

CENTRE  
NATIONAL DE  
RÉFÉRENCE

TUBERCULOSE &  
MYCOBACTÉRIES

Rapport annuel 2021

---



## Sciensano

### Maladies Infectieuses Humaines - Maladies bactériennes

### CNR Tuberculose & Mycobactéries

Avril 2022 • Bruxelles • Belgique



MATHYS, VANESSA

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

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE TUBERCULOSE & MYCOBACTERIES  
RAPPORT ANNUEL 2021

## 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<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>sl</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 depuis 2019 en routine **sur toutes les cultures de *Mycobacterium tuberculosis*** reçues au CNR
  - Génotypage 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® MTB/RIF)
  - détection rapide de la présence de *M. tuberculosis* complexe et de sa résistance à l'isoniazide (INH), les fluoroquinolones (FQs), l'ethionamide (ETH) et les antibiotiques injectables de seconde ligne (amikacin, kanamycin et capreomycin) (GeneXpert® MTB/XDR)

Le laboratoire utilise des techniques accréditées (ISO15189)

## ECHANTILLONS REÇUS POUR ANALYSES EN 2021

- Diagnostic ou confirmation : 3762 dont
  - 2674 cultures pour identification
  - 341 extraits d'ADN
  - 747 prélèvements cliniques (728 pour détection de tuberculose latente par test IGRA et 19 pour GeneXpert)
- Surveillance-génotypage : 157 cultures de patients bruxellois (étude TB-BRU-NET) reçues pour génotypage
- Contrôle de qualité : 70 échantillons (lames, expectorations, cultures ou ADN) reçus pour contrôle de qualité

**Total** (échantillons analysés): 3989

Origine géographique : les échantillons cliniques provenaient de 84 laboratoires différents du pays répartis à Bruxelles, en Wallonie et en Flandre, dont 41 ont envoyé plus de 10 échantillons pour analyse.

## MYCOBACTÉRIES D'ORIGINE CLINIQUE IDENTIFIÉES

2674 cultures (92% en milieu liquide et 8% sur milieu solide) ont été envoyées pour identification. Une mycobactérie a pu être identifiée dans 1526 de ces cultures : 538 (35%) complexes *M. tuberculosis* et 988 (65%) 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 2006 sont données dans le tableau 3.

On notera que 1148 (42.9%) des 2674 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 2021, *M. tuberculosis* (complexe *M. tuberculosis*) a été identifié sur 538 isolats cliniques provenant de 411 patients différents. Le test de sensibilité a été effectué pour 309 patients (sur 1 isolat clinique pour 297 et sur 2 isolats pour 10 d'entre eux et sur 3 isolats pour 2 patients). 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) : 272 (88%)

Patients résistants à I (et pas à R)	: 28 (9%)
Patients multirésistants (I+R)	: 5
Patients multirésistants (I+R+E)	: 4
Patients résistants à R uniquement	: 0

= 9 patients MDR (2.9%)

Parmi les **souches multirésistantes**, toutes sont des nouveaux cas. Parmi ceux-ci, 4 (44%) appartenait à la famille Beijing. Une mutation dans *rpoB* a été retrouvée dans 88% (8/9) des isolats résistants à la rifampicine (dont la mutation S450L dans 100% des cas). Une mutation dans *katG* (Ser315Thr) a été retrouvée chez 8 des 9 souches, soit 88% des isolats MDR (1 MDR avait une la combinaison de mutation *inhA* et *katG*).

Parmi les isolats **mono-résistants à l'isoniazide**, la mutation S315T dans *katG* a été retrouvée chez 57% des isolats, la mutation C-15T dans *inhA* chez 21% des isolats. Un isolat présentait les 2 mutations ensemble.

## Mycobactéries atypiques ou NTM

Le test de sensibilité a été effectué pour 424 patients (456 isolats) infectés par les mycobactéries suivantes: 140 *M. avium*, 39 *M. intracellulare cpx*, 75 *M. chimaera*, 32 *M. xenopi*, 56 complexe *M. chelonae-abcseusus*, 18 *M. kansasii*, 18 complexe *M. fortuitum*, 7 *M. marinum*, 6 *M. malmoense* et 33 autres mycobactéries atypiques.

## ANALYSE DES ADN EXTRAITS D'ÉCHANTILLONS CLINIQUES

341 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 341 ADN, 38 (dont 20 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). Parmi les 20 ADN d'origine respiratoire, 4 contenaient de l'ADN de *M.tuberculosis*.

204 autres ADN nous ont été envoyés par trois laboratoires d'anatomo-pathologie pour recherche de la présence d'ADN mycobactérien. Ces ADN provenaient de biopsies d'origine pulmonaire ou d'organe (147), 25 ganglions, 18 d'autres origines et 14 d'origine inconnue. Dans 68.6% des cas, nous n'avons pas mis en évidence la présence d'ADN de mycobactérie, 15 seulement contenaient de l'ADN du complexe *M.tuberculosis*, et 49 de l'ADN de mycobactérie atypique.

## GENOTYPAGE DES BACILLES DE LA TUBERCULOSE

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, techniqué en même temps). Il permet également de distinguer les tuberculoses humaines dues à *M.bovis* des tuberculoses classiques dues à *M.tuberculosis*.

En 2021, le génotypage a été effectué par Whole Genome Sequencing (WGS) sur tous les isolats cliniques de *Mycobacterium tuberculosis* complexe reçus pour analyse au CNR (411 patients du diagnostic + 157 pour l'étude d'épidémiologie moléculaire à Bruxelles)

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 173 clusters (numérotation adaptée à la nouvelle technique du WGS) comprenant de 2 à 73 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,.....

Dans le cadre d'une étude d'épidémiologie moléculaire de la tuberculose à Bruxelles (projet **TB-BRU-NET**), les isolats de *M. tuberculosis* de 157 **patients habitant la Région bruxelloise** ont été génotypés en 2021 dans notre laboratoire, par WGS. 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 2.9% en 2021. Parmi les 9 nouveaux patients MDR détectés en 2021, aucun n'était infecté par une souche XDR (ultra-résistante : souche MDR avec résistance additionnelle à l'amikacin et à une quinolone), 1 était infecté par une souche multirésistante avec une résistance supplémentaire aux quinolones et aucun par une souche multirésistante présentant une résistance supplémentaire uniquement à l'amikacine.
- Parmi les 2674 cultures envoyées pour identification, 94% (2518) étaient des cultures en milieu liquide (1580 en provenance du BACTEC MGIT, 865 du BacT/ALERT, 15 du BACTEC 9.000) et 6% (156) étaient sur milieu solide.
- D'autre part, 1148 cultures (**42.9%**) 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 : 33.9% (536/1580) des cultures MGIT, 65.6% (568/865) des cultures provenant du BacT/ALERT, 46.6% (7/15) des cultures en BACTEC 9.000 et 23.7% (37/156) 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 pour la période 2007-2016 et publié dans l'article suivant :  

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.
- 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. avium* (25.4%), *M.intracellulare-M.chimaera* complexe (24.8% des NTM), *M. chelonae/abscessus* complexe (12.5% des NTM), *M. gordonae* (11.2% des NTM) et *M. xenopi* (9.3% 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.)

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE TUBERCULOSE & MYCOBACTERIES  
RAPPORT ANNUEL 2021

La proportion de *M. chimaera* identifiés en 2021 est légèrement plus élevée : 71.1 % (174 *M. chimaera* sur 245 *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.
- En 2020, nous avons observé pour la première fois une diminution du nombre annuel de cultures/échantillons reçus pour analyse. Cette diminution semble être la conséquence de la pandémie COVID-19.
- 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 faussement 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 Ceyssens, Brigitte Vanfleteren, Marianne Chantrenne, Tommi Asikainen, Els Duysburgh and Vanessa Mathys. Eurosurveillance, 2019 Mar;24(11):1800205.



**TABLEAU 1: Identification de cultures d'origine clinique en 2021**

<b>TUB CPX</b>			
Pathogènes 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 ou M. bovis BCG</i>	5	
	<i>M. africanum</i>	10	
	<b>Total TUB CPX</b>	<b>538</b>	<b>35 %</b>
<b>NTM</b>			<b>% NTM</b>
Potentiellement pathogènes	<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 complexe</i>	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 complexe</i>	7	
	<i>M. fortuitum-porcinum-neworleanense complexe</i>	7	
	<i>M. peregrinum-septicum complexe</i>	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 complexe</i>	20	24.8 %
	<i>M. intracellulare</i>	50	
	<i>M. chimaera (M. intracellulare complexe)</i>	174	
	<i>M. timonense</i>	1	
	<i>M. iranicum</i>	2	
	<i>M. kansasii</i>	32	
	<i>M. lentiflavum</i>	6	
	<i>M. llatzerense</i>	1	
	<i>M. malmoense</i>	10	
	<i>M. mantonii</i>	2	
	<i>M. marinum</i>	8	
	<i>M. mucogenicum-ratisbonense complexe</i>	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 complexe + 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 + M. massiliense</i>	1		
Mélange <i>M. abscessus + M. avium</i>	1		
Mélange <i>M. abscessus + M. intracellulare</i>	1		
Mélange <i>M. avium + M. fortuitum complexe</i>	1		
Mélange <i>M. avium + M. intracellulare</i>	1		
Mélange <i>M. lentiflavum + Mycobactérie atypique</i>	1		
<b>Total NTM</b>	<b>988</b>	<b>65 %</b>	
<b>Total Mycobacteria</b>	<b>1526</b>		
Négatifs (cultures ne contenant pas de mycobactéries)	1148		
<b>Total cultures cliniques analyses</b>	<b>2674</b>		
Extraits d'ADN	341		
Prélèvements cliniques pour Genexpert	19		
Prélèvements cliniques pour Quantiferon	728		
<b>Total (diagnostic)</b>	<b>3762</b>		
Surveillance – Genotypage	157		
Contrôle qualité	70		
<b>Total</b>	<b>3989</b>		





<i>M. llutzerense</i>	1	3	2			1	1									
<i>M. mantenii</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. seoulense</i>	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	1					
<i>M. sphagni</i>										1						5
<i>M. terrae complexe</i>	7	7	6	5	3	2				1	4	3	2			
<i>M. timonense</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	
<b>TOTAL</b>	<b>1526</b>	<b>1570</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>



## 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 Sneyers, directeur général • Rue Juliette Wytsman • 1050 Bruxelles • Belgique •