

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM

TUBERCULOSE & MYCOBACTERIËN

Jaarverlag 2020

—

Sciensano

Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten

NRC Tuberculose & Mycobacteriën

April 2021 • 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®)
 - Volledige genoomsequentiebepaling (**Whole Genome Sequencing, WGS**): uitgevoerd in 2019 in routine **op alle *Mycobacterium tuberculosis*** culturen in het NRC ontvangen.
 - Genotypering van de mycobacteriën van het *M. tuberculosis* complex door cgMLST analyse via WGS.

- 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 2020

- Diagnose of bevestiging : 3730 waarvan
 - 2725 culturen voor identificatie
 - 358 DNA extracten
 - 647 klinische stalen (637 voor detectie van latente TB, 10 voor GeneXpert)
- Surveillance-genotypering : 160 culturen van Brussel (TB-BRU-NET), ontvangen voor genotypering
- Kwaliteitscontrole: 76 stalen (microscoopglasje, culturen, DNA of pulmonaire stalen) ontvangen voor kwaliteitscontrole

In **totaal** maakt dit **3966** geanalyseerde stalen. Deze waren afkomstig van 85 klinische laboratoria uit Vlaanderen, Brussel en Wallonië; 53 van deze labo's stuurden meer dan 10 stalen op voor analyse.

IDENTIFICATIE VAN MYCOBACTERIËN VAN KLINISCHE OORSPRONG

2725 culturen (91.9% in vloeibare culturen en 8.1% op vast milieu) werden opgestuurd voor identificatie. In 1570 van deze stalen werd een mycobacterium geïdentificeerd: 524 (34%) van het *M. tuberculosis* complex en 1046 (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 (2005-2020) zijn opgelijst in tabel 3

Opvallend was dat in 1155 (42.4%) van de 2725 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 2020 werd in 524 isolaten (409 verschillende patiënten) *M. tuberculosis* (complex) geïdentificeerd. Een antibiogram werd uitgevoerd voor 332 patiënten (op 1 klinisch isolaat voor 308 en op 2 isolaten voor 12 patiënten). 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) : 295 (88.8%)

Stammen resistent aan I (en niet aan R) : 23 (6.9%)
Multiresistente stammen (I+R) : 8
Multiresistente stammen (I+R+E) : 5
Stammen mono-resistent aan R : 2

= 13 MDRs (3.9%)

Onder de **multiresistente stammen (MDR)**, zijn er alle nieuwe casus en alleen 3 (23%) tot de Beijing familie horen. Een *rpoB* mutatie werd teruggevonden in 100% van de RIF-resistente stammen (waarvan de mutatie S450L in 77% van de gevallen). 12 van de 13 MDR stammen (92%) droegen ook een *katG* (Ser315Thr) mutatie (1 MDR had alleen een promotermutatie in *inhA* (C-15T) en 1 stam droeg wel deze *inhA* mutatie in combinatie met *katG* mutatie).

Onder de stammen **mono-resistent aan isoniazide**, werd *katG* S315T teruggevonden in 43% van de isolaten en de

mutatie C-15T in *inhA* in 57% van de isolaten. Geen isolaat droeg beide mutaties.

Atypische mycobacteriën (NTMs)

Een gevoeligheidstest werd uitgevoerd voor 428 patiënten (459 isolaten), geïnfecteerd door de volgende NTMs : 161 *M. avium*, 48 *M. intracellulare cpx*, 60 *M. chimaera*, 26 *M. xenopi*, 54 complexe *M. chelonae-abcessus*, 19 *M. kansasii*, 16 complexe *M. fortuitum*, 8 *M. marinum*, 5 *M. malmoense* en 31 andere NTMs.

ANALYSE VAN DNA EXTRACTEN UIT KLINISCHE STALEN

Er werden 358 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 118 (waarvan 55 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. Van de 55 DNA van respiratoire oorsprong, bevatten er 5 *M. tuberculosis* DNA.

Er werden 136 DNA stalen opgestuurd vanuit anatomicopathologie laboratoria voor de opsporing van mycobacterieel DNA. Deze stalen waren afkomstig vanuit pulmonaire biopsies (91), 26 ganglion, 6 andere en 13 onbekende oorsprong. In 67.6% van de gevallen stelden we geen aanwezigheid van mycobacterieel DNA vast. Van de positieve stalen bevatten 13 enkel DNA van *M. tuberculosis cpx*, en 30 DNA afkomstig van een NTM infectie.

GENOTYPERING VAN MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

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 2020 werd genotypering uitgevoerd door Whole Genome Sequencing (WGS) op alle *Mycobacterium tuberculosis* culturen in het NRC ontvangen (409 patiënten voor diagnose + 160 voor de epidemiologische studie in Brusselse TB patienten)

In het algemeen, laat deze analyse clustering toe van TB isolaten. Op dit moment zijn er 591 clusters vastgesteld, met tussen de 2 en 46 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 160 **patiënten woonachtig in de Brusselse regio** gegenotypeerd in 2020 in ons laboratorium door WGS: 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 2020 was 3.9%. Van de 13 MDR-TB stammen, observeerde het NRC geen met ultrasensitieve (XDR, additionele resistentie tegen amikacin en een fluoroquinolone), 3 ware besmet met een MDR stam met extra resistentie tegen fluoroquinolones en 1 met extra resistentie tegen amikacine.
- Tussen de 2725 ontvangen culturen voor identificatie, waren er 91.9% (2504) vloeibare culturen (1545 BACTEC MGIT, 949 BacT/ALERT en 10 BACTEC 9.000) en 8.1% (221) op vaste agar.
- Van deze culturen bevatten **42.4%** geen mycobacteriën (contaminatie of vals positieve culturen). Het percentage van deze culturen varieert naargelang type milieu: 34.6% (535/1545) zijn MGITs, 60.3% (572/949) zijn afkomstig van BacT/ALERT, 40% (4/10) afkomstig van BACTEC 9.000 en 20% (44/221) 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 2007-20016) 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 Ceyskens, Brigitte Vanfleteren, Marianne Chantrenne, Tommi Asikainen, Els Duysburgh and Vanessa Mathys. Eurosurveillance, 2019 Mar;24(11):1800205;

- De meest voorkomende NTM species zijn *M.avium* (25.4%), *M. intracellulare-M.chimaera* complexe (25.1% van de NTMs), *M. gordonae* (15.7% van de NTMs), *M.chelonae/abscessus* complexe (9,8%) en *M.xenopi* (9.6%). 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 2020 was deze verhouding gelijkaardig (60.4%).

- 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.
- In 2020, hebben we voor het eerst een daling vastgesteld van het jaarlijkse aantal stammen/monsters dat voor analyse wordt ontvangen. Deze daling lijkt het gevolg te zijn van de COVID-19-pandemie.
- 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 Ceyskens, Brigitte Vanfleteren, Marianne Chantrenne, Tommi Asikainen, Els Duysburgh and Vanessa Mathys. Eurosurveillance, 2019 Mar;24(11):1800205.

TABLEAU 1: Identificatie van klinische culturen in 2020

TUB CPX			
Pathogenen TUBCPX	Complexe <i>M. tuberculosis</i>	141	
	<i>M. bovis</i>	8	
	<i>M. bovis</i> ssp B.C.G.	14	
	<i>M. tuberculosis</i>	355	
	<i>M. africanum</i>	6	
	Total TUB CPX	524	34 %
NTM			% NTM
Potentiele pathogenen	<i>M. arosiense</i>	1	
	<i>M. arupense</i>	2	
	<i>M. aubagnense</i>	3	
	<i>M. avium</i>	266	25.4 %
	<i>M. bohemicum</i>	2	
	<i>M. branderi</i>	3	
	<i>M. brumae</i>	1	
	<i>M. celatum</i>	3	
	<i>M. chelonae-abscessus</i> complexe	31	9.8%
	<i>M. abscessus</i>	31	
	<i>M. massiliense</i>	5	
	<i>M. bolletii</i>	10	
	<i>M. chelonae</i>	26	
	<i>M. fortuitum</i>	20	
	<i>M. fortuitum-senegalense-farcinigenes</i> complexe	3	
	<i>M. fortuitum-porcinum-neworleanense</i> complexe	11	
	<i>M. peregrinum-septicum</i> complexe	1	
	<i>M. goodii</i>	2	
	<i>M. gordonae</i>	165	15.7 %
	<i>M. interjectum</i>	5	
	<i>M. intracellulare</i> complexe	27	25.1 %
	<i>M. intracellulare</i>	67	
	<i>M. chimaera</i> (<i>M. intracellulare</i> complexe)	159	
	<i>M. timonense</i>	5	
	<i>M. marseillense</i>	4	
	<i>M. mageritense</i>	1	
	<i>M. kansasii</i>	35	
	<i>M. lentiflavum</i>	3	
	<i>M. llutzerense</i>	3	
	<i>M. malmoense</i>	6	
	<i>M. mantonii</i>	2	
	<i>M. marinum</i>	11	
	<i>M. mucogenicum-ratisbonense</i> complexe	6	
	<i>M. neoaurum</i>	1	
	<i>M. paraffinicum</i> (<i>scrofulaceum</i>)	2	
	<i>M. phlei</i>	1	
	<i>M. simiae</i>	4	
	<i>M. species</i>	1	
	<i>M. szulgai</i>	4	
	<i>M. terrae</i> complexe + <i>M. kumamotoense</i> (<i>terrae</i> cpx)	3+4	
	<i>M. triplex</i>	1	
	<i>M. vaccae</i> – <i>vanbelenii</i>	1	
<i>M. wolinsky</i>	1		
<i>M. xenopi</i>	101	9.6 %	
Mengsel <i>M. avium</i> + <i>M. abscessus massiliense</i>	1		
Mengsel <i>M. kansasii</i> + <i>M. chelonae</i>	1		
Totaal NTM	1046	66 %	
Totaal Mycobacteria	1570		
Negatief	1155		
Totaal culturen voor analyses	2725		
DNA extracten	358		
Stalen voor Genexpert	10		
Stalen voor Quantiferon	637		
Totaal (diagnostic)	3730		
Surveillance – Genotypering	160		
Kwaliteitscontrole	76		
Totaal	3966		

TABLEAU 2: Geanalyseerde stalen in 2020

	Complexe Mycobacterium tuberculosis	Mycobacterium tuberculosis	Mycobacterium bovis	Mycobacterium bovis ssp B.C.G.	Mycobacterium africanum	Mycobacterium arosiense	Mycobacterium arupense	Mycobacterium aubagnense	Mycobacterium avium	Mycobacterium bohemicum	Mycobacterium branderi	Mycobacterium brumae	Mycobacterium celatum	Mycobacterium chelonae - abscessus complexe	Mycobacterium abscessus	Mycobacterium massiliense	Mycobacterium bolletii	Mycobacterium chelonae	Mycobacterium fortuitum	Mycobacterium fortuitum-senegalense-farcinogenes cpx	Mycobacterium fortuitum - porcinum-neworleanense complexe	Mycobacterium fortuitum -pergrinum-septicum complexe	Mycobacterium goodii	Mycobacterium gordonae	Mycobacterium interjectum	Mycobacterium intracellulare complexe	Mycobacterium intracellulare	Mycobacterium chimera	Mycobacterium timonense	Mycobacterium marsellense	Mycobacterium mageritense	Mycobacterium kansasii	Mycobacterium lentiflavum	Mycobacterium llazerense	Mycobacterium malmoense	Mycobacterium mantonii	Mycobacterium marinum	M. mucogenicum-ratisbonense complexe	Mycobacterium neoaurum	Mycobacterium paraffinicum (scrofulaceum)	Mycobacterium phlei	Mycobacterium simiae	Mycobacterium species	Mycobacterium szulgai	Mycobacterium terrae/kumamotoense complexe	Mycobacterium triplex	Mycobacterium vaccae - vanbelenii	Mycobacterium wolinsky	Mycobacterium xenopi	Mélange Mycobacterium gordonae + intracellulare	Mélange Mycobacterium kansasii + M. chelonae	Negatifs	Total
Expectoration	78	128	1	1			2	97	1	3		2	21	15	3	9	16	11	3	6			66	4	11	34	97	3		1	19	2	3	3	1		6	2	1	4	4	2			50	1	1	484	1196				
Aspiration bronchique et endo-trachéale	17	47	1	1		1	55	1		1			4	10				3	2		2	69	7	14	38			3		6												4				25			300	612			
Liqu. broncho-alvéolaire	8	57	1	2		1	45					1		3	1					2		14	6	12	12	2	1		5	1		2										1	1			19			106	303			
Liqu. gastrique		3																			1	2				1																					11	18					
Liqu. d'ascite																																															1	1					
Liqu. pleural	2	13	1				1															1				1																				37	56						
Liqu. péricardique								2																																						2	4						
Liqu. péritonéal	1													1									1																							7	8						
Liqu. cérébro-spinal		2																						1																						5	9						
Liqu. Articulaire	1	3							2																		3																				5	14					
Hémoculture				2			1													1																										6	10						
Biopsie organe	4	19		1			3							1			1	1					1			1																					40	74					
Biopsie cutanée tendon	1		1	1										1			2									1																				6	20						
Biopsie osseuse		3		1									1																																	2	7						
Ganglion	6	27	3	1	1	1	23																						1																	43	106						
Pus	6	15					7						1				1	1																												2	41	56					
Abcès	5	13		2			6							1			1						1			1																					12	43					
Urine	4	1		5			3																1			1																					34	49					
Selles																																																1					
Autre							1																																								1	2					
Origine inconnue	8	24		2			21						3		1	1	5	4					9	1	1	3	8																					32	136				
Total	141	355	8	14	6	1	2	3	266	2	3	1	3	31	31	5	10	26	20	3	11	1	2	165	5	27	67	159	5	4	1	35	3	3	6	2	1	6	1	2	1	4	1	4	7	1	1	101	1	1	1155	2725	

<i>M. moriokanense</i>						1	1									
<i>M. montefiorensis</i>		1														
<i>M. mucogenicum - ratisbonense</i>	6	4	3	1	8	2	2	5	2	3	2	3			3	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
<i>M. noviomagensis</i>			3	1	1	1		1				1	1			
<i>M. novocastrensis</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. shimoidei</i>				1								1	1			
<i>M. smegmatis</i>								1	1	1						2
<i>M. sphagni</i>									1							5
<i>M. terrae complexe</i>	7	6	5	3	2				1	4	3	2				2
<i>M. timonense</i>				2	6											
<i>M. triplex</i>	1		1	2		5	1	1			5	1				1
<i>M. triviale</i>						2		1								
<i>M. vaccae</i>	1	1														
<i>M. vanbaalenii</i>			1	1												
<i>M. wolinskyi-jacuzzi</i>	1			3												
Autres bactéries					4	7	7	2	6	15	4	2		11	15	
Corynebacterium (autre famille)					9	23	26	12	13	12	13		7	4		
TOTAL	1570	1809	1505	1497	1450	1478	1350	1432	1172	1217	1199	1116	1047	1025	1025	1068

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 •