

Centre national de Référence Mycobactéries et Tuberculose – Rapports annuel 2017 – Vanessa Mathys

Les données présentées ci-dessous sont celles de la Direction opérationnelle « **Maladies transmissibles et infectieuses** » de Sciensano, service « **Tuberculose et Mycobactéries** »

INTRODUCTION

Les analyses suivantes ont été exécutées :

- Sur ADN extrait
 - identification
 - recherche de mutations géniques associées à la résistance aux antibiotiques

- Sur cultures positives
 - identification (par test immunochromatographique MPB64, PCR spécifiques de diverses espèces mycobactériennes, amplification d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S suivie de séquençage, test GenoType *Mycobacterium*, distinction des membres du complexe *M. tuberculosis*)
 - tests de sensibilité sur *M. tuberculosis*
 - en Bactec MGIT 960 (milieu liquide) pour les antituberculeux de 1^{re} ligne, à savoir isoniazide (I), rifampicine (R), éthambutol (E) et pyrazinamide (PZA) (attention, pour ce dernier, le résultat du test *in vitro* ne correspond pas toujours à l'activité de la PZA *in vivo*).
 - en Bactec MGIT 960 (milieu liquide) pour les antituberculeux de seconde ligne, en cas de résistance à un antituberculeux de 1^{re} ligne
 - par le test GenoType MTBDR*plus* ou par séquençage d'une région de 81 pb du gène *rpoB* pour vérifier la résistance à la rifampicine
 - par PCR multiplex pour rechercher la mutation S315T dans le gène *katG* et la mutation C-15T dans la région promotrice du gène *inhA* ou GenoType MTBDR*plus* pour vérifier la résistance à l'isoniazide
 - par le test GenoType MTBDR*sl* pour vérifier la résistance aux antibiotiques de 2^{ème} ligne
 - tests de sensibilité sur mycobactéries atypiques, seulement si le cas clinique le justifie (méthode des proportions de Canetti en milieu solide et méthode Sensititre® en milieu liquide)
 - génotypage des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, en cas de résistance à un antituberculeux de 1^{re} ligne, en cas de suspicion d'épidémie, de suspicion de contamination de laboratoire ou encore sur demande spéciale (techniques : spoligotyping et MIRU-VNTR sur 24 loci).

- Sur prélèvements sanguins
 - diagnostic d'infection tuberculeuse latente par test IGRA (Interferon Gamma Release Assays)

- Sur échantillons respiratoires
 - détection rapide de la présence de *M. tuberculosis* complexe et de sa résistance à la rifampicine (GeneXpert®)

- Le laboratoire utilise des techniques accréditées (ISO15189)

ECHANTILLONS RECUS POUR ANALYSE EN 2017

- Diagnostic ou confirmation : 3269 dont
 - 2851 cultures pour identification
 - 247 extraits d'ADN
 - 171 prélèvements cliniques (58 pour détection de tuberculose latente par test IGRA et 113 pour GeneXpert)

- Surveillance-génotypage : 182 cultures de patients bruxellois (étude TB-BRU-NET) reçues pour génotypage

- Contrôle de qualité : 118 échantillons (lames, expectorations, cultures ou ADN) reçus pour contrôle de qualité

Total (échantillons analysés): 3569

Origine géographique : les échantillons cliniques provenaient de 67 laboratoires différents du pays répartis à Bruxelles, en Wallonie et en Flandre, dont 45 ont envoyé plus de 10 échantillons pour analyse.

Mycobactéries d'origine clinique identifiées

2851 cultures (93.3% en milieu liquide et 6.7% sur milieu solide) ont été envoyées pour identification. Une mycobactérie a pu être identifiée dans 1497 de ces cultures : 556 (37.1%) complexes *M. tuberculosis* et 941 (62.8%) mycobactéries atypiques ou NTM.

- Les différentes mycobactéries identifiées sont données dans le tableau 1
- Le détail des identifications par type d'échantillon clinique est donné dans le tableau 2.
- Les différentes espèces mycobactériennes identifiées chaque année depuis 2000 sont données dans le tableau 3.

On notera que 1354 (47.5%) des 2851 cultures envoyées pour identification ne contenaient pas de mycobactéries (elles contenaient un microorganisme contaminant ou aucun développement bactérien et étaient alors sorties faussement positives de l'automate de culture du laboratoire d'origine).

Tests de sensibilité

1. *M. tuberculosis*

En 2017, *M. tuberculosis* (complexe *M. tuberculosis*) a été identifié sur 556 isolats cliniques provenant de 433 patients différents. Le test de sensibilité a été effectué pour 319 patients (sur 1 isolat clinique pour 307, sur 2 isolats pour 11 d'entre eux et sur 3 isolats pour 1 d'entre eux). L'antibiogramme n'a pas été effectué sur les souches envoyées uniquement pour génotypage, sur les cultures contaminées ou quand la souche a été isolée dans un laboratoire effectuant lui-même les tests de sensibilité.

Patients sensibles à I (isoniazide), R (rifampicine) et E (éthambutol) : 275 (86%)

Patients résistants à I (et pas à R)	: 33 (10.3%)	} 5 patients MDR (1.5%)
Patients multirésistants (I+R)	: 3	
Patients multirésistants (I+R+E)	: 2	
Patients résistants à I + E	: 3	
Patients résistants à R uniquement	: 3	

Parmi les **souches multirésistantes**, 4 sont des nouveaux cas. Parmi ceux-ci, 2 (50%) appartenaient à la famille Beijing. Une mutation dans *rpoB* a été retrouvée dans 100% des isolats résistants à la rifampicine (dont la mutation S531L dans 50% des cas). Une mutation dans *katG* a été retrouvée parmi les 4 souches, soit 100% des isolats MDR (aucun MDR ne présentait de mutation *inhA* seul ou en combinaison avec *katG*).

Parmi les isolats **mono-résistants à l'isoniazide**, la mutation S315T dans *katG* a été retrouvée chez 53,1% des isolats, la mutation C-15T dans *inhA* chez 34,3% des isolats. Un seul isolat présentait les 2 mutations ensemble. Quatre isolats n'avaient aucune mutation (habituelle) recherchée dans ces 2 gènes.

2. Mycobactéries atypiques ou NTM

Le test de sensibilité a été effectué pour 323 patients (351 isolats) infectés par les mycobactéries suivantes: 91 *M. avium*, 60 *M. intracellulare*, 52 *M. chimaera*, 30 *M. xenopi*, 25 complexe *M. chelonae-abcessus*, 23 *M. kansasii*, 9 complexe *M. fortuitum*, 6 *M. marinum*, 4 *M. malmoense* et 23 autres mycobactéries atypiques.

Analyse des ADN extraits d'échantillons cliniques

247 ADN (extraits préparés dans le laboratoire qui a reçu le prélèvement) nous ont été adressés pour identification et/ou recherche de mutations géniques associées à la résistance à l'isoniazide et à la rifampicine.

Parmi les 247 ADN, 71 (dont 31 d'origine respiratoire) nous ont été envoyés par un l'hôpital pour recherche rapide de mutations dans *rpoB*, *katG* et *inhA* (patients suspects de tuberculose multirésistante) et 123 (75 provenant de biopsies d'origine pulmonaire ou d'organe, 33 ganglions, 6 d'autres origines et 9 d'origine inconnue) nous ont été envoyés par un laboratoire d'anatomo-pathologie pour recherche de la présence d'ADN mycobactérien.

Parmi les 31 ADN d'origine respiratoire du premier hôpital, 6 contenaient de l'ADN de *M. tuberculosis*.

Parmi les ADN du laboratoire d'anatomopathologie, dans 83% des cas, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'ADN de mycobactérie, 7 seulement contenaient de l'ADN du complexe *M. tuberculosis*, et 14 de l'ADN de mycobactérie atypique.

Génotypage des bacilles de la tuberculose : pour 201 patients + 182 pour l'étude d'épidémiologie moléculaire à Bruxelles

Deux techniques de typage génétique, basées sur des marqueurs différents, sont utilisées dans notre laboratoire pour déterminer l'empreinte génétique des bacilles de la tuberculose : le Spoligotyping et MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat) sur 24 loci. Le génotypage permet de tracer les voies de transmission de la tuberculose (confirmation de contaminations intra-familiales ou de voisinage, micro-épidémies, détection de contaminations croisées de laboratoire d'un échantillon par un autre, technique en même temps). Il permet également de distinguer les tuberculoses humaines dues à *M.bovis* des tuberculoses classiques dues à *M.tuberculosis*.

Le génotypage a été effectué sur tous les isolats cliniques **résistants à l'isoniazide (33 patients)**, sur tous les **isolats multirésistants (4 autres patients)** et, **sur demande**, sur les isolats sensibles aux antituberculeux, en cas de suspicion d'épidémie ou de contamination (soit pour 164 patients).

Dans le cadre d'une étude d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose à Bruxelles (projet européen **TB-BRU-NET**), les isolats de *M. tuberculosis* de 182 **patients habitant la Région bruxelloise** ont été génotypés dans notre laboratoire, par spoligotyping et MIRU-VNTR sur 24 loci. Les données administratives et cliniques des patients ont été collectées auprès du FARES-VRGT. Les souches isolées à Bruxelles dans le cadre de cette étude entre 2010 et 2013 ont fait l'objet d'une analyse approfondie qui a été publiée :

Molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis complex in Brussels, 2010-2013.
Vluggen C, Soetaert K, Groenen G, Wanlin M, Spitaels M, Arrazola de Oñate W, Fauville-Dufaux M, Saegerman C, Mathys V. PLoS One. 2017 Feb 21;12(2):e0172554.

De façon générale, l'analyse de clustering effectuée sur l'ensemble des souches génotypées à ce jour dans notre laboratoire a permis de détecter l'existence de 435 clusters comprenant de 2 à 37 patients chacun.

Les patients des clusters de taille importante font l'objet d'investigations de terrain par le FARES-VRGT en vue de tenter de déterminer comment ils se sont contaminés et d'effectuer le contrôle tuberculinique de leur entourage. Les souches analysées appartenaient aux familles génétiques suivantes (répertoriées dans les bases internationales de spoligotypes): familles T, H, LAM, Beijing, U, CAS, EAI,.....

Commentaires

- En ce qui concerne le nombre de cas de tuberculose déclarés en Belgique et le nombre de patients multirésistants, les données nationales sont collectées et diffusées par le FARES-VRGT (Fonds des Affections Respiratoires – Vlaamse vereniging voor Respiratoire Gezondheidszorg en tuberculosebestrijding vzw)
- La proportion de cas de tuberculose multirésistante (MDR-TB : soit résistance à au moins l'isoniazide et la rifampicine) enregistrée dans notre laboratoire a fortement diminué comparé à l'année passée (1.5 versus 3.3% MDR en 2016). Parmi les 4 nouveaux patients MDR détectés en 2017, aucun n'était infecté par une souche XDR (ultra-résistante : souche MDR avec résistance additionnelle à l'amikacin et à une quinolone), ni par une souche multirésistante présentant une résistance supplémentaire à l'amikacin ou aux quinolones uniquement.
- Parmi les 2851 cultures envoyées pour identification, 93.3% (2659) étaient des cultures en milieu liquide (1608 en provenance du BACTEC MGIT, 971 du BacT/ALERT, 32 du BACTEC 9.000) et 6.7% (192) étaient sur milieu solide.
- D'autre part, 1354 cultures (**47.5%**) ne contenaient pas de mycobactérie (cultures contaminées ou faussement positives). Le pourcentage de ces cultures **sans** mycobactérie varie en fonction du type de milieu utilisé. Pourcentages de faux positifs : 40.6% (653/1608) des cultures MGIT, 64.8% (630/971) des cultures provenant du BacT/ALERT, 46.9% (15/32) des cultures en BACTEC 9.000 et 16.6% (35/192) des cultures en milieu solide. Ce taux particulièrement élevé de cultures faussement positives envoyées pour identification au centre de référence est lié au fait que les tubes de culture ne peuvent pas être ouverts dans des laboratoires sans infrastructure L3. Ce taux anormalement élevé de faux positifs génère beaucoup de travail inutile et nécessite une révision des procédures de décontamination des prélèvements dans les laboratoires de biologie clinique effectuant la primoculture, ainsi que la vérification/calibration des automates de culture.
- Les cultures contaminées ou négatives génèrent beaucoup plus de travail (pour s'assurer qu'elles ne contiennent vraiment pas de mycobactéries) que l'identification d'une culture mycobactérienne pure.
- Les espèces de NTM les plus isolées furent *M. intracellulare-M.chimaera* (29.6% des NTM), *M. gordonae* (19.8% des NTM), *M. avium* (18.5% des NTM) suivis de *M. xenopi* (10.8% des NTM). Ces espèces sont identiques à celles les plus fréquemment détectées les années précédentes.
- Depuis 2015, étant donné l'alerte ECDC lancée concernant le risque d'infection à *M. chimaera* lors de l'utilisation de heater-cooler unit lors de chirurgie cardiaque sous circulation extracorporelle, une attention particulière a été donnée aux souches de *M. intracellulare*. En effet, seul l'analyse par séquençage permet de faire la distinction entre *M. intracellulare* et *M. chimaera*.
- La proportion respective de *M.intracellulare* et *M.chimaera* a été déterminée et publiée sur les souches du complexe *M. intracellulare-chimaera* isolées en 2015. L'analyse révèle que 63% de ces souches appartiennent à l'espèce *M. chimaera* (Frequency of Mycobacterium chimaera among Belgian patients, 2015. Soetaert K, Vluggen C, André E, Vanhoof R, Vanfleteren B, **Mathys V**. J Med Microbiol. 2016 Nov;65(11):1307-1310.

- La proportion de *M. chimaera* identifiés en 2017 est assez semblable : 60,6% (169 *M. chimaera* sur 279 *M. intracellulare* cpx)
- L'identification d'espèces des cultures issues de prélèvements d'eau effectués par les laboratoires périphériques, peut être réalisée au sein de notre laboratoire dans le cadre de son rôle dans la surveillance des infections à mycobactéries.
- En ce qui concerne les NTM, nous ne savons pas combien d'entre elles ont été réellement la cause d'une maladie car nous n'avons pas de données cliniques sur les patients.
- Depuis 2018, la technique de Whole Genome Sequencing est implémentée dans la laboratoire et utilisée pour les projets de recherche ainsi que l'analyse des souches de *M. tuberculosis* multi-résistantes (MDR)

Tableau 1 : Identification de cultures d'origine clinique en 2017 (1497 mycobactéries sur 2851 cultures analysées)

TUB CPX			
Pathogènes TUBCPX	Complexe <i>M. tuberculosis</i>	486	
	<i>M. bovis</i>	5	
	<i>M. bovis</i> ssp B.C.G.	18	
	<i>M. tuberculosis</i>	43	
	<i>M. africanum</i>	1	
	<i>M. tuberculosis</i> + <i>M. gordonae</i>	2	
	<i>M. tuberculosis</i> + <i>M. intracellulare</i> cpx	1	
Total TUB CPX	556	37.1%	
NTM			% NTM
Potentiellement pathogènes	<i>M. arupense</i>	6	
	<i>M. aubagnense</i>	2	
	<i>M. avium</i>	174	18.5%
	<i>M. bohemicum</i>	2	
	<i>M. celatum</i>	3	
	<i>M. chelonae-abscessus</i> complexe	24	
	<i>M. abscessus</i>	18	
	<i>M. chelonae</i>	18	
	<i>M. fortuitum</i> complexe	22	
	<i>M. fortuitum-senegalense-farcinigenes</i> complexe	2	
	<i>M. fortuitum-porcinum-boenickei</i> complexe	2	
	<i>M. peregrinum-septicum</i> complexe	3	
	<i>M. goodii</i>	1	
	<i>M. gordonae</i>	186	19.8%
	<i>M. haemophilum</i>	1	
	<i>M. hassiacum</i>	2	
	<i>M. heckeshornense</i>	1	
	<i>M. heraklionense</i>	1	
	<i>M. interjectum</i>	3	
	<i>M. intracellulare</i>	110	29.6%
	<i>M. chimaera (M. intracellulare</i> complexe)	169	
	<i>M. kansasii</i>	25	
	<i>M. lentiflavum</i>	9	
	<i>M. malmoense</i>	6	
	<i>M. marinum</i>	6	
	<i>M. massiliense</i>	3	
	<i>M. mucogenicum-ratisbonense</i> complexe	1	
	<i>M. nebraskense</i>	1	
	<i>M. noviomagense</i>	1	
	<i>M. palustre</i>	1	
	<i>M. paraffinicum (scrofulaceum)</i>	1	
	<i>M. parascrofulaceum</i>	3	
	<i>M. saskatchewanense</i>	1	
	<i>M. sensuense</i>	1	
	<i>M. shimoidei</i>	1	
	<i>M. simiae</i>	9	
	<i>M. species</i>	1	
	<i>M. szulgai</i>	5	
	<i>M. terrae</i> complexe	3	
	<i>M. timonense</i>	2	
	<i>M. triplex</i>	2	
	<i>M. vanbaalenii</i>	1	
	<i>M. wolinskyi – jacuzzii</i>	3	
	<i>M. xenopi</i>	102	10.8%
	Mélange <i>M. gordonae</i> + <i>M. intracellulare</i>	1	
	Mélange <i>M. fortuitum</i> + <i>M. intracellulare</i>	1	
	Mélange <i>M. avium</i> + <i>M. mageritense</i>	1	
Total NTM	941	62.8%	
Total Mycobacteria	1497		
Négatifs (cultures ne contenant pas de mycobactéries)	1354		
Total cultures cliniques analysées	2851		
Extraits d'ADN	247		
Prélèvements cliniques pour Genexpert	113		
Prélèvements cliniques pour Quantiferon	58		
Total (diagnostic)	3269		
Surveillance – Genotypage	182		
Contrôle qualité	118		
Total	3569		

Tableau 3 : Espèces mycobactériennes d'origine clinique identifiées depuis 2001

	2017	2016	2015	2014	2013	2012	2011	2010	2009	2008	2007	2006	2005	2004	2003	2002	2001
Complexe <i>M. tuberculosis</i>	486	541	509	429	505	422	467	489	397	468	415	451	462	437	421	422	438
<i>M. tuberculosis</i>	43		22								5	12	1				
Mélange <i>M. tuberculosis</i> cpx+ atypique	3		1	10	3	7	2	3	2	2	2	2	2	1	1	7	5
<i>M. africanum</i>	1	3	4	3	7	2	2				1		1		2		
<i>M. bovis</i>	5	15	9	13	14	3	12	15	5	8	3	1	3	1	2	3	
<i>M. bovis</i> BCG	18	11	7	5	10	5	10	8	5	1	3	6	2	4	1		2
<i>M. avium</i>	174	180	186	165	142	162	142	128	128	122	117	79	93	77	56	70	62
<i>M. intracellulare</i> (+ chimaera)	279	179	185	173	166	142	134	88	101	90	74	55	49	47	32	30	29
<i>M. celatum</i>	3			2	2	3		3	4		3				1	1	
Complexe <i>M. chelonae-abscessus</i>	60	45	41	51	33	29	30	20	32	25	21	23	32	37	42	38	36
Complexe <i>M. fortuitum</i>	30	27	21	18	28	22	24	20	16	17	17	17	21		3	7	4
<i>M. genavense</i>							2	1			2						1
<i>M. haemophilum</i>	1						2			2	2	1	2	1		1	
<i>M. immunogen</i>			2										1			1	1
<i>M. interjectum</i>	3	1	4	5		8	3	4	2	3	5	7	5	1	1	2	2
<i>M. intermedium</i>						1		3	5	2	2		1		1	1	
<i>M. kansasii</i>	25	20	45	19	19	19	20	30	24	41	32	31	25	20	18	35	36
<i>M. lentiflavum</i>	9	7	14	11	12	5	3	13	5	7	11	5	7	4	14	4	5
<i>M. malmoense</i>	6	8	10	8	7	7	8	9	3	7	9	11	4	4	3	6	4
<i>M. marinum</i>	6	7	9	13	8	11	2	6	6	6	8	11	8	4	3	7	16
<i>M. paraffinicum</i>	1					3			2		4	5			5		8
<i>M. scrofulaceum</i>		1		2	6	1	3		1	6	4	2	3	2	1	1	2
<i>M. simiae</i>	9	10	12	14	3	7		11	9	9	4	1	6	14	1	4	6
<i>M. szulgai</i>	5	7	6	6	8	1	5	4	3	3	6	3	4	6	1	2	3
<i>M. xenopi</i>	102	127	133	102	156	124	88	132	138	127	126	115	149	123	111	108	94
Mélange de 2 atypiques	3	5		5	8	5	5	3	2	2							2
<i>M. species</i>	1	2	4	3	2	16	11			5		4	6	3	6	13	10
Rarement ou non* Pathogènes											1			1	1		
<i>M. agri</i>																	
<i>M. assiacum</i>				1													
<i>M. assiatum</i>		1															
<i>M. alvei</i> *				1					1					1	4	2	
<i>M. anthracenicum</i> *									3			4	23	3			
<i>M. arupense</i>	6	3	3	6		3		3	1								
<i>M. aubagnense</i>	2		2				1			1							
<i>M. bohemicum</i>	2		1	3	4	2		2		1	2	2	2	2	1		2
<i>M. branderi</i>				1			2		1				2				
<i>M. cookii</i>									1								
<i>M. conspicuum</i>		2															
<i>M. chitae</i>			1														
<i>M. elephantis</i>														1			
<i>M. frederiksbergense</i> *									1								
<i>M. fluoranthenorans</i>		1															
<i>M. gadium</i>															1		
<i>M. gilvum</i>			1													1	
<i>M. goodii</i>	1	2		1													
<i>M. gordonae</i>	186	198	188	229	253	130	198	176	198	76	121	145	143	161	142	201	166
<i>M. hassiacum</i>	2																
<i>M. heckeshomense</i>	1				1	3					2			2			
<i>M. heidelbergense</i>		2						2									
<i>M. heraklionense</i>	1		4	1													
<i>M. hiberniae</i>			1	1			1								1		1
<i>M. holsaticum</i>					1			1		1	1			1			
<i>M. komosense</i>			1						1		1						
<i>M. kumamotoense</i>									1		1						
<i>M. llutzerense</i>		1	1														
<i>M. mantonii</i>			1														
<i>M. massiliense</i>	3	3															
<i>M. morioakanense</i>			1	1													
<i>M. mucogenicum - ratsbonense</i>	1	8	2	2	5	2	3	2	3		3	2	2	1	3	3	
<i>M. nebraskense</i>	1	2	1	1		1							1				
<i>M. neoaurum</i>			1									1		1			
<i>M. nonchromogenicum</i>		1		1				1		1	6	3	3	3	1	1	4
<i>M. noviomagense</i>	1	1	1		1				1	1							
<i>M. novocastrense</i>		1															2
<i>M. palustre</i>	1				1				1								
<i>M. parmense</i>		1															
<i>M. parascrofulaceum</i>	3	2	2	3	1	1	1	1									
<i>M. phlei</i>		1	1		1		1		1	1		1	1	1			2
<i>M. phocaicum</i>			1														
<i>M. saskatchewanense</i>	1	2	2														
<i>M. senuense</i>	1		1														
<i>M. setense</i>				1													
<i>M. sherrisii</i>									1	3							
<i>M. shimoidi</i>	1								1	1							
<i>M. smegmatis</i>					1	1	1						2		1		2
<i>M. sphaani</i>						1						5				1	
<i>M. terrae</i> complexe	3	2				1	4	3	2				2	2	4	1	5
<i>M. timonense</i>	2	6															
<i>M. triplex</i>	2		5	1	1			5	1			1			1		
<i>M. triviale</i>			2		1												
<i>M. vanbaalenii</i>	1																
<i>M. wolinskyi-iacuzzii</i>	3																
Autres bactérie		4	7	7	2	6	15	4	2		11	15			2		
Corynebacterium (autre famille)		9	23	26	12	13	12	13		7	4						
TOTAL		1450	1478	1350	1432	1172	1217	1199	1116	1047	1025	1025	1068	967	886	973	953