

Coördinaten van het referentiecentrum

Dr. Ap. M. FAUVILLE-DUFAUX	WIV-ISP – Mycobacteriën	Engelandstraat 642	1180 Brussel
Dr. V. MATHYS			
Tel.: 02 373 32 10	Fax: 02 373 32 81	E-mail: Maryse.fauville@wiv-isp.be Vanessa.mathys@wiv-isp.be	

Onderstaande gegevens zijn afkomstig van de Operationele Directie **Overdraagbare en besmettelijke ziekten van het WIV-ISP**, laboratorium **Tuberculose en Mycobacteriën**.

Inleiding

De volgende analyses werden uitgevoerd:

- ◆ op DNA-extract
 - ◆ identificatie
 - ◆ opsporing van genmutaties geassocieerd met antibioticaresistentie
- ◆ op positieve culturen
 - ◆ identificatie, door moleculaire biologie (specifieke PCR van verschillende mycobacteriële species, amplificatie van een fragment van het gen coderend voor 16S rRNA gevolgd door een sequentieanalyse, Inno-Lipa-Mycobacteria of , GenoType *Mycobacterium*, tests, PCR waarvan de leden van het *M. tuberculosis*-complex onderscheiden kunnen worden)
 - ◆ gevoeligheidstest voor *M. tuberculosis*
 - in Bactec MGIT 960 (vloeibare voedingsbodem) voor de eerstelijnstuberculostatica, met name isoniazide (I), rifampicine (R), ethambutol (E) en Pyrazinamide (PZA) (pas op, voor PZA is het resultaat van de in-vitrotest niet altijd in overeenstemming met de in vivo activiteit van het antibioticum)
 - door de methode Bactec 460TB voor tweedelijnsantituberculostatica in geval van resistentie tegen eerste lijn antibiotica
 - door de test Inno-Lipa-Rif-TB of GenoType MTBDR*plus* of door een sequentieanalyse van een regio van 81 pb van het *rpoB* gen om de resistentie tegen rifampicine na te gaan
 - door multiplex PCR om de mutatie S315T in het gen *katG* en de mutatie C-15T in de promotor regio van het gen *inhA* op te sporen om de resistentie tegen isoniazide na te gaan
 - ◆ gevoeligheidstests op atypische mycobacteriën, alleen wanneer het klinische geval dit rechtvaardigt (proportiemethode van Canetti in vaste voedingsbodem, methode Sensititre bij de snel groeiende mycobacteriën)
 - ◆ genotypering van mycobacteriën van het *M. tuberculosis* complex, in geval van resistentie tegen eerstelijnstuberculostatica, in geval van een vermoeden van een epidemie of laboratoriumbesmetting of op uitdrukkelijk verzoek (technieken: spoligotyping en MIRU-VNTR op 24 loci).

Het laboratorium gebruikt geaccrediteerde technieken (ISO 17025).

Stalen ontvangen voor analyse in 2011

Aantal: 1.992	1.765 culturen voor identificatie
	33 klinische stalen (waarvan 20 voor een externe kwaliteitscontrole)
	18 referentiestammen voor collectie
	42 stammen voor externe kwaliteitscontrole (gevoeligheidstest, identificatietest en genotyperingstest)
	116 DNA-extracten (waarvan 6 voor een externe kwaliteitscontrole)
	18 gefixeerde plaatjes voor een externe kwaliteitscontrole.

Geografische oorsprong: zij waren afkomstig van 91 verschillende laboratoria, verspreid over Brussel, Wallonië en Vlaanderen, waarvan er 48 meer dan 10 stalen voor analyse opgestuurd hebben.

Geïdentificeerde mycobacteriën van klinische oorsprong

1.765 culturen (91% in vloeibare voedingsbodem en 9% op vaste voedingsbodem) werden voor identificatie opgestuurd. Een mycobacterie werd geïdentificeerd in **1.189** van die culturen: **493** (41,4%) *M. tuberculosis*-complexen en **696** (58,5%) atypische mycobacteriën of NTM.

- ◆ De verschillende geïdentificeerde mycobacteriën worden in tabel 1 vermeld.
- ◆ De identificaties per type klinisch staal worden in tabel 2 gedetailleerd.
- ◆ In tabel 3 staan de verschillende mycobacteriële species die sinds 1998 jaarlijks worden geïdentificeerd.
- ◆ Opmerkelijk is het feit dat 576 (32,6%) van de 1.765 culturen opgestuurd ter identificatie geen mycobacteriën bevatten (zij bevatten een besmettend micro-organisme of geen enkele bacteriële ontwikkeling en werden dan vals positief voortgekomen uit de kweekautomaat van het laboratorium van oorsprong).

Gevoeligheidstests

1. *M. tuberculosis*

In 2011 werd *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis* complex) geïdentificeerd in 493 klinische isolaten van 395 verschillende patiënten. De gevoeligheidstest werd uitgevoerd voor 339 patiënten (op 1 klinisch isolaat voor 329 patiënten en op 2 isolaten voor 10 van hen). Het antibiogram werd niet uitgevoerd op de stammen verstuurd voor genotypering, op besmettelijke culturen, of wanneer de stam geïsoleerd was in een laboratorium dat zelf de gevoeligheidstests uitvoerde.

Patiënten gevoelig voor I (isoniazide), R (rifampicine) en E (ethambutol): 288 (84,9%)

Patiënten gevoelig voor I (en niet voor R) : 27 (7,9 %)	} 20 patiënten MDR (5,9%), waarvan 14 nieuwe gevallen
Patiënten multiresistent (I+R) : 5	
Patiënten multiresistent (I+R+E) : 15	
Patiënten alleen resistent tegen R : 3	

Onder de multiresistente stammen tellen we 10 stammen (50%) behorend tot de familie Beijing. Een mutatie in *rpoB* werd aangetroffen in 19 van 20 isolaten resistent tegen rifampicine (mutatie S531L in 79% van de stammen). Een mutatie in *katG* of *inhA* werd aangetroffen in 95% (19/20) van de MDR-isolaten (*katG* in 84,2% van de isolaten; *inhA* alleen in 1 isolaat (5,2%); *katG* + *inhA* in 10,5% van de isolaten).

Onder de isolaten mono-resistent tegen isoniazide (of resistent tegen isoniazide en ethambutol) werd de mutatie S315T in *katG* aangetroffen in 53,3% van de isolaten, de mutatie -C15T in *inhA* in 23,3% van de isolaten. Geen enkel isolaat heeft beide mutaties samen. De resterende 23,3% van de isolaten hadden de gezochte mutatie in deze 2 genen niet.

2. Atypische mycobacteriën of NTM

De gevoeligheidstest werd uitgevoerd voor 202 patiënten (207 isolaten) besmet met de volgende mycobacteriën: 133 *M. avium-intracellulare*, 18 *M. xenopi*, 17 *M. kansasii*, 14 *M. chelonae-abcsepsus* complex, 7 *M. malmoense*, 4 *M. fortuitum*, 1 *M. marinum* en 8 andere atypische mycobacteriën.

Analyse van DNA geëxtraheerd uit klinische stalen

Wij hebben 110 DNA-stalen (geëxtraheerd in het laboratorium dat het staal had gekregen) ontvangen ter identificatie en/of opsporing van genmutaties geassocieerd met resistentie tegen isoniazide en rifampicine.

Van de 110 DNA-stalen werden er 27 (waarvan 6 van respiratoire oorsprong) ontvangen van een ziekenhuis voor snelle opsporing van mutaties in *rpoB*, *katG* en *inhA* (patiënten met mogelijke multiresistente tuberculose) en 58 (28 afkomstig van long- of orgaanbiopten, 2 huidbiopten, 16 van klieren en 12 van andere oorsprongen) van een laboratorium voor anatomopathologie voor de opsporing van de aanwezigheid van mycobacterieel DNA.

Twee van de 6 DNA van respiratoire oorsprong bevatten DNA van *M. tuberculosis* (geen enkel vertoonde een mutatie geassocieerd met multiresistentie). Wat de DNA stalen van het laboratorium voor anatomopathologie betreft, 86,2% bevatten geen mycobacterieel DNA, slechts 6 bevatten DNA van het *M. tuberculosis*-complex en 2 DNA van atypische mycobacteriën.

Genotypering van de tuberculosebacillen: voor 89 patiënten + 263 voor de studie van moleculaire epidemiologie in Brussel

In ons laboratorium worden twee genotyperingstechnieken op basis van verschillende merkers gebruikt om de genetische afdruk van de tuberculosebacillen te bepalen: spoligotypering en MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit - Variable Number Tandem Repeat) op 24 loci. Genotypering biedt de gelegenheid om de overdrachtswegen van de tuberculose na te gaan (bevestiging van intrafamiliale besmetting of besmetting onder burens, micro-epidemies, opsporing van kruisbesmettingen in laboratoria tussen twee stalen die tegelijkertijd worden behandeld). Dankzij de techniek kan ook humane tuberculose ten gevolge van *M. bovis* worden onderscheiden van klassieke tuberculose ten gevolge van *M. tuberculosis*.

Genotypering wordt toegepast op alle klinische isolaten resistent tegen isoniazide (27 patiënten), op alle multiresistente isolaten (20 andere patiënten) en op verzoek, op isolaten gevoelig voor antibiotica in geval van een vermoeden van een epidemie of besmetting (42 patiënten).

Er is één cluster van 2 stammen vastgesteld onder de monoresistente isolaten met isoniazide.

Van de 20 multiresistente isolaten behoorden er 3 tot 2 clusters die eerder waren vastgesteld. Onder de 3 stammen behorend tot clusters vertoonden er 2 een identiek profiel (dezelfde cluster), zij behoorden tot de familie Beijing. De stammen die de vorige jaren werden geïsoleerd uit meerdere patiënten met multiresistente tuberculose afkomstig van Oost-Europa maken al deel uit van deze cluster van Beijing. De derde multiresistente stam in cluster behoorde tot de genetische familie van stam T2.

Onder de multigevoelige stammen van de 42 patiënten voor wie een genotypering werd gevraagd, maakten er 22 deel uit van een cluster. Wij hebben inderdaad 9 clusters onder deze patiënten vastgesteld hetzij 7 clusters van 2 patiënten, 1 van 3 patiënten en 1 van 5 patiënten. Deze clusters waren het resultaat van besmettingen door contact (rusthuis, schoolklas, enz.) of door kruisbesmettingen in laboratoria. De opsporing van deze kruisbesmettingen heeft ertoe geleid dat de vals positieve patiënten niet nodeloos werden behandeld.

In het kader van een moleculaire epidemiologische studie van tuberculose in Brussel (Europees project **TB PAN NET 2009**) werd in ons laboratorium het genotype bepaald van *M. tuberculosis* isolaten van **263 patiënten woonachtig in de Brusselse regio** door spoligotypering en MIRU-VNTR op 24 loci. De administratieve en klinische gegevens van de patiënten werden verzameld bij de FARES-VRGT. Uit deze studie blijkt dat 82% van de patiënten in Brussel van buitenlandse oorsprong waren.

De 567 stammen geïsoleerd in Brussel in 2010 (304) en 2011 (263) vertoonden een grote genetische diversiteit. Wij hebben inderdaad 447 verschillende profielen vastgesteld hetzij 380 (85%) stammen met een uniek profiel (dat hen eigen is) en 187 stammen die deel uitmaakten van een cluster. Wij hebben 67 clusters van 2 tot 8 besmette patiënten vastgesteld die door een identieke stam waren besmet. 25 patiënten waren door een multiresistente stam besmet.

De patiënten in grote clusters worden op het terrein onderzocht door de FARES-VRGT om te bepalen hoe zij zijn besmet en om een tuberculinecontrole van hun omgeving uit te voeren.

De 567 stammen geanalyseerd in 2010 en 2011 behoorden tot de volgende genetische families (gereguleerd in de internationale basis van de spoligotypes): families T (24%), H (18%), LAM (15%), Beijing (6,1%), U (3,6%), CAS (3,4%), EAI (2,8%).

Opmerkingen

- De nationale gegevens over het aantal gevallen van tuberculose in België en het aantal multiresistente patiënten worden verzameld en verspreid door FARES-VRGT (Fonds des Affections Respiratoires – Vlaamse vereniging voor Respiratoire Gezondheidszorg en tuberculosebestrijding vzw).
- De percentages van tuberculose gevallen resistent tegen isoniazide en multiresistent (MDR-TB: hetzij resistentie tegen ten minste isoniazide en rifampicine) geregistreerd in ons laboratorium zijn vergelijkbaar met de percentages vastgesteld in de voorgaande jaren (5,9% MDR in 2011 versus 6,4% MDR in 2010, 6,1% in 2009 en 6,6% in 2008). Onder de 14 nieuwe MDR-patiënten waren er 3 patiënten besmet met een XDR stam (ultraresistent: stam MDR met bijkomende resistentie tegen amikacine en een quinolone), 1 andere patiënt was besmet met een multiresistente stam met een extra resistentie tegen amikacine (maar gevoelig aan quinolonen) en 2 patiënten door een MDR stam gevoelig aan amikacine maar resistent tegen quinolonen. Deze gevallen van ultraresistente tuberculose zijn heel moeilijk te behandelen en vereisen een maandenlange isolatie van de patiënten in een kamer met negatieve druk in het Sint-Pieterziekenhuis. Deze patiënten worden opgenomen in de studie BELTA TB NET; hun behandeling wordt door het RIZIV gefinancierd.

- 91% (N=1.603) van de 1.765 kweken verstuurd voor identificatie waren kweken in een vloeibare voedingsbodem (830 BACTEC MGIT, 12 van radiometrische BACTEC, 592 van BacT/ALERT, 169 van BACTEC 9.000) en 9% (162) ervan waren kweken op een vaste voedingsbodem.
- Anderzijds bevatten 576 kweken (32,6%) geen mycobacterie (besmette of vals positieve kweken). Het percentage van culturen **zonder** mycobacterie varieerde in functie van de gebruikte voedingsbodem. Percentages vals positieven: 37,5% (311/830) van de kweken in MGIT; 32,9% (195/592) van de kweken afkomstig van de BacT/Alert), 26,0% (44/169) van de kweken in Bactec 9.000 en 16,0% (26/162) van de kweken op vaste voedingsbodem. Dit buitengewoon hoge percentage van vals positieve culturen dat voor identificatie naar het referentiecentrum is verstuurd, heeft te maken met het feit dat de kweekbuizen alleen in laboratoria met een L3-infrastructuur kunnen worden geopend. Dit abnormaal hoge percentage van vals positieve culturen genereert veel nutteloos werk en vereist een herziening van de procedures voor de decontaminatie van de stalen in de laboratoria voor klinische biologie die de primocultuur uitvoeren, evenals de verificatie/ijking van de kweekautomaten.
- De besmette of negatieve kweken vereisen veel meer werk (om zich ervan te vergewissen dat zij echt geen mycobacteriën bevatten) dan de identificatie van een zuivere mycobacteriële kweek.
- De meest geïsoleerde species van NTM waren net zoals voorgaande jaren *M. xenopi* (12,6% van de NTM) en *M. goodii* (28,4% van de NTM; niet pathogeen).
- In vergelijking met voorgaande jaren neemt de proportie van *M. avium* en *M. intracellulare* toe (39,6% van de atypische mycobacteriën geïdentificeerd in 2011 versus 32,1% in 2010, 32,8% in 2009; 37,6% in 2008; 32% in 2007 en 22% in 2006 (tabel 3). Dit zou het gevolg kunnen zijn van het feit dat meerdere laboratoria tegenwoordig zelf, door middel van commerciële moleculaire tests, de mycobacteriële species in cultuur identificeren en de stammen alleen voor een antibiogram naar ons sturen. Men zou dan ook kunnen beschouwen dat het aantal pathologieën in verband gebracht met *M.avium-intracellulare* groter is dan het aantal dat met andere species in verband wordt gebracht.
- Wat de NTM betreft, weten wij niet hoeveel er werkelijk aan de oorsprong liggen van een ziekte omdat wij niet over de klinische gegevens van de patiënten beschikken.

Tabel 1: Mycobacteriën: identificatie van culturen uit klinische stalen (N; 2011)

TUB CPX		
Pathogeen	<i>Cpx M. tuberculosis</i>	467
	Mengeling <i>cpx M.tub</i> en atypisch	2
	<i>M. bovis</i>	12
	<i>M. bovis</i> ssp B.C.G.	10
	<i>M. africanum</i>	2
Totaal TUB CPX		493 41,5%
NTM		% NTM
Potentieel pathogeen	<i>M. abscessus</i>	7
	<i>M. avium</i>	142
	<i>M. asiaticum</i>	1
	<i>M. chelonae subsp. chelonae</i>	5
	<i>Cpx M. chelonae-abscessus</i>	18
	<i>Cpx M. fortuitum-peregrinum</i>	24
	<i>Cpx M. fortuitum-porcinum-boenickei</i>	2
	<i>M. genavense</i>	2
	<i>M. haemophilum</i>	2
	<i>M. interjectum</i>	3
	<i>M. Intracellulare</i>	134
	<i>M. kansasii</i>	20
	<i>M. lentiflavum</i>	3
	<i>M. malmoense</i>	8
	<i>M. mantii</i>	2
	<i>M. marinum</i>	2
	<i>M. mucogenicum</i>	3
	<i>M. scrofulaceum</i>	3
	<i>M. szulgai</i>	5
	<i>M. wolinskyi - jacuzzi</i>	1
	<i>M. xenopi</i>	88
	Mengeling <i>M. avium</i> en <i>M. intracellulare</i>	1
	Mengeling <i>M. avium</i> en <i>M. fortuitum</i>	1
	Mengeling <i>M. avium</i> en <i>M. gordonae</i>	1
	Mengeling <i>M. intracellulare</i> en <i>M. gordonae</i>	1
	Mengeling <i>M. gordonae</i> en <i>M. xenopi</i>	1
	Niet * of zeldzaam pathogeen	<i>M. aubagnense</i>
<i>M. branderi</i>		2
<i>M. gordonae</i>		198
<i>M. phlei</i>		1
<i>M. hiberniae</i>		1
<i>M. parascrofulaceum</i>		1
<i>M. smegmatis</i>		1
<i>M. terrae</i>		4
<i>M. species</i>		7
Totaal NTM		696 58,5%
Totaal Mycobacteria		1189
<i>Corynebacterium</i> of andere		28
Negatief (kweken zonder de mycobacteriën)		548
Totaal klinische kweken getest		1765
Referentiestammen voor collectie		18
Kwaliteitscontrole		42
DNA-extracten		116
Klinische monsters		33
Lames fixées pour contrôles de qualité		18
Totaal		1992

227

myco_b_t1

Tabel 3: Mycobacteriële species van klinische oorsprong geïdentificeerd sinds 1998

Cpx	Cpx <i>M. tuberculosis</i>	467	489	397	468	415	451	462	437	421	422	438	521	492	413
<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>					5	12	1							
	Mengeling <i>M. tuberculosis</i> + atypisch	2	3	2	2		2	1	1	1	7	5	3	6	1
	<i>M. africanum</i>	2	2			1		1		2					
	<i>M. bovis</i>	12	15	5	8	3	1	3	1	2	3		3	5	
	<i>M. bovis</i> BCG	10	8	5	1	3	6	2	4	1		2	1	3	1
	Mengeling <i>M. bovis</i> BCG + <i>M. gordonae</i>							1							
Opportunistische atypische Mycobacteriën	<i>M. avium</i>	142	128	128	122	117	79	93	77	56	70	62	57	71	41
	<i>M. intracellulare</i>	134	88	101	90	74	55	49	47	32	30	29	65	25	11
	Mengeling <i>M. avium</i> + atypisch	3	1		2										
	Mengeling <i>M. intracellulare</i> + atypisch	1	1												
	<i>M. celatum</i>		3	4		3				1	1		1	2	
	Cpx <i>M. chelonae-abscessus</i>	30	20	32	25	21	23	32	37	42	38	36	56	15	3
	Cpx <i>M. fortuitum-peregrinum</i>	24	20	16	17	17	17	21							
	<i>M. genavense</i>	2	1			2						1			
	<i>M. haemophilum</i>	2			2	2	1	2	1		1				
	<i>M. immunogen</i>							1			1	1	2		
	<i>M. interjectum</i>	3	4	2	3	5	7	5	1	1	2	2	5	2	
	<i>M. intermedium</i>		3	5	2	2		1		1	1				
	<i>M. kansasii</i>	20	30	24	41	32	31	25	20	18	35	36	32	29	17
	Mengeling <i>M. kansasii</i> + <i>M. avium</i>											1			
	Mengeling <i>M. kansasii</i> + <i>M. gordonae</i>												1		
	<i>M. lentiflavum</i>	3	13	5	7	11	5	7	4	14	4	5	7		
	<i>M. malmoeense</i>	8	9	3	7	9	11	4	4	3	6	4	8	20	2
	<i>M. marinum</i>	2	6	6	6	8	11	8	4	3	7	16	15	2	
	<i>M. paraffinicum</i>			2		4	5			5		8			
	<i>M. peregrinum</i>									3	7	4		4	
	<i>M. scrofulaceum</i>	3		1	6	4	2	3	2	1	1	2	7	3	
	Mengeling <i>M. scrofulaceum</i> + <i>M. gordonae</i>											1			
	<i>M. simiae</i>		11	9	9	4	1	6	14	1	4	6	4	4	
	<i>M. szulgai</i>	5	4	3	3	6	3	4	6	1	2	3		3	
	<i>M. xenopi</i>	88	132	138	127	126	115	149	123	111	108	94	100	83	49
	Mengeling <i>M. xenopi</i> + <i>M. gordonae</i>	1	1	1									2		
	<i>M. species</i>	11			5		4	6	3	6	13	10	10	6	
Zeer zelden of niet pathogeen	<i>M. agri</i>					1			1	1					
	<i>M. alvei</i> *			1					1	4	2				
	<i>M. anthracenicum</i> *			3			4	23	3						
	<i>M. arupense</i>		3	1											
	<i>M. aubagnense</i>	1			1										
	<i>M. bohemicum</i>		2		1	2	2	2	2	1		2	1	1	
	<i>M. branderi</i>	2		1				2							
	<i>M. cookii</i>			1											
	<i>M. duvalli</i>												1	1	
	<i>M. elephantis</i>								1						
	<i>M. frederiksbergense</i> *			1											
	<i>M. gadium</i>									1				1	
	<i>M. gilvum</i>										1				
	<i>M. gordonae</i>	198	176	198	76	121	145	143	161	142	201	166	198	133	82
	Mengeling <i>M. gordonae</i> + <i>M. simiae</i>			1											
	<i>M. heckeshomense</i>					2			2						
	<i>M. heidelbergense</i>		2												
	<i>M. hiberniae</i>	1								1		1	4	1	
	<i>M. holsaticum</i>		1		1	1			1						
	<i>M. kumamotoense</i>		1		1										
	<i>M. mucogenicum</i>	3	2	3			3	2	2						
	<i>M. negraskense</i>							1							
	<i>M. neoaurum</i>						1		1						
	<i>M. nonchromogenicum</i>		1		1	6	3	3	3	1	1	4	4	2	
	<i>M. noviomagense</i>			1	1										
	<i>M. novocastrense</i>											2	2		
	<i>M. palustre</i>			1											
	<i>M. parascrofulaceum</i>	1	1												
	<i>M. phlei</i>	1		1	1		1	1	1			2			
	<i>M. ratisbonense</i>									1	3	3	1		
	<i>M. senegalense</i>												1	1	
	<i>M. sherrisii</i>			1	3										
	<i>M. shimoidei</i>			1	1								1		
	<i>M. smegmatis</i>	1						2		1		2			
	<i>M. sphagni</i>						5				1		1		
	<i>M. terrae</i>	4	3	2				2	2	4	1	5	2	4	
	Cpx <i>Terrae-mucogenicum-ratisbonense</i>				3	7	3								
	<i>M. triplex</i>		5	1				1			1				
	<i>M. triviale</i>													1	
Andere bacteriën		15	4	2		11	15			2			5	3	7
Corynebacterium (andere familie)		13		7	4										
Totaal		1217	1199	1116	1047	1025	1025	1068	967	886	973	953	1122	922	627

myco_b_t3