

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM

TUBERCULOSE & MYCOBACTERIËN

Jaarverlag 2019

—

Sciensano

Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten

NRC Tuberculose & Mycobacteriën

April 2020 • Brussel • België



MATHYS, VANESSA

Vanessa Mathys, Ph.D. • T+32 (0)2 373 32 12 • vanessa.mathys@siensano.be

INLEIDING

De uitgevoerde testen zijn de volgende:

- Op DNA extracten
 - identificatie
 - opsporen van genetische mutaties gelinkt aan antimicrobiële resistentie
- Op positieve culturen
 - identificatie (via immunochromatografische test MPB64, species-specifieke PCR, 16S rRNA sequencing, en/of de GenoType Mycobacterium test voor onderscheid van verschillende subspecies van het *M. tuberculosis* complex
 - gevoeligheidstesten op *M. tuberculosis*
 - in vloeibaar milieu (Bactec 960 MGIT) voor de eerstelijns antibiotica, zijnde isoniazid (I), rifampicine (R), ethambutol (E) et pyrazinamide (PZA)
 - In vloeibaar milieu (Bactec 960 MGIT) voor de tweedelijns antibiotica, in geval van resistentie tegen bovenstaande drugs
 - via de GenoType MTBDRplus test of via sequencing van een 81bp regio van *rpoB* ter bevestiging van de rifampicine resistentie
 - Via multiplex PCR ter detectie van de mutatie S315T in het gen katG, en de mutatie C-15T in de promoterregio van *inhA*, of via de GenoType MTBDRplus voor bevestiging van resistentie tegen isoniazide
 - Via de test GenoType MTBDRsl voor bevestiging van resistentie tegen tweedelijns antibiotica
 - Gevoeligheidstesten op *atypische* mycobacteriën, indien klinisch relevant en volgens de methode van Canetti (vast) en microdilutie (vloeibaar, Sensititre®)
 - Genotypering van de mycobacteriën van het *M. tuberculosis* complex door cgMLST analyse via WGS (en parallel daaraan door spoligotypering en MIRU-VNTR op 24 loci gedurende 1 jaar).
 - Volledige genoomsequentiebepaling (**Whole Genome Sequencing, WGS**): uitgevoerd in 2019 in routine **op alle *Mycobacterium tuberculosis*** culturen in het NRC ontvangen.

- Op bloedstalen
 - diagnostiek van latente TB via de IGRA (Interferon Gamma Release Assays) test
- Op pulmonaire stalen
 - Snelle detectie van de aanwezigheid van het *M. tuberculosis* complex en resistentie tegen rifampicine (GeneXpert®)

Het laboratorium opereert onder accreditatie (ISO15189)

STALEN ONTVANGEN VOOR ANALYSE IN 2019

- Diagnose of bevestiging : 4355 waarvan
 - 3243 culturen voor identificatie
 - 339 DNA extracten
 - 773 klinische stalen (747 voor detectie van latente TB, 26 voor GeneXpert)
- Surveillance-genotypering : 185 culturen van Brussel (TB-BRU-NET), ontvangen voor genotypering
- Kw aliteitscontrole: 56 stalen (microscoopglasje, culturen, DNA of pulmonaire stalen) ontvangen voor kw aliteitscontrole

In **totaal** maakt dit **4596** geanalyseerde stalen. Deze waren afkomstig van 78 klinische laboratoria uit Vlaanderen, Brussel en Wallonië; 49 van deze labo's stuurden meer dan 10 stalen op voor analyse.

IDENTIFICATIE VAN MYCOBACTERIËN VAN KLINISCHE OORSPRONG

3243 culturen (93.9% in vloeibare culturen en 6.1% op vast milieu) werden opgestuurd voor identificatie. In 1809 van deze stalen werd een mycobacterium geïdentificeerd: 616 (34%) van het *M. tuberculosis* complex en 1193 (66%) atypische mycobacteriën, of NTMs.

- Een overzicht van de verschillende mycobacteriën is weergegeven in Tabel 1.
- In tabel 2 staat een overzicht per type staal
- De verschillende mycobacteriën (2004-2019) zijn opgelijst in tabel 3

Opvallend was dat in 1434 (44.2%) van de 3243 opgestuurde culturen geen mycobacteriën werden aangetroffen: hierin werd ofwel een contaminant geïdentificeerd, of dit waren vals positieve culturen zonder waarneembare groei van micro-organismen.

GEVOELIGHEIDSBEPALING

Mycobacterium tuberculosis

In 2019 werd in 616 isolaten (458 verschillende patiënten) *M. tuberculosis* (complex) geïdentificeerd. Een antibiogram werd uitgevoerd voor 323 patiënten (op 1 klinisch isolaat voor 308, op 2 isolaten voor 14 en op 3 isolaten voor 1 patient). Het antibiogram werd niet uitgevoerd op stalen die enkel voor genotypering werden opgestuurd, op gecontamineerde culturen, of wanneer de gevoeligheid van de stam al werd getest in het labo van oorsprong.

Stammen gevoelig aan I (isoniazide), R (rifampicine) en E (éthambutol) : 285 (88%)

Stammen resistent aan I (en niet aan R) : 25 (7.7%)
Multiresistente stammen (I+R) : 9
Multiresistente stammen (I+R+E) : 3
Stammen mono-resistent aan R : 1

= 12 MDRs (3.7%)

Onder de **multiresistente stammen (MDR)**, zijn er alle nieuwe casus en alleen 4 (3.3%) tot de Beijing familie horen. Een *rpoB* mutatie werd teruggevonden in 100% van de RIF-resistente stammen (waarvan de mutatie S450L in 83% van de gevallen). De 12 MDR stammen (100%) droegen ook een *katG* mutatie (geen had alleen een promotermutatie in *inhA*, maar 2 stammen droegen wel deze *inhA* mutatie in combinatie met *katG* mutatie).

Onder de stammen **mono-resistent aan isoniazide**, werd *katG* S315T teruggevonden in 44% van de isolaten en de

mutatie C-15T in *inhA* in 32% van de isolaten. Geen isolaat droeg beide mutaties. Vijf isolaten hebben geen (courante) mutatie in deze 2 genen.

Atypische mycobacteriën (NTMs)

Een gevoeligheidstest werd uitgevoerd voor 427 patiënten (462 isolaten), geïnfecteerd door de volgende NTMs : 153 *M. avium*, 41 *M. intracellulare*, 70 *M. chimaera*, 34 *M. xenopi*, 52 complexe *M. chelonae-abcscensus*, 22 *M. kansasii*, 18 complexe *M. fortuitum*, 5 *M. marinum*, 5 *M. malmoense* en 27 andere NTMs.

ANALYSE VAN DNA EXTRACTEN UIT KLINISCHE STALEN

Er werden 339 DNA stalen (waarvan de extracties werden uitgevoerd door het perifere labo) opgestuurd voor identificatie, of voor bepaling aan genetische mutaties gerelateerd aan rifampicin en isoniazid.

Van deze stalen werden 137 (waarvan 69 van respiratoire origine) ons toegezonden voor snelle opsporing van de mutaties in *rpoB*, *katG* et *inhA*, in patiënten met vermoeden voor een MDR-TB infectie. 7/69 stalen werd DNA van *M.tuberculosis* vastgesteld.

Er werden 124 stalen opgestuurd vanuit anatomic-pathologie laboratoria voor de opsporing van mycobacterieel DNA. Deze stalen waren afkomstig vanuit pulmonaire biopsies (54), 36 ganglion, 18 andere en 16 onbekende oorsprong. In 72% van de gevallen stelden we geen aanwezigheid van mycobacterieel DNA vast. Van de positieve stalen bevatten 11 enkel DNA van *M.tuberculosis cpx*, en 24 DNA afkomstig van een NTM infectie.

GENOTYPERING VAN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

→ epidemiologische studie in 196 patiënten, en 185 Brusselse TB patiënten

De typeringen laten toe de transmissie van TB te bestuderen (oa. Bevestigen van intra-familiaire overdracht, micro-epidemieën, kruiscontaminaties in laboratoria). Met deze technieken kan ook onderscheid gemaakt worden tussen TB veroorzaakt door *M. bovis* ten opzichte van de klassieke infectie met *M. tuberculosis*.

In 2019 werd genotypering uitgevoerd door 3 technieken: Whole Genome Sequencing (WGS) en de combinatie van Spoligotyping en MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat) op 24 loci, om het verband tussen de clusters gedetecteerde door de oude and de nieuwe techniques te leggen gedurende 1 jaar.

De genotypering werd uitgevoerd door WGS op alle isolaten van *Mycobacterium tuberculosis* complex ontvangen voor analyse in het NRC en door de oude techniek (spoligotyping en MIRU-VNTR) op alle isolaten resistent aan isoniazide (25 patiënten), op alle MDR-TB stammen (12) en op aanvraag, op pan-sensitieve MTB stammen bij vermoeden van uitbraak of besmetting (uitgevoerd op 196 stammen).

In het algemeen, laat deze analyse clustering toe van TB isolaten. Op dit moment zijn er 556 clusters vastgesteld, met tussen de 2 en 43 patiënten per cluster. Stammen uit deze clusters komen uit verschillende genetische lijnen, waar T, H, LAM, Beijing, U, CAS en EAI de voornaamste zijn. Patiënten in grote clusters worden opgevolgd op het terrein door FARES-VRGT, om na te gaan hoe ze de infectie hebben opgelopen en om hun directe omgeving te controleren op TB.

In kader van een epidemiologisch onderzoek naar TB in Brussel (project **TB-BRU-NET**), werden de isolaten van *M. tuberculosis* van 185 **patiënten woonachtig in de Brusselse regio** gegenotypeerd in 2018 in ons laboratorium door spoligotyping en MIRU-VNTR: administratieve en klinische patiëntgegevens werden verzameld door FARES-VRGT. De stammen die tussen 2010 en 2013 werden geïsoleerd, werden opgenomen in de volgende publicatie:

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.

OPMERKINGEN

- Cijfers over aangegeven gevallen van TB in België, en het aantal MDR-Tb infecties worden verzameld en verspreid door FARES-VRGT (Fonds des Affections Respiratoires – Vlaamse vereniging voor Respiratoire Gezondheidszorg en tuberculosebestrijding vzw)
- De proportie MDR-TB (resistent aan minstens isoniazide en rifampicine) in 2019 was 3.7%. Van de 12 MDR-TB stammen, observeerde het NRC geen met ultrasensitieve (XDR, additionele resistentie tegen amikacin en een fluoroquinolone) en 1 met alleen extra resistentie tegen fluoroquinolones.
- Tussen de 3243 ontvangen culturen voor identificatie, waren er 93.9% (3045) vloeibare culturen (1909 BACTEC MGIT, 1114 BacT/ALERT en 22 BACTEC 9.000) en 6.1% (198) op vaste agar.
- Van deze culturen bevatten **44.8%** geen mycobacteriën (contaminatie of vals positieve culturen). Het percentage van deze culturen varieert naargelang type milieu: 37.5% (715/1909) zijn MGITs, 59.7% (665/1114) zijn afkomstig van BacT/ALERT, 68.2% (15/22) afkomstig van BACTEC 9.000 en 19.7% (39/198) zijn

vaste culturen. De reden voor deze stijging, is dat positieve culturen niet meer mogen geopend worden in een laboratorium zonder L3 infrastructuur. In elk geval, veroorzaakt dit veel onnodig werk aan het NRC, en wordt een revisie van de contaminatieprocedures bij de perifere laboratoria geadviseerd.

- Het probleem van de vals-positieve culturen werd dit jaar geanalyseerd (voor de periode 2007-2016) en gepubliceerd in het volgende artikel:

Strong increase of true and false positive *Mycobacterial* cultures sent to National Reference Centre in Belgium, 2007-2016. Karine Soetaert, Lorenzo Subissi, Pieter-Jan Ceyssens, Brigitte Vanfleteren, Marianne Chantrenne, Tommi Asikainen, Els Duysburgh and Vanessa Mathys. *Eurosurveillance*, Accepted 2019.

- De meest voorkomende NTM species zijn. *M. intracellulare*-*M. chimaera* (27.6% van de NTMs), *M. avium* (25.5%), *M. goodii* (15.2% van de NTMs) en *M. xenopi* (8.5%). Dit komt overeen met wat er vorig jaar werd gerapporteerd.
- Sinds 2015 is er een alert gaande vanuit ECDC betreffende risico op infectie met *M. chimaera* bij gebruik van heater-cooler units tijdens cardiale chirurgie onder kunstmatige beademing. Enkel met behulp van sequencing kan onderscheid gemaakt worden tussen *M. intracellulare* en *M. chimaera*.
- We hebben de verhouding van *M. intracellulare* en *M. chimaera* onderzocht in stalen ontvangen in 2015, waaruit bleek dat 63% behoren tot *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.)

In 2019 was deze verhouding gelijkaardig (70%).

- Wat betreft NTM infecties, kunnen we onmogelijk bepalen welke stammen de werkelijke oorzaak zijn van ziekte, aangezien het NRC niet over relevante klinische gegevens beschikt.
- Sinds 2019 is Whole Genome Sequencing geïmplementeerd in het NRC, en gebruikt in routine op alle *Mycobacterium tuberculosis* complexe culturen gekregen in het NRC
- Een volledige analyse van onze jaarverslagen voor de periode 2007-2016 was gemaakt en gepubliceerd om de toename van het aantal mycobacteriële (en vals-positieve) culturen te rapporteren die de afgelopen 10 jaar voor analyse in ons laboratorium werden ontvangen:

Strong increase of true and false positive Mycobacterial cultures sent to National Reference Centre in Belgium, 2007-2016. Karine Soetaert, Lorenzo Subissi, Pieter-Jan Ceysens, Brigitte Vanfleteren, Marianne Chantrenne, Tommi Asikainen, Els Duysburgh and Vanessa Mathys. *Eurosurveillance*, Accepted 2019.

TABLEAU 1: Identificatie van klinische culturen in 2019

| TUB CPX | | | |
|---|---|--------------|---------------|
| Pathogenen TUBCPX | Complexe <i>M. tuberculosis</i> | 189 | |
| | <i>M. bovis</i> | 12 | |
| | <i>M. bovis</i> ssp B.C.G. | 14 | |
| | <i>M.bovis/M. bovis</i> ssp B.C.G. | 2 | |
| | <i>M. tuberculosis</i> | 390 | |
| | <i>M. africanum</i> | 9 | |
| | Total TUB CPX | 616 | 34 % |
| NTM | | | % NTM |
| Potentiele pathogenen | <i>M. agri</i> | 1 | |
| | <i>M. alsense</i> | 1 | |
| | <i>M. arupense</i> | 1 | |
| | <i>M. aubagnense</i> | 2 | |
| | <i>M. avium</i> | 304 | 25.5 % |
| | <i>M. bohemicum</i> | 2 | |
| | <i>M. branderi</i> | 2 | |
| | <i>M. celatum</i> | 3 | |
| | <i>M. chelonae-abscessus</i> complexe | 47 | |
| | <i>M. abscessus</i> | 15 | |
| | <i>M. massiliense</i> | 8 | |
| | <i>M. bolletti</i> | 7 | |
| | <i>M. chelonae</i> | 28 | |
| | <i>M. cosmeticum</i> | 1 | |
| | <i>M. elephantis</i> | 1 | |
| | <i>M. fortuitum</i> complexe | 2 | |
| | <i>M. fortuitum</i> | 20 | |
| | <i>M. fortuitum-senegalense-farcinigenes</i> complexe | 6 | |
| | <i>M. fortuitum-porcinum-boenickei</i> complexe | 10 | |
| | <i>M. peregrinum-septicum</i> complexe | 4 | |
| | <i>M. genavense</i> | 1 | |
| | <i>M. gilvum</i> | 1 | |
| | <i>M. gordonae</i> | 181 | 15.2 % |
| | <i>M. hassiacum</i> | 1 | |
| | <i>M. holsaticum</i> | 1 | |
| | <i>M. interjectum</i> | 3 | |
| | <i>M. intracellulare</i> complexe | 23 | |
| | <i>M. intracellulare</i> | 68 | |
| | <i>M. chimaera (M. intracellulare</i> complexe) | 230 | 27.6 % |
| | <i>M. timonense</i> | 6 | |
| | <i>M. intracellulare/scrofulaceum</i> | 1 | |
| | <i>M. kansasii</i> | 45 | |
| | <i>M. lentiflavum</i> | 5 | |
| | <i>M. llutzerense</i> | 2 | |
| | <i>M. malmoense</i> | 9 | |
| | <i>M. mantonii</i> | 5 | |
| | <i>M. marinum</i> | 8 | |
| | <i>M. montefiorensis</i> | 1 | |
| | <i>M. mucogenicum-ratisbonense</i> complexe | 4 | |
| | <i>M. novocastrensis</i> | 1 | |
| | <i>M. obuense</i> | 2 | |
| | <i>M. parascrofulaceum-europaeum</i> | 2 | |
| <i>M. pamense</i> | 1 | | |
| <i>M. salmoniphilum</i> | 2 | | |
| <i>M. simiae</i> | 4 | | |
| <i>M. species</i> | 2 | | |
| <i>M. szulgai</i> | 4 | | |
| <i>M. terrae</i> complexe + <i>M. kumamotoense (terrae cpx)</i> | 3+3 | | |
| <i>M. vaccae</i> | 1 | | |
| <i>M. xenopi</i> | 102 | 8.5 % | |
| Mélange <i>M. avium</i> + <i>M. intracellulare</i> | 3 | | |
| Mélange <i>M. gordonae</i> + <i>M. intracellulare</i> | 1 | | |
| Mélange <i>M. gordonae</i> + <i>M. abscessus/chelonae</i> cpx | 1 | | |
| Mélange <i>M. simiae</i> + <i>M. abscessus</i> cpx | 1 | | |
| Total NTM | 1193 | 66 % | |
| Total Mycobacteria | 1809 | | |
| Negatief | 1434 | | |
| Total culturen voor analyses | 3243 | | |
| DNA extracten | 339 | | |
| Stalen voor Genexpert | 26 | | |
| Stalen voor Quantiferon | 747 | | |
| Totaal (diagnostic) | 4355 | | |
| Surveillance – Genotypering | 185 | | |
| Kwaliteitscontrole | 56 | | |
| Totaal | 4596 | | |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|---|
| <i>M. montefiorensis</i> | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. mucogenicum-ratisbonense</i> | 4 | 3 | 1 | 8 | 2 | 2 | 5 | 2 | 3 | 2 | 3 | | | 3 | 2 | 2 | |
| <i>M. nebraskense</i> | | | 1 | 2 | 1 | 1 | | 1 | | | | | | | 1 | | |
| <i>M. neoaurum</i> | | 1 | | | 1 | | | | | | | | | 1 | | 1 | |
| <i>M. nonchromogenicum</i> | | | | 1 | | 1 | | | | 1 | | 1 | 6 | 3 | 3 | 3 | |
| <i>M. noviomagense</i> | | 3 | 1 | 1 | 1 | | 1 | | | | 1 | 1 | | | | | |
| <i>M. novocastrense</i> | 1 | | | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. obuense</i> | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. palustre</i> | | | 1 | | | | 1 | | | | 1 | | | | | | |
| <i>M. parmense</i> | 1 | 1 | | 1 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. parascrofulaceum</i> | 2 | 1 | 3 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | | | | | | | |
| <i>M. phlei</i> | | 1 | | 1 | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | 1 | | 1 | 1 | 1 | |
| <i>M. phocaicum</i> | | | | | 1 | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. salmoniphilum</i> | 2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <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. shimidei</i> | | | 1 | | | | | | | | 1 | 1 | | | | | |
| <i>M. smegmatis</i> | | | | | | | 1 | 1 | 1 | | | | | | | 2 | |
| <i>M. sphagni</i> | | | | | | | | 1 | | | | | | | 5 | | |
| <i>M. terrae complexe</i> | 6 | 5 | 3 | 2 | | | | 1 | 4 | 3 | 2 | | | | | 2 | 2 |
| <i>M. timonense</i> | | | 2 | 6 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. triplex</i> | | 1 | 2 | | 5 | 1 | 1 | | | 5 | 1 | | | | 1 | | |
| <i>M. triviale</i> | | | | | 2 | | 1 | | | | | | | | | | |
| <i>M. vaccae</i> | 1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. vanbaalenii</i> | | 1 | 1 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>M. wolinskyi-jacuzzii</i> | | | 3 | | | | | | | | | | | | | | |
| Autres bactérie | | | | 4 | 7 | 7 | 2 | 6 | 15 | 4 | 2 | | 11 | 15 | | | |
| Corynebacterium (autre famille) | | | | 9 | 23 | 26 | 12 | 13 | 12 | 13 | | 7 | 4 | | | | |
| TOTAL | 1809 | 1505 | 1497 | 1450 | 1478 | 1350 | 1432 | 1172 | 1217 | 1199 | 1116 | 1047 | 1025 | 1025 | 1068 | 967 | |

CONTACT

Vanessa Mathys • vanessa.mathys@sciensano.be • T +32 (0)2 373 32 12

VRAGEN, OPMERKINGEN OF
MEER INFORMATIE :

WWW.SCIENSANO.BE

Sciensano • Juliette Wytsmanstraat 14 • 1050 Brussel • België • T + 32 2 642 51 11 • T pers+ 32 2 642 54 20 •
info@sciensano.be • www.sciensano.be

Verantwoordelijke uitgever(s): Myriam Sneyers, Algemeen directeur • Juliette Wytsmanstraat 14 • 1050 Brussel • België •