

IDENTIFIKASI *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* DENGAN UJI *XPERT MTB/RIF* PADA *FORMALIN-FIXED PARAFFIN EMBEDDED* (*FFPE*) TUBERKULOSIS EKSTRAPARU

¹Fairuz Fairuz, ²Humaryanto

¹Bagian Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Jambi

²Bagian Bedah, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Jambi

fairuz.quzwain@gmail.com

ABSTRAK

Tuberkulosis ekstra paru (TBEP) adalah suatu penyakit yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*MTB*) pada jaringan diluar paru, yang secara mikroskopis banyak menyerupai infeksi kronis oleh penyebab yang lain. Di negara-negara berkembang, identifikasi TBEP pada sampel jaringan yang ditanam dalam bentuk *Formalin-Fixed Paraffin Embedded (FFPE)* merupakan sebuah tantangan dan sampai saat ini terdapat upaya bersama untuk mengevaluasi diagnostik molekuler baru untuk mendiagnosis keberadaan infeksi bakteri *MTB* dalam berbagai sampel. Uji *XpertMTB/RIF* adalah salah satu teknologi yang paling mendukung dalam mendeteksi *MTB*. Tujuan kami adalah untuk identifikasi gambaran *MTB* dengan uji *Xpert MTB/RIF* guna diagnosis TBEP pada jaringan *FFPE* yang diproses secara rutin. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif komparatif, berbasis laboratorium retrospektif. Total sampel diambil sebanyak 43 sampel TBEP yang memenuhi kriteria penelitian dan disimpan di laboratorium patologi anatomi dari Rumah Sakit Provinsi Jambi tahun 2018-2020, kemudian dilakukan uji *Xpert MTB/RIF*, bersamaan dengan pewarnaan *Ziehl-Nielsen (ZN)* pada sampel *FFPE*. Ditemukan sebanyak 43 sampel jaringan manusia *FFPE* dari beberapa jenis organ yaitu kelenjar getah bening (n=31), tulang (n=2), ovarium (n=1), payudara (n=4), testis (n=2), parotis (n=1), usus besar (n=1) dan jaringan lunak (n=1). Pewarnaan *Ziehl Nielsen* positif untuk *MTB* pada 41,9% kasus, dan uji *Xpert MTB/RIF* positif untuk TB pada 55,8% kasus. Kesimpulan: Ditemukan gambaran *MTB* dengan Uji *Xpert MTB/RIF* pada jaringan *FFPE* tuberkulosis ekstra paru, tetapi dengan nilai akurasi yang sangat lemah secara statistik

Kata Kunci : *Mycobacterium Tuberculosis*, *Xpert MTB/RI*, *Formalin-Fixed Paraffin Embedded*, Tuberkulosis Ekstra Paru

ABSTRACT

Extra pulmonary tuberculosis (TPEB) is a disease caused by Mycobacterium tuberculosis (MTB) in tissue outside the lungs, which microscopically resembles chronic infections from other causes. In developing countries, the identification of EPTB in Formalin-Fixed Paraffin Embedded (FFPE) tissue samples is a challenge and to date there are concerted efforts to evaluate new molecular diagnostics to diagnose the presence of MTB bacterial infection in various samples. The XpertMTB/RIF test is one of the most supportive technologies in detecting MTB. Our aim was to describe the identification of MTB with the Xpert MTB RIF assay for the diagnosis of EPTB in routinely processed FFPE tissue. This research is a comparative descriptive study, retrospective laboratory-based. A total of 43 TBEP samples were taken that met the research criteria and stored in the anatomical pathology laboratory of the Jambi Provence Hospital in 2018-2020, then the Xpert MTB/RIF test was carried out, along with Ziehl-Nielsen (ZN) staining on the FFPE samples. A total of 43 FFPE human tissue samples were found from several types of organs, namely lymph nodes (n=31), bones (n=2), ovaries (n=1), breasts (n=4), testes (n=2), parotid (n=1), colon (n=1) and soft tissue (n=1). Ziehl Nielsen stain was positive for MTB in 41.9% of cases, and the Xpert MTB RIF assay was positive for TB in 55.8% of cases. Conclusion: Mycobacterium Tuberculosis identification was found using the Xpert MTB/RIF Test on extra-pulmonary tuberculosis FFPE tissue, but with a very weak statistical accuracy value.

Keywords : *Mycobacterium Tuberculosis*, *Xpert MTB/RIF*, *Formalin-Fixed Paraffin Embedded* Extrapulmonary tuberculosis

PENDAHULUAN

Tuberkulosis (TB) merupakan salah satu penyakit menular yang ini disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* (*MTB*).

Penyakit ini terutama ditemukan di paru-paru (TBP) namun bentuk penyakit yang lebih lanjut dapat menyerang organ dan jaringan lain atau disebut TB ekstra paru (TBEP). Organisasi

kesehatan dunia atau *World Health Organization* (WHO) yang menunjukkan bahwa kasus tuberkulosis pada tahun 2018 (menggabungkan data untuk orang dewasa dan anak-anak) terdapat sekitar 10,5 juta kasus TB dan 1,5 juta kasus kematian TB, dimana 400.000 diantaranya terjadi pada pasien koinfeksi dengan *human immunodeficiency virus* (HIV). (Report, 2018) Di rumah sakit pendidikan Universitas Lusaka, Zambia, dilaporkan sejumlah besar kasus TB yang tidak terdiagnosis dan TB yang resisten terhadap berbagai obat sangat berdampak pada pasien yang terinfeksi HIV dan tidak terinfeksi, dengan kultur TB aktif terdeteksi pada hingga 10% pasien dewasa. (Park *et al.*, 2012; Polepole *et al.*, 2017) Pada awalnya, infeksi primer penyakit ini diperkirakan sebagian besar bersifat subklinis, kemudian terjadi reaktivasi infeksi laten atau akibat infeksi ulang. Reaktivasi sangat terkait dengan immunosupresi, khususnya akibat infeksi HIV, meskipun sebagian besar pasien TB aktif secara global adalah HIV-negatif, mengalami depresi, kurang gizi, stres, dan mungkin memiliki faktor genetik yang terkait dengan perkembangan penyakit aktif. (Cortez *et al.*, 2011) Salah satu masalah terbesar dalam mendiagnosis TB dengan tepat di negara-negara berkembang adalah alat dan strategi diagnostik yang tersedia saat ini tidak memadai untuk dengan mudah menangkap semua kasus TB aktif. (Chanda-Kapata *et al.*, 2015) Tantangan-tantangan ini sangat jelas di provinsi Jambi yang mempunyai beban TB aktif tinggi, dimana baik di masyarakat maupun di rumah sakit, banyak kasus TB aktif dan TB yang resisten terhadap obat masih belum terdiagnosis. Saat ini, kultur MTB dari sampel biopsi jaringan di beberapa laboratorium telah tersedia, namun membutuhkan sumber daya yang intensif, memerlukan fasilitas laboratorium *Biosafety Level-3* (BSL-3), memerlukan spesimen segar dan steril, dan hanya rutin dilakukan di rumah sakit besar yang melayani penelitian. Salah satu modalitas pengujian adalah pengujian dengan Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA), yang merupakan pengujian reaksi berantai polimerase (PCR) berbasis kartrid terintegrasi yang telah dirancang untuk menggunakan teknologi suar molekuler untuk mendeteksi spesifik tanda molekuler dari salah satu kompleks MTB, namun tidak dapat menentukan secara lebih spesifik strain *Mycobacterium* lainnya. Uji ini terutama dirancang untuk diagnosis TB pada spesimen dahak dan mendapat dukungan WHO pada tahun 2010, sebagai alat diagnostik awal untuk resisten obat terkait MTB atau HIV, dan sebagai diagnosis lanjutan dari dugaan TB negatif. (Masaki Yamamoto *et al.*, 2018; Rindi *et al.*, 2017; Lawn *et al.*, 2015) Pemeriksaan ini telah dievaluasi secara luas dengan menggunakan dahak dan spesimen pernapasan lainnya, baik

pada orang dewasa maupun anak-anak, dan secara luas dianggap dua kali lebih sensitif dibandingkan pemeriksaan apusan dibawah mikroskop, menggunakan kultur sebagai standar emas, mendiagnosis lebih dari 80% kultur yang dikonfirmasi TBP. Para peneliti juga telah mulai menggunakan uji *Xpert MTB/RIF* untuk mendeteksi MTB pada spesimen non-pernapasan, namun untuk kondisi blok parafin dengan identifikasi praanalitik yang buruk, sangat sulit untuk mengidentifikasi MTB. Pengolah jaringan segar atau jaringan yang berbentuk FFPE merupakan bahan penelitian diagnostik yang penting karena tidak menular, memiliki arsitektur seluler yang lebih terpelihara, dan karenanya cocok untuk evaluasi morfologi dan dapat disimpan untuk waktu yang lama, membuatnya berguna untuk penelitian retrospektif. (Surat *et al.*, 2014; Lawn *et al.*, 2015; Kohli *et al.*, 2017) Di sini, kami mengevaluasi pengujian *Xpert MTB/RIF* untuk mendeteksi MTB pada kasus TBEP dalam serangkaian spesimen biopsi FFPE yang diwarnai dan didiagnosis dengan histopatologi rutin sebagai proses spesifik.

METODE

Kami melakukan penelitian deskriptif komparatif, berbasis laboratorium dengan data retrospektif untuk membandingkan keakuratan uji *Xpert MTB/RIF* untuk diagnosis TBEP pada spesimen biopsi FFPE dengan histologi sebagai standar emas. Penelitian dilakukan di Rumah Sakit di Provinsi Jambi terhadap spesimen rutin yang dikumpulkan pada tahun 2018-2020. Total sampel diambil yaitu sebanyak 46 sampel FFPE, tetapi hanya 43 sampel yang memenuhi kriteria penelitian. Semua sampel dilakukan pemeriksaan histologi, ZN dan *Xpert MTB/RIF*. Analisis statistik dilakukan dengan perangkat lunak SPSS *for windows* (V.24.0), dengan tingkat signifikansinya berdasarkan $p < 0,05$. Penelitian ini dilakukan dengan persetujuan peninjau etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Jambi dengan no. Ref. 456/UN21.8/PT.01.04/2020

Histologi dan Pewarnaan ZN

Blok parafin didinginkan dalam pendingin selama 30 menit, kemudian dipotong dengan mikrotom manual yang telah dibersihkan pada masing-masing sampel blok secara keseluruhan menggunakan *Xylene*. Untuk menjaga sterilitas, setiap blok parafin dilakukan satu per satu, dibersihkan untuk meminimalkan potensi kontaminasi silang DNA, dan pisau mikrotom yang digunakan disterilkan. Blok parafin dipotong setebal 5 m untuk diagnosis histologis yang diwarnai dengan hematoksilin dan eosin, satu hingga lima pita diperoleh untuk pewarnaan ZN, dan setebal 10 m dipotong untuk uji *Xpert MTB/RIF*. Pemeriksaan mikroskopis slaid

pewarnaan hematoksilin dan eosin dilakukan oleh 2 orang ahli patologi.

Uji Xpert MTB/RIF

Setelah sampel parafin dideparafinisasi dan dehidrasi, sampel parafin dituangkan ke dalam tabung yang berisi butiran silika gel, dan ditambahkan 1000 L air suling. Jaringan kemudian dihancurkan dengan cara divorteks selama 15 menit, setelah itu 1000 L homogenat jaringan dicampur dengan 2000 L reagen *Gene Xpert* (Axon Lab Baden, Swiss) dan didiamkan selama 25 menit. Sekitar 2000 L campuran ini kemudian dianalisis dengan uji *Xpert MTB/RIF* (Cepheid) sesuai dengan petunjuk produk. (Maurya *et al.*, 2011; Rindi *et al.*, 2017)

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 43 sampel jaringan manusia FFPE diperoleh antara tahun 2018 hingga 2020 dengan karakteristik pasien yang terlibat dalam penelitian ini ditunjukkan pada Tabel 1. Usia rata-rata subjek yang terdaftar adalah 28,18±13,007 tahun (25 hingga 59 tahun) dan lebih banyak terjadi pada laki-laki (51,2%). Jaringan FFPE diperoleh dari beberapa jenis organ antara lain kelenjar getah bening (n=31), tulang (n=2), ovarium (n=1), payudara (n=4), testis (n=2), parotis (n= 1), usus besar (n=1) dan jaringan lunak (n=1).

Tabel 1. Karakteristik Sampel

Variabel	N = 43
Usia (thn)	
Rata-rata±Std	28.18±13.007
Median	32.00
Rentang (min-maks)	25.00-59.00
Jenis Kelamin	
Laki-laki	22(51.2%)
Perempuan	21(48.8%)
Lokasi	
Kelenjar Getah Bening	31(72.1%)
Tulang	2(4.7%)
Ovarium	1(2.3%)
Payudara	4(9.3%)
Testis	2 (4.7%)
Parotis	1 (2.3%)
kolon	1(2.3%)
Jaringan ikat	1(2.3%)

Tabel 2 menjelaskan perbandingan proporsi antara kelenjar getah bening (KGB) dan non-kelenjar getah bening. Untuk analisis data kategorikal, ZN pada tabel di atas diuji menggunakan uji statistik *Chi square*. Hasil uji statistik *Chi square* pada kelompok penelitian di atas memperoleh informasi bahwa *p value* pada variabel ZN lebih besar dari 0,05 (*P value* > 0,05) yang berarti tidak signifikan secara statistik atau tidak signifikan secara statistik, dengan demikian dapat dijelaskan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan secara statistik antara persentase

variabel ZN dengan kriteria organ, namun analisis *Xpert MTB/RIF* mempunyai signifikansi statistik (0,048). Hal ini sesuai dengan penelitian oleh Van Rie dkk, yang juga menemukan adanya hubungan yang signifikan ditemukannya MTB pada sampel KGB. (Van Rie *et al.*, 2013)

Tabel 2 Perbandingan Proporsi ZN dan Xpert MTB/RIF pada KGB dan Non-KGB

Variabel	Lokasi			p
	KGB n=31	Non-KGB n=12	Total n=43	
ZN				
Positif	10	8	18	0.756
Negatif	(32.2%)	(66.7%)	(41.9%)	
	21	4	25(58.1%)	
	(76.8%)	(33.3%)		
Xpert MTB/RIF				
Positif	18(58.1%)	6(50.0%)	24(55.8%)	0.048**
Negatif	13(41.9%)	6(50.0%)	19	
			(44.2%)	

KGB = Kelenjar getah bening

Tabel 3 menjelaskan perbandingan proporsi antara hasil *Xpert MTB/RIF* dan *Ziehl Nielsen*. Berdasarkan nilai sensitivitas di atas, sebesar 37,5.0% menunjukkan nilai sensitivitas yang sangat lemah secara statistik, sedangkan nilai spesifisitas sebesar 89.5% menunjukkan nilai spesifisitas yang sangat kuat secara statistik. Untuk Nilai Prediktif Positif (PPV) di atas yaitu sebesar 81,8% menunjukkan nilai Prediksi Positif (NDP) yang sangat kuat, sedangkan Nilai Prediktif Negatif (NPV) sangat lemah yaitu sebesar 27,3% pada uji diagnostik ini. Nilai akurasi sebesar 53,1% menunjukkan tingkat nilai akurasi yang sangat lemah secara statistik. Hasil penelitian ini dianalisis dengan mempertimbangkan beberapa keterbatasan seperti terbatasnya jumlah data klinis, beberapa spesimen blok parafin tidak memenuhi kriteria sehingga banyak sampel yang dikeluarkan dari sampel penelitian, dan hanya penelitian berbasis laboratorium, tidak dibandingkan dengan data klinis. Kami tidak memiliki data apakah pasien mempunyai riwayat resistensi terhadap pengobatan, riwayat kekambuhan, atau adanya kondisi imunokompromais seperti HIV. Penelitian ini juga tidak menggunakan variabel kultur kuman tuberkulosis karena data yang diambil bersifat retrospektif. Nilai yang diperoleh rendah pada pemeriksaan menggunakan pewarnaan ZN dibandingkan dengan pemeriksaan *Xpert MTB/RIF*, padahal tingkat akurasi *Xpert MTB/RIF* juga kurang akurat. Beberapa penelitian juga menemukan bahwa pewarnaan ZN jarang mendeteksi basil tahan

asam pada kasus TB yang dikonfirmasi secara histologis dan menganalisis nilai klinisnya yang terbatas sebagai alat diagnostik. Mirip dengan penelitian ini, walaupun spesifisitasnya sangat tinggi, pewarnaan ZN tidak spesifik untuk MTB dan slaid yang memenuhi kriteria untuk TB juga dapat menunjukkan adanya mikobakteri non-TB (NTM) (Azov, Koch and Hamilton-Dutoit, 2005; Rindi *et al.*, 2017) Sebuah studi surveilans nasional di Zambia menemukan prevalensi NTM pada 1.477/100.000 penduduk, lebih dari 3 kali lebih tinggi dibandingkan prevalensi TB (455/100.000 penduduk). (Bates and Zumla, 2016) Penelitian yang menggunakan kultur sebagai standar utama namun menerapkan diagnostik molekuler terhadap spesimen histologis berpotensi menghasilkan diagnosis hanya dalam beberapa hari, dibandingkan dengan berminggu-minggu untuk kultur. Hanya ada satu penelitian sebelumnya dalam literatur yang menggunakan uji *Xpert MTB/RIF* untuk mendeteksi MTB pada jaringan FFPE (terutama jaringan paru-paru), membandingkan kinerjanya dengan Artus M. tuberculosis RG-PCR di antara kasus TB yang dikonfirmasi secara histopatologis.

Tabel 3. Proporsi antara Hasil *Xpert MTB/RIF* dan *Ziehl Nielsen (ZN)*

Variabel	<i>Xpert MTB/RIF</i>		p
	Positif N=24	Negatif N=19	
ZN			0.047**
Positif	9 (37.5%)	2(10.5%)	
Negatif	15(62.5%)	17(89.5%)	

Dalam penelitian yang dilakukan di Zambia, ditunjukkan bahwa penggunaan uji *Xpert MTB/RIF* pada jaringan FFPE disimpulkan berlebihan pada spesimen yang menjalani histopatologi rutin meskipun deteksi cepat resistensi rifampisin dapat memberikan informasi klinis dan penggunaan *Xpert Uji MTB/RIF* mungkin diperlukan pada spesimen jaringan tertentu, atau dari kelompok pasien tertentu, dimana prevalensi TBEP yang resisten terhadap rifampisin tinggi. (Dusthacker *et al.*, 2015; Polepole *et al.*, 2017) Ditemukan juga bahwa pengujian ini dapat mendeteksi resistensi rifampisin pada 27% spesimen *Xpert MTB*-positif dan memiliki hasil resistensi rifampisin yang valid, namun hasil ini menjadi rumit oleh sejumlah besar hasil yang tidak jelas, mungkin mewakili beberapa aspek persiapan spesimen yang mungkin berpengaruh melemahkan aspek *Xpert MTB/RIF*, sehingga dalam beberapa penelitian, tes *Xpert MTB/RIF* mungkin merupakan alat diagnostik yang berguna untuk mendeteksi resistensi rifampisin dengan cepat

pada spesimen jaringan FFPE, namun sensitivitas keseluruhannya terlalu rendah untuk memerlukan penggantian histopatologis.

KESIMPULAN

Ditemukan gambaran MTB dengan *Uji Xpert MTB/RIF* pada jaringan FFPE tuberkulosis ekstra paru, tetapi dengan nilai akurasi yang sangat lemah secara statistik. Dilakukan identifikasi MTB dengan uji *Xpert MTB/RIF* pada sampel jaringan segar untuk menghindari kemungkinan kerusakan materi DNA pada FFPE

DAFTAR PUSTAKA

- Azov, A.G., Koch, J. and Hamilton-Dutoit, S.J. (2005) 'Improved diagnosis of mycobacterial infections in formalin-fixed and paraffin-embedded sections with nested polymerase chain reaction', *APMIS*, 113(9). Available at: https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm_234.x.
- Bates, M. and Zumla, A. (2016) 'The development, evaluation and performance of molecular diagnostics for detection of *Mycobacterium tuberculosis*', *Expert Review of Molecular Diagnostics*. Available at: <https://doi.org/10.1586/14737159.2016.1139457>.
- Chanda-Kapata, P. *et al.* (2015) 'Non-tuberculous mycobacteria (NTM) in Zambia: Prevalence, clinical, radiological and microbiological characteristics', *BMC Infectious Diseases*, 15(1). Available at: <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1264-6>.
- Cortez, M.V. *et al.* (2011) '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*, 86(5). Available at: <https://doi.org/10.1590/s0365-05962011000500010>.
- Dusthacker, A. *et al.* (2015) 'Drug resistance among extrapulmonary TB patients: Six years experience from a supranational reference laboratory', *Indian Journal of Medical Research*, 142(NOVEMBER). Available at: <https://doi.org/10.4103/0971-5916.171284>.
- Kohli, M. *et al.* (2017) 'Xpert® MTB/RIF assay for extrapulmonary tuberculosis and rifampicin resistance', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2017(8). Available at: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD012768>
- Lawn, S.D. *et al.* (2015) 'Rapid microbiological screening for tuberculosis in HIV-positive patients on the first day of acute hospital admission by systematic testing of urine samples using *Xpert MTB/RIF*: A prospective cohort in South Africa', *BMC*

- Medicine*, 13(1). Available at:
<https://doi.org/10.1186/s12916-015-0432-2>.
- Masaki Yamamotoa *et al.* (2018) ‘Detection of Mycobacterium tuberculosis-derived DNA in circulating cell-free DNA from a patient with disseminated infection using digital PCR’, *International Journal of Infectious Diseases*, 66, pp. 80–82. Available at:
[file:///C:/Users/User/Downloads/1-s2.0-S1201971217303004-main\(1\).pdf](file:///C:/Users/User/Downloads/1-s2.0-S1201971217303004-main(1).pdf).
- Maurya, A.K. *et al.* (2011) ‘Comparative evaluation of IS6110 PCR via conventional methods in rapid diagnosis of new and previously treated cases of extrapulmonary tuberculosis’, *Tuberkuloz ve Toraks*, 59(3). Available at: <https://doi.org/10.5578/tt.2680>.
- Park, K.H. *et al.* (2012) ‘Performance of real time PCR and dual ID REBA for detection of tuberculosis in granulomatous lymphadenitis using formalin fixed paraffin embedded tissue (FFPE)’, *Histopathology*, 61, p. 164. Available at:
<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70934517%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2559.2012.04359-17.x>.
- Polepole, P. *et al.* (2017) ‘Performance of the Xpert MTB/RIF assay in the diagnosis of tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues’, *International Journal of Mycobacteriology*, 6(1). Available at:
<https://doi.org/10.4103/2212-5531.201892>.
- Report, G.T. (2018) *Global tuberculosis Report WHO 2018, WHO report*.
- Van Rie, A. *et al.* (2013) ‘Diagnostic accuracy and effectiveness of the Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of HIV-associated lymph node tuberculosis’, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 32(11). Available at:
<https://doi.org/10.1007/s10096-013-1890-0>.
- Rindi, L. *et al.* (2017) ‘Detection of Mycobacterium tuberculosis from paraffin-embedded tissues by GeneXpert MTB/RIF’, *Tuberculosis*, 106, pp. 53–55. Available at:
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2017.06.005>.
- Surat, G. *et al.* (2014) ‘Rapid real-time PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis complex DNA in formalin-fixed paraffin embedded tissues: 16% of histological “sarcoid” may contain such DNA’, *Journal of Clinical Pathology*, 67(12). Available at:
<https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202307>.