de prestatie van de assays ten goede komt, wordt nog onderzocht. Behalve het aanpassen van de antigenen kunnen ook andere cytokines, die geproduceerd worden in de stimulatie-assays, gemeten worden in aanvulling op interferon-gamma [19]. Er is nog geen consensus welk cytokine, of welke combinaties van cytokines het best gebruikt kan worden en of hiermee onderscheid gemaakt kan worden tussen tbc-infectie en tbc-ziekte. Een laatste verbetering is het toegankelijker maken van de IGRAs op basis van een vereenvoudiging of automatisering van een deel van het proces, zodat geen uitgebreide laboratoriuminfrastructuur meer nodig is en deze test ook in primaire gezondheidsfaciliteiten gedaan kan worden.

Waarbij IGRAs de hoeveelheid geproduceerde interferon-gamma meten, kan na stimulatie met tbc-antigenen ook in meer detail gekeken worden naar het fenotype van de T-cellen die deze en andere cytokines produceren, door middel van oppervlaktemarkers zoals CD27 en CD38. Met dit zogeheten *T-cell activation marker-tuberculosis (TAM-TB)*-assay kan mogelijk onderscheid gemaakt worden tussen tbc-infectie en actieve ziekte [20], maar meer onderzoek is nodig bij zowel volwassenen als kinderen.

[Digitale technieken](#)

[Computer-aided detection en kunstmatige intelligentie](#)

Voor volwassenen zijn met behulp van kunstmatige intelligentie *computer-aided detection* algoritmes ontwikkeld die thoraxröntgenfoto's kunnen beoordelen. Dit wordt sinds 2021 door de WHO aanbevolen voor screening en triage [21]. Er zijn initiatieven om op korte termijn ook voor kinderen een betrouwbaar algoritme te ontwikkelen.

[Point-of-care echo ultrasound](#)

Point-of-care ultrasound (POCUS) neemt een steeds grotere plek in de klinische praktijk in voor allerlei uiteenlopende toepassingen. POCUS voor de diagnostiek van tbc staat nog in de kinderschoenen. Specificiteit van longafwijkingen en de complexiteit van het aantonen van mediastinale lymfklieren zijn belangrijke struikelblokken, maar eerste studies zijn veelbelovend gebleken en vervolgstudies worden momenteel uitgevoerd [22].

[Analyse van long- en hoestgeluiden](#)

Verschillende apps en digitale stethoscopen zijn ontwikkeld voor de analyse van hoest- en longgeluiden met behulp van kunstmatige intelligentie. Begrijpelijkerwijs is de specificiteit van dit soort technologieën vaak beperkt, in een aantal eerste kleine studies was de diagnostische nauwkeurigheid van apps die hoestgeluiden analyseerden wel adequaat met een voldoende hoge sensitiviteit om als triagetest te dienen [23]. Het is moeilijk voorstelbaar dat dergelijke tools voldoende specificiteit en sensitiviteit bij kinderen zullen hebben vanwege de specifieke klinische presentatie, maar onderzoek moet dit uitwijzen.

[Gebruik van alternatieve monsters](#)

Gebruik van bestaande moleculaire testen op niet-sputummonsters

Omdat jonge kinderen niet spontaan sputum kunnen ophoesten en er voor sputuminductie en verzamelen van nuchtere maaginhoud apparatuur, materialen en getraind personeel nodig zijn, wordt veel onderzoek gedaan naar nieuwe testen die andere lichaamsmaterialen gebruiken. Ontlasting is een goed voorbeeld hiervan (hierboven al genoemd). Een ander voorbeeld is het gebruik van mond- of tongswabs, waarbij met automatische moleculaire testen gezocht wordt naar *Mtb*. Het grote voordeel hiervan is het minimaal invasieve karakter, de snelheid en de mogelijkheid tot zelfbemonstering. Voorsnog is de sensitiviteit echter beperkt en de rol van deze monsters in de diagnostiek cascade zal nog vorm moeten krijgen [19].

[Ademtesten](#)

Onderzoek van de ademlucht is een andere niet-invasieve mogelijkheid en is onder te verdelen in twee soorten testen. Ten eerste kan gekeken worden naar

vluchtige organische stoffen (*volatile organic compounds*, VOC's), die afkomstig zijn van de bacterie (*Mtb*-metabolieten) of de gastheer (als gevolg van de inflammatie). De gouden standaard voor het detecteren van VOC's is massaspectrometrie, maar dit is niet toepasbaar in de praktijk. Er zijn daarom zogenaamde 'e-neuzen' ontwikkeld, draagbare apparaten op batterijen die VOC's met behulp van een beperkt aantal sensoren kunnen detecteren. Een tweede manier om uitademingslucht te onderzoeken is om met behulp van mond-neusmaskers aerosolen op te vangen en hierin door middel van moleculaire technieken naar *Mtb* te zoeken. Beide methodes zijn veelbelovend gezien het non-invasieve karakter, maar studies bij kinderen zijn nog beperkt [24].

Conclusie

Ondanks de belangrijke vooruitgang die de afgelopen jaren is geboekt op het gebied van diagnostische technieken voor tbc, blijft het *paucibacillaire* karakter bij kinderen een horde om de ziekte microbiologisch te bevestigen. Er is echter hoop dat met nieuwe technieken hierin stappen vooruit gemaakt worden en dat toenemende inzichten in specifieke pediatrie gastheerfactoren gebruikt kunnen worden om immunologische en digitale methodes te ontwikkelen en te optimaliseren. De kans op het vinden van een 'heilige graal', een enkele test met goede sensitiviteit en specificiteit, is klein; verbetering zal moeten worden gezocht in een slimme combinatie van testen met complementaire eigenschappen en het verbeteren van de toegankelijkheid van beschikbare testen.

Referenties

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2023. 2023.
2. Perez-Velez CM, Marais BJ. Tuberculosis in children. *N Engl J Med*. 2012;367(4):348-61.
3. Bijker EM, Horn L, LaCourse S, et al. The inclusion of children and adolescents in tuberculosis diagnostic development and evaluation—a consensus statement. *Lancet Infect Dis*. 2024.
4. Kay AW, Ness T, Verkuijl SE, et al. Xpert MTB/RIF Ultra assay for tuberculosis disease and rifampicin resistance in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2022;9(9):Cd013359.
5. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 5: management of tuberculosis in children and adolescents: World Health Organization; 2022.
6. Correia-Neves M, Nigou J, Mousavian Z, et al. Immunological hyporesponsiveness in tuberculosis: The role of mycobacterial glycolipids. *Front Immunol*. 2022;13:1035122.
7. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis-rapid diagnostics for tuberculosis

detection: World Health Organization; 2020.

8. Broger T, Sossen B, du Toit E, et al. Novel lipoarabinomannan point-of-care tuberculosis test for people with HIV: a diagnostic accuracy study. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(8):852-61.

9. Yu G, Shen Y, Ye B, et al. Diagnostic accuracy of *Mycobacterium tuberculosis* cell-free DNA for tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2021;16(6):e0253658.

10. Liu C, Zhao Z, Fan J, et al. Quantification of circulating *Mycobacterium tuberculosis* antigen peptides allows rapid diagnosis of active disease and treatment monitoring. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(15):3969-74.

11. Biadglegne F, König B, Rodloff AC, et al. Composition and clinical significance of exosomes in tuberculosis: a systematic literature review. *J Clin Med.* 2021;10(1):145.

12. Hamada Y, Penn-Nicholson A, Krishnan S, et al. Are mRNA based transcriptomic signatures ready for diagnosing tuberculosis in the clinic?—A review of evidence and the technological landscape. *EBioMedicine.* 2022;82.

13. Anderson ST, Kaforou M, Brent AJ, et al. Diagnosis of childhood tuberculosis and host RNA expression in Africa. *N Engl J Med.* 2014;370(18):1712-23.

14. Sweeney TE, Braviak L, Tato CM, et al. Genome-wide expression for diagnosis of pulmonary tuberculosis: a multicohort analysis. *Lancet Resp Med.* 2016;4(3):213-24.

15. Sutherland JS, van der Spuy G, Gindeh A, et al. Diagnostic accuracy of the Cepheid 3-gene host response fingerstick blood test in a prospective, multi-site study: interim results. *Clin Infect Dis.* 2022;74(12):2136-41.

16. World Health Organization. High priority target product profiles for new tuberculosis diagnostics: report of a consensus meeting, 28-29

April 2014, Geneva, Switzerland. World Health Organization; 2014.

17. Olbrich L, Verghese VP, Franckling-Smith Z, et al. Diagnostic accuracy of a three-gene *Mycobacterium tuberculosis* host response cartridge using fingerstick blood for childhood tuberculosis: a multicentre prospective study in low-income and middle-income countries. *Lancet Infect Dis.* 2024;24(2):140-9.

18. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 3: diagnosis. Tests for TB infection. 2022.

19. Suzukawa M, Akashi S, Nagai H, et al. Combined analysis of IFN-gamma, IL-2, IL-5, IL-10, IL-1RA and MCP-1 in QFT supernatant is useful for distinguishing active tuberculosis from latent infection. *PLoS One.* 2016;11(4):e0152483.

20. Portevin D, Moukambi F, Clowes P, et al. Assessment of the novel T-cell activation marker–tuberculosis assay for diagnosis of active tuberculosis in children: a prospective proof-of-concept study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(10):931-8.

21. World Health Organization. WHO consolidated guidelines on tuberculosis. Module 2: screening-systematic screening for tuberculosis disease: World Health Organization; 2021.

22. Heuvelings CC, Bélard S, Andronikou S, et al. Chest ultrasound compared to chest X-ray for pediatric pulmonary tuberculosis. *Pediatr Pulmonol.* 2019;54(12):1914-20.

23. Zimmer AJ, Ugarte-Gil C, Pathri R, et al. Making cough count in tuberculosis care. *Communications Medicine.* 2022;2(1):83.

24. Bobak CA, Kang L, Workman L, et al. Breath can discriminate tuberculosis from other lower respiratory illness in children. *Scientific Reports.* 2021;11(1):2704.