

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM

TUBERCULOSE & MYCOBACTERIËN

Jaarverlag 2021

—

Sciensano

Infectieziekten mens - Bacteriële ziekten

NRC Tuberculose & Mycobacteriën

April 2022 • Brussel • België



MATHYS, VANESSA

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

NATIONAAL REFERENTIE CENTRUM TUBERCULOSE & MYCPBACTERIËN
JAARVERSLAG 2021

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®)
 - Snelle detectie van de aanwezigheid van het *M. tuberculosis* complex en resistentie tegen isoniazide (INH), fluoroquinolones (FQs), ethionamide (ETH) et tweedelijns injecteerbare antibiotica (amikacin, kanamycin et capreomycin) (GeneXpert® MTB/XDR)

Het laboratorium opereert onder accreditatie (ISO15189)

STALEN ONTVANGEN VOOR ANALYSE IN 2021

- Diagnose of bevestiging : 3762 waarvan
 - 2674 culturen voor identificatie
 - 341 DNA extracten
 - 747 klinische stalen (728 voor detectie van latente TB, 19 voor GeneXpert)
- Surveillance-genotypering : 157 culturen van Brussel (TB-BRU-NET), ontvangen voor genotypering
- Kwaliteitscontrole: 70 stalen (microscopieglasje, culturen, DNA of pulmonaire stalen) ontvangen voor kwaliteitscontrole

In **totaal** maakt dit **3989** geanalyseerde stalen. Deze waren afkomstig van 84 klinische laboratoria uit Vlaanderen, Brussel en Wallonië; 41 van deze labo's stuurden meer dan 10 stalen op voor analyse.

IDENTIFICATIE VAN MYCOBACTERIËN VAN KLINISCHE OORSPRONG

2674 culturen (92% in vloeibare culturen en 8% op vast milieu) werden opgestuurd voor identificatie. In 1526 van deze stalen werd een mycobacterium geïdentificeerd: 538 (35%) van het *M. tuberculosis* complex en 988 (65%) 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 (2006-2021) zijn opgelijst in tabel 3

Opvallend was dat in 1148 (42.9%) van de 2674 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 2021 werd in 538 isolaten (411 verschillende patiënten) *M. tuberculosis* (complex) geïdentificeerd. Een antibiogram werd uitgevoerd voor 309 patiënten (op 1 klinisch isolaat voor 297, op 2 isolaten voor 10 patiënten en op 3 isolaten voor 2 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) : 272 (88%)

Stammen resistent aan I (en niet aan R) : 28 (9%)
Multiresistente stammen (I+R) : 5
Multiresistente stammen (I+R+E) : 4
Stammen mono-resistent aan R : 0

= 9 MDRs (2.9%)

Onder de **multiresistente stammen (MDR)**, zijn er alle nieuwe casus en alleen 4 (44%) tot de Beijing familie horen. Een *rpoB* mutatie werd teruggevonden in 88% (8/9) van de RIF-resistente stammen (waarvan de mutatie S450L in 100% van de gevallen). 8 van de 9 MDR stammen (88%) droegen ook een *katG* (Ser315Thr) mutatie (1 MDR droeg wel deze *inhA* mutatie in combinatie met *katG* mutatie).

Onder de stammen **mono-resistent aan isoniazide**, werd *katG* S315T teruggevonden in 57% van de isolaten en de

mutatie C-15T in *inhA* in 21% van de isolaten. Een isolaat droeg beide mutaties.

Atypische mycobacteriën (NTMs)

Een gevoeligheidstest werd uitgevoerd voor 424 patiënten (459 isolaten), geïnfecteerd door de volgende NTMs : 140 *M. avium*, 39 *M. intracellulare cpx*, 75 *M. chimaera*, 32 *M. xenopi*, 56 complexe *M. chelonae-abcsepus*, 18 *M. kansasii*, 18 complexe *M. fortuitum*, 7 *M. marinum*, 6 *M. malmoense* en 33 andere NTMs.

ANALYSE VAN DNA EXTRACTEN UIT KLINISCHE STALEN

Er werden 341 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 38 (waarvan 20 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 20 DNA van respiratoire oorsprong, bevatten er 4 *M. tuberculosis* DNA.

Er werden 204 DNA stalen opgestuurd vanuit anatomicopathologie laboratoria voor de opsporing van mycobacterieel DNA. Deze stalen waren afkomstig vanuit pulmonaire biopsies (147), 25 ganglion, 18 andere en 14 onbekende oorsprong. In 68.6% van de gevallen stelden we geen aanwezigheid van mycobacterieel DNA vast. Van de positieve stalen bevatten 15 enkel DNA van *M. tuberculosis cpx*, en 49 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 2021 werd genotypering uitgevoerd door Whole Genome Sequencing (WGS) op alle *Mycobacterium tuberculosis* culturen in het NRC ontvangen (411 patiënten voor diagnose + 157 voor de epidemiologische studie in Brusselse TB patienten)

In het algemeen, laat deze analyse clustering toe van TB isolaten. Op dit moment zijn er 173 clusters vastgesteld (nummering aangepast aan de nieuwe WGS-techniek), met tussen de 2 en 73 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 157 **patiënten woonachtig in de Brusselse regio** gegenotypeerd in 2021 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 2021 was 2.9%. Van de 9 MDR-TB stammen, observeerde het NRC geen met ultrasensitiviteit (XDR, additionele resistentie tegen amikacin en een fluoroquinolone), 1 was besmet met een MDR stam met extra resistentie tegen fluoroquinolones en geen met extra resistentie tegen amikacine.
- Tussen de 2674 ontvangen culturen voor identificatie, waren er 94% (2518) vloeibare culturen (1580 BACTEC MGIT, 865 BacT/ALERT en 15 BACTEC 9.000) en 6% (156) op vaste agar.
- Van deze culturen bevatten **42.9% (1148)** geen mycobacteriën (contaminatie of vals positieve culturen). Het percentage van deze culturen varieert naargelang type milieu: 33.9% (536/1580) zijn MGITs, 65.6% (568/865) zijn afkomstig van BacT/ALERT, 46.6% (7/15) afkomstig van BACTEC 9.000 en 23.7% (37/156) 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 Ceysens, 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 (24.8% van de NTMs), *M.chelonae/abscessus* complexe (12.5%), *M. gordonae* (11.2% van de NTMs), en *M.xenopi* (9.3%). 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 2021 was deze verhouding iets hoger: 71.1% (174 *M. chimaera* voor 245 *M. intracellulare* cpx).

- 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 Ceysens, Brigitte Vanfleteren, Marianne Chantrenne, Tommi Asikainen, Els Duysburgh and Vanessa Mathys. Eurosurveillance, 2019 Mar;24(11):1800205.

TABLEAU 1: Identificatie van klinische culturen in 2021

TUB CPX			
Pathogenen TUBCPX	<i>M. tuberculosis</i>	496	
	<i>M. bovis bovis</i>	9	
	<i>M. bovis ssp B.C.G.</i>	18	
	<i>M. bovis bovis</i> ou <i>M. bovis BCG</i>	5	
	<i>M. africanum</i>	10	
	Total TUB CPX	538	35 %
NTM		% NTM	
Potentiele pathogenen	<i>M. arupense</i>	3	
	<i>M. aubagnense</i>	6	
	<i>M. avium</i>	251	25.4 %
	<i>M. bohemicum</i>	1	
	<i>M. branderi</i>	2	
	<i>M. chelonae-abscessus</i> complexe	42	12.5%
	<i>M. abscessus</i>	26	
	<i>M. massiliense</i>	19	
	<i>M. bolletii</i>	7	
	<i>M. chelonae</i>	30	
	<i>M. elephantis</i>	2	
	<i>M. engbaekii</i>	1	
	<i>M. fortuitum</i>	16	
	<i>M. fortuitum-senegalense-farcinigenes</i> complexe	7	
	<i>M. fortuitum-porcinum-neworleanense</i> complexe	7	
	<i>M. peregrinum-septicum</i> complexe	1	
	<i>M. setense</i>	2	
	<i>M. frederikshornense</i>	1	
	<i>M. gordonae</i>	111	11.2 %
	<i>M. hassiacum</i>	1	
	<i>M. heraklionense</i>	2	
	<i>M. immunogenum</i>	1	
	<i>M. interjectum</i>	5	
	<i>M. intracellulare</i> complexe	20	24.8 %
	<i>M. intracellulare</i>	50	
	<i>M. chimaera (M. intracellulare</i> complexe)	174	
	<i>M. timonense</i>	1	
	<i>M. iranicum</i>	2	
	<i>M. kansasii</i>	32	
	<i>M. lentiflavum</i>	6	
	<i>M. llutzerense</i>	1	
	<i>M. malmoense</i>	10	
	<i>M. mantenii</i>	2	
	<i>M. marinum</i>	8	
	<i>M. mucogenicum-ratisbonense</i> complexe	4	
	<i>M. neoaurum</i>	1	
	<i>M. paraense</i>	2	
	<i>M. phlei</i>	1	
	<i>M. salmoniphilum</i>	1	
	<i>M. seoulense</i>	1	
	<i>M. shigaense (simiae cpx)</i>	1	
	<i>M. simiae</i>	10	
	<i>M. smegmatis</i>	1	
	<i>M. species</i>	2	
	<i>M. szulgai</i>	6	
	<i>M. terrae</i> complexe + <i>M. kumamotoense (terrae cpx)</i>	6+1	
	<i>M. triviale</i>	1	
<i>M. xenopi</i>	92	9.3 %	
<i>Mycobactérie atypique (identification précise impossible)</i>	2		
Mélange <i>M. abscessus</i> + <i>M. massiliense</i>	1		
Mélange <i>M. abscessus</i> + <i>M. avium</i>	1		
Mélange <i>M. abscessus</i> + <i>M. intracellulare</i>	1		
Mélange <i>M. avium</i> + <i>M. fortuitum</i> complexe	1		
Mélange <i>M. avium</i> + <i>M. intracellulare</i>	1		
Mélange <i>M. lentiflavum</i> + <i>Mycobactérie atypique</i>	1		
Totaal NTM	988	65 %	
Totaal Mycobacteria	1526		
Negatief	1148		
Totaal culturen voor analyses	2674		
DNA extracten	341		
Stalen voor Genexpert	19		
Stalen voor Quantiferon	728		
Totaal (diagnostic)	3762		
Surveillance – Genotypering	157		
Kwaliteitscontrole	70		
Totaal	3989		

<i>M. llutzerense</i>	1	3	2			1	1									
<i>M. mantonii</i>	2	2	5				1									
<i>M. massiliense</i>					3	3										
<i>M. morioakanense</i>							1	1								
<i>M. montefiorensis</i>			1													
<i>M. mucogenicum - ratisbonense</i>	4	6	4	3	1	8	2	2	5	2	3	2	3			3
<i>M. nebraskense</i>					1	2	1	1		1						
<i>M. neoaurum</i>	1	1		1			1									1
<i>M. nonchromogenicum</i>						1		1				1		1	6	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. paraense</i>	2															
<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>	1		2													
<i>M. saskatchewanense</i>					1	2	2									
<i>M. sensuense</i>					1		1									
<i>M. seoulensis</i>	1															
<i>M. setensis</i>								1								
<i>M. sherrisii</i>													1	3		
<i>M. shimoidei</i>					1								1	1		
<i>M. smegmatis</i>	1								1	1	1					
<i>M. sphagni</i>										1						5
<i>M. terrae complexe</i>	7	7	6	5	3	2				1	4	3	2			
<i>M. timonensis</i>					2	6										
<i>M. triplex</i>		1		1	2		5	1	1			5	1			1
<i>M. triviale</i>	1						2		1							
<i>M. vaccae</i>			1													
<i>M. vanbaalenii</i>		1		1	1											
<i>M. wolinskyi-jacuzzi</i>		1			3											
<i>Mycobactéries atypiques non déterminée</i>	2															
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	1526	1570	1809	1505	1497	1450	1478	1350	1432	1172	1217	1199	1116	1047	1025	1025

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 •