

CENTRE  
NATIONAL DE  
RÉFÉRENCE

TUBERCULOSE &  
MYCOBACTÉRIES

Rapport annuel 2019

—



**Sciensano**

**Maladies Infectieuses Humaines - Maladies bactériennes**

**CNR Tuberculose & Mycobactéries**

Avril 2020 • Bruxelles • Belgique



MATHYS, VANESSA

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



## INTRODUCTION

(et en parallèle par spoligotyping et MIRU-VNTR sur 24 loci pour 1 an).

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<sup>re</sup> 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<sup>re</sup> ligne
    - par le test GenoType MTBDR<sub>plus</sub> 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<sub>plus</sub> pour vérifier la résistance à l'isoniazide
    - par le test GenoType MTBDR<sub>s/l</sub> pour vérifier la résistance aux antibiotiques de 2<sup>ème</sup> 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)
  - Séquençage génomique complet (**Whole Genome Sequencing, WGS**) : réalisé en 2019 en routine **sur toutes les cultures de *Mycobacterium tuberculosis*** reçues au CNR
  - Génomique des mycobactéries du complexe *M. tuberculosis*, par analyse des cgMLST via WGS

- 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 REÇUS POUR ANALYSES EN 2019

- Diagnostic ou confirmation : 4355 dont
  - 3243 cultures pour identification
  - 339 extraits d'ADN
  - 773 prélèvements cliniques (747 pour détection de tuberculose latente par test IGRA et 26 pour GeneXpert)
- Surveillance-génomique : 185 cultures de patients bruxellois (étude TB-BRU-NET) reçues pour génomique
- Contrôle de qualité : 56 échantillons (lames, expectorations, cultures ou ADN) reçus pour contrôle de qualité

**Total** (échantillons analysés): 4596

**Origine géographique** : les échantillons cliniques provenaient de 78 laboratoires différents du pays répartis à Bruxelles, en Wallonie et en Flandre, dont 49 ont envoyé plus de 10 échantillons pour analyse.

## MYCOBACTÉRIES D'ORIGINE CLINIQUE IDENTIFIÉES

3243 cultures (93.9% en milieu liquide et 6.1% sur milieu solide) ont été envoyées pour identification. Une mycobactérie a pu être identifiée dans 1809 de ces cultures : 616 (34%) complexes *M. tuberculosis* et 1193 (66%) 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 2004 sont données dans le tableau 3.

On notera que 1434 (44.2%) des 3243 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

### *Mycobacterium tuberculosis*

En 2019, *M. tuberculosis* (complexe *M. tuberculosis*) a été identifié sur 616 isolats cliniques provenant de 458 patients différents. Le test de sensibilité a été effectué pour 323 patients (sur 1 isolat clinique pour 308, sur 2 isolats pour 14 d'entre eux et sur 3 isolats pour 1 patient). 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) : 285 (88%)

Patients résistants à I (et pas à R)	: 25 (7.7%)
Patients multirésistants (I+R)	: 9
Patients multirésistants (I+R+E)	: 3
Patients résistants à R uniquement	: 1

= 12 patients MDR (3.7%)

Parmi les **souches multirésistantes**, toutes sont des nouveaux cas. Parmi ceux-ci, seul 4 (3.3%) appartenaient à la famille Beijing. Une mutation dans *rpoB* a été retrouvée dans 100% des isolats résistants à la rifampicine (dont la mutation S450L dans 83% des cas). Une mutation dans *katG* a été retrouvée parmi les 12 souches, soit 100% des isolats MDR (aucun MDR ne présentait de mutation *inhA* seul mais bien en combinaison avec *katG* pour 2 souches).

Parmi les isolats **mono-résistants à l'isoniazide**, la mutation S315T dans *katG* a été retrouvée chez 44% des isolats, la mutation C-15T dans *inhA* chez 32% des isolats. Aucun isolat présentait les 2 mutations ensemble. Cinq isolats n'avaient aucune mutation (habituelle) recherchée dans ces 2 gènes.

### Mycobactéries atypiques ou NTM

Le test de sensibilité a été effectué pour 427 patients (462 isolats) infectés par les mycobactéries suivantes: 153 *M. avium*, 41 *M. intracellulare*, 70 *M. chimaera*, 34 *M. xenopi*, 52 complexe *M. chelonae-abcseusus*, 22 *M. kansasii*, 18 complexe *M. fortuitum*, 5 *M. marinum*, 5 *M. malmoense* et 27 autres mycobactéries atypiques.

## ANALYSE DES ADN EXTRAITS D'ECHANTILLONS CLINIQUES

339 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 339 ADN, 137 (dont 69 d'origine respiratoire) nous ont été envoyés par un hôpital pour recherche rapide de mutations dans *rpoB*, *katG* et *inhA* (patients suspects de tuberculose multirésistante). Parmi les 69 ADN d'origine respiratoire, 7 contenaient de l'ADN de *M.tuberculosis*.

124 autres ADN nous ont été envoyés par un laboratoire d'anatomo-pathologie pour recherche de la présence d'ADN mycobactérien. Ces ADN provenaient de biopsies d'origine pulmonaire ou d'organe (54), 36 ganglions, 18 d'autres origines et 16 d'origine inconnue). Dans 72% des cas, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'ADN de mycobactérie, 11 seulement contenaient de l'ADN du complexe *M.tuberculosis*, et 24 de l'ADN de mycobactérie atypique.

## GENOTYPAGE DES BACILLES DE LA TUBERCULOSE

→ pour 196 patients + 185 pour l'étude d'épidémiologie moléculaire à Bruxelles

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*.

En 2019, le génotypage a été réalisé par 3 techniques : le Séquençage Génomique Complet (WGS) ainsi que la combinaison du Spoligotyping et du MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable

Number Tandem Repeat) sur 24 loci, afin de faire le lien entre les clusters détectés via les nouvelles et les anciennes techniques pendant 1 an.

Le génotypage a été effectué par WGS sur tous les isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* complexe reçus pour analyse au CNR, et par l'ancienne technique sur les souches **résistants à l'isoniazide (25 patients)**, sur tous les **isolats multirésistants (12 autres patients)** et, **sur demande**, sur les isolats sensibles aux antituberculeux, en cas de suspicion d'épidémie ou de contamination (soit pour 196 **patients**).

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 556 clusters comprenant de 2 à 43 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 tuberculique 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,.....

Dans le cadre d'une étude d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose à Bruxelles (projet **TB-BRU-NET**), les isolats de *M. tuberculosis* de 185 **patients habitant la Région bruxelloise** ont été génotypés en 2019 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.

## 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 est de 3.7% en 2019. Parmi les 12 nouveaux patients MDR détectés en 2019, aucun n'était infecté par une souche XDR (ultra-résistante : souche MDR avec résistance additionnelle à l'amikacin et à une quinolone) et 1 par une souche multirésistante présentant une résistance supplémentaire aux quinolones uniquement.
- Parmi les 3243 cultures envoyées pour identification, 93.9% (3045) étaient des cultures en milieu liquide (1909 en provenance du BACTEC MGIT, 1114 du BacT/ALERT, 22 du BACTEC 9.000) et 6.1% (198) étaient sur milieu solide.
- D'autre part, 1434 cultures (**44.8%**) 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 : 37.5% (715/1909) des cultures MGIT, 59.7% (665/1114) des cultures provenant du BacT/ALERT, 68.2%(15/22) des cultures en BACTEC 9.000 et 19.7% (39/198) 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.
- Le problème des cultures faussement positive a été analysé cette année (pour la période 2007-2016) et publié dans l'article suivant :

Strong increase of true and false positive *Mycobacterium* 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, Accepté 2019.
- 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* (27.6% des NTM), *M. avium* (25.5% des NTM), *M. gordonae* (15.2% des NTM), suivis de *M. xenopi* (8.5% 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 2019 est assez semblable : 70% (230 *M. chimaera* sur 328 *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 2019, la technique **de Whole Genome Sequencing** est implémentée dans le laboratoire et utilisée en routine sur **toutes** les souches de *M. tuberculosis* que nous recevons.
- Une analyse complète de nos rapports annuels concernant la période 2007-2016 a été faite et publiée afin de rapporter l'augmentation du nombre de cultures mycobactériennes (et fausses positives) reçues ces 10 dernières années pour analyses au sein de notre laboratoire:

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: Identification de cultures d'origine clinique en 2019**

<b>TUB CPX</b>			
Pathogènes 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	
	<b>Total TUB CPX</b>	<b>616</b>	<b>34 %</b>
<b>NTM</b>			<b>% NTM</b>
Potentiellement pathogènes	<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	<b>25.5 %</b>
	<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	<b>15.2 %</b>
	<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	<b>27.6 %</b>
	<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	<b>8.5 %</b>	
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		
<b>Total NTM</b>	<b>1193</b>	<b>66 %</b>	
<b>Total Mycobacteria</b>	<b>1809</b>		
Négatifs (cultures ne contenant pas de mycobactéries)	1434		
<b>Total cultures cliniques analyses</b>	<b>3243</b>		
Extraits d'ADN	339		
Prélèvements cliniques pour Genexpert	26		
Prélèvements cliniques pour Quantiferon	747		
<b>Total (diagnostic)</b>	<b>4355</b>		
Surveillance – Genotypage	185		
Contrôle qualité	56		
<b>Total</b>	<b>4596</b>		





<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				
<b>TOTAL</b>	<b>1809</b>	<b>1505</b>	<b>1497</b>	<b>1450</b>	<b>1478</b>	<b>1350</b>	<b>1432</b>	<b>1172</b>	<b>1217</b>	<b>1199</b>	<b>1116</b>	<b>1047</b>	<b>1025</b>	<b>1025</b>	<b>1068</b>	<b>967</b>	



## CONTACT

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



POUR PLUS  
D'INFORMATIONS :  
**[WWW.SCIENSANO.BE](http://WWW.SCIENSANO.BE)**

**Sciensano** • Rue Juliette Wytsman 14 • 1050 Bruxelles • Belgique • T + 32 2 642 51 11 • T presse + 32 2 642 54 20 •  
[info@sciensano.be](mailto:info@sciensano.be) • [www.sciensano.be](http://www.sciensano.be)

Editeur responsable: Myriam Sheyers, directeur général • Rue Juliette Wytsman • 1050 Bruxelles • Belgique •