



UZ
LEUVEN



Mycobacterium spp.

Epidemiologie en Diagnostiek

UZ
Leuven

Herestraat 49
B - 3000 Leuven

www.uzleuven.be
tel. +32 16 33 22 11

UNIVERSITY HOSPITALS LEUVEN

PERSBERICHT

Wereldtuberculosedag (TBC) - 24 maart 2014

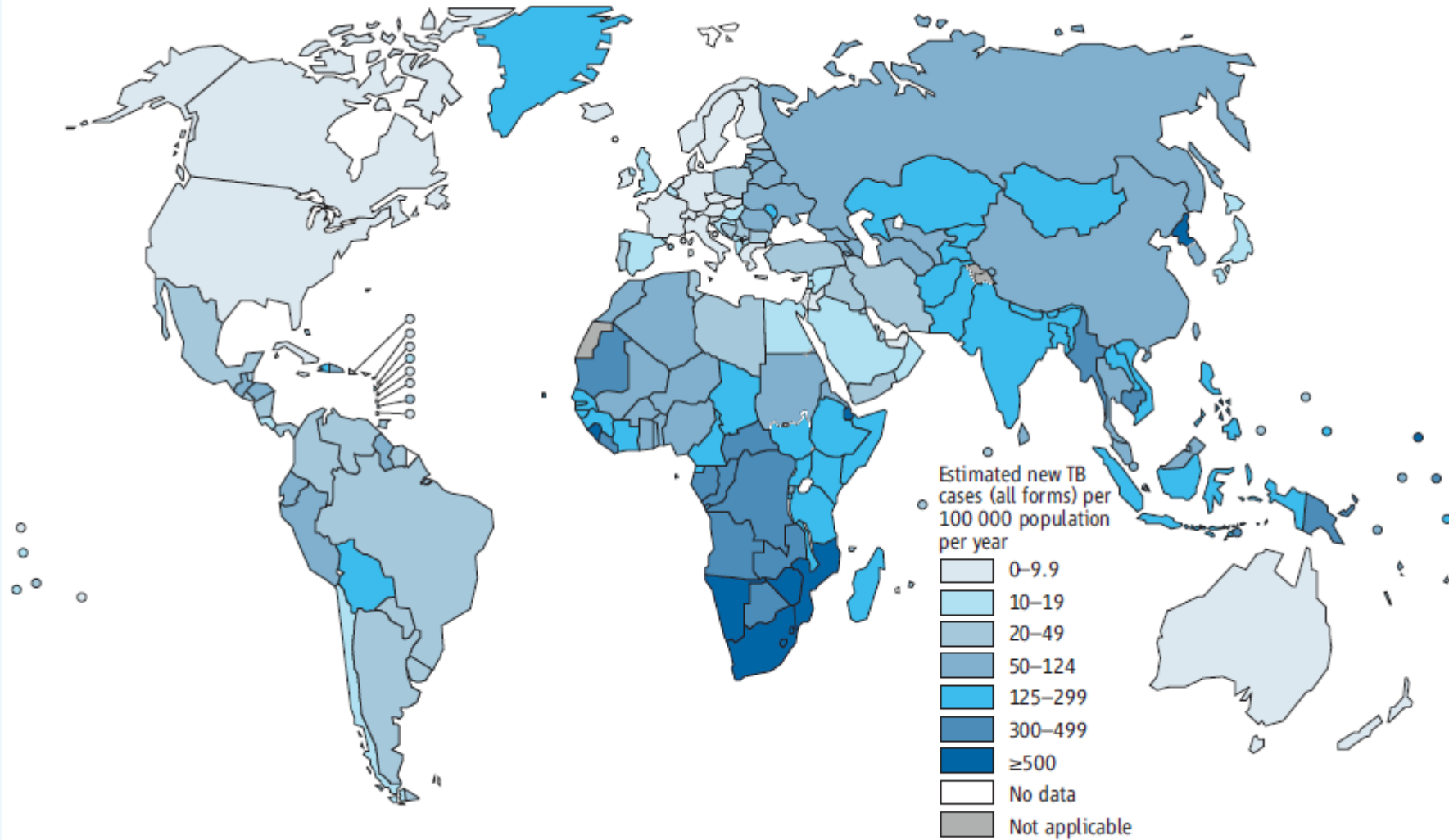
In 2012 werden in Vlaanderen 415 meldingen van tuberculose ontvangen. De dalende trend die we al een aantal jaren zien zet zich dus verder.

“Gezien de sterke link tussen tuberculose en armoede hadden we eigenlijk wel een stijging verwacht. Deze zien we voorlopig niet. Mogelijks omdat ons land zich niet heeft laten verleiden tot het zwaar besparen in sociale zekerheid en gezondheidsbudgetten. Landen die dat wel deden komen veel slechter uit de economische crisis”, zegt dr. Wouter Arrazola de Oñate van de Vlaamse Vereniging voor Respiratoire Gezondheidszorg en Tuberculosebestrijding (VRGT).

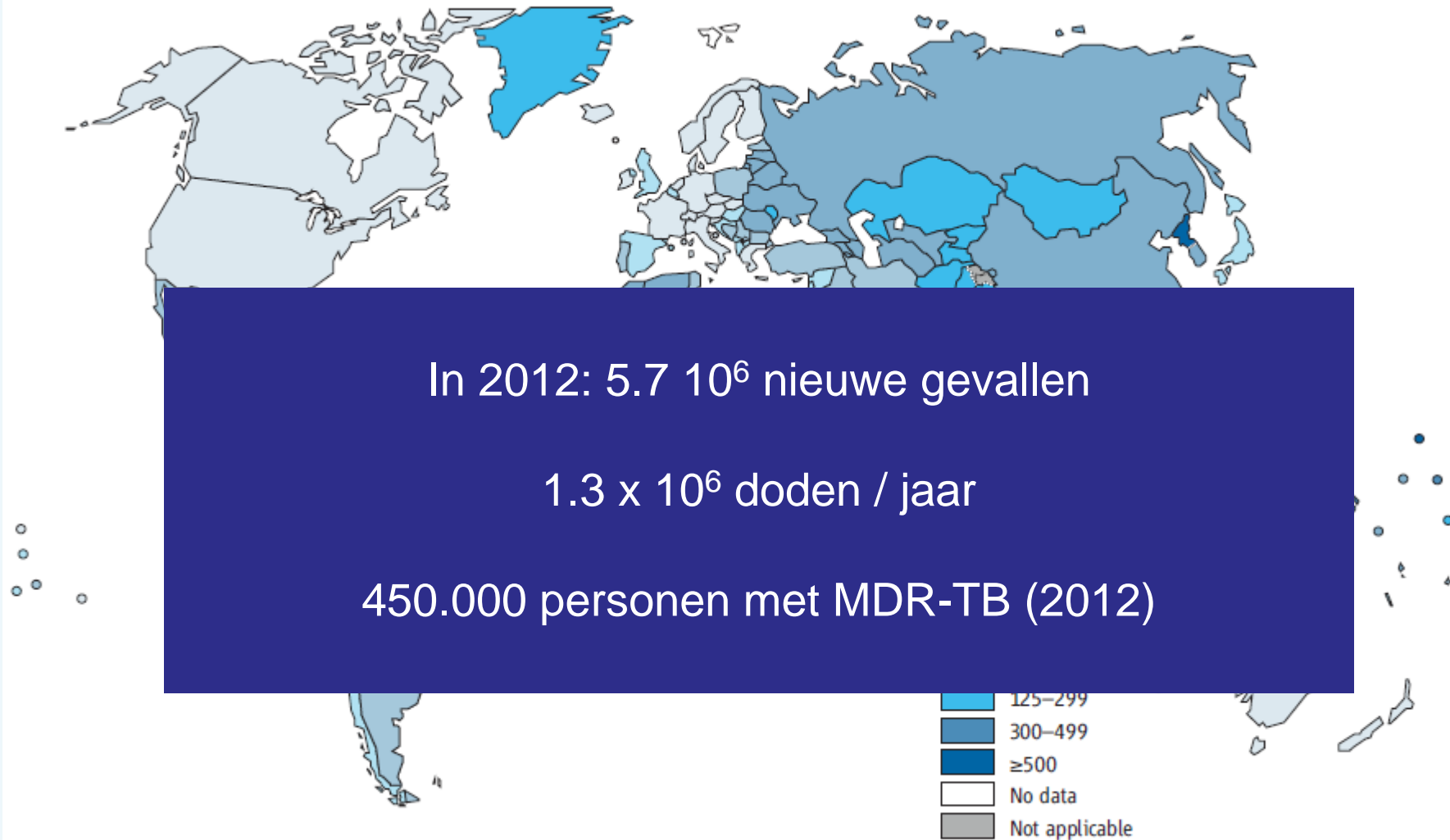
Ondanks de dalende trend in ons land, blijft de incidentie in onze grootsteden drie tot vier keer hoger dan het gemiddelde. Controlemaatregelen moeten rekening houden met de diversiteit van de stedelijke bevolking. Dit laatste zal extra inspanningen vragen op lokaal en regionaal niveau. “De Vlaamse overheid (Agentschap Zorg & Gezondheid) deed hiervoor reeds een extra budgettaire inspanning voor de jaren 2012-2016. Brussel blijft echter een regio waar extra financiële middelen nodig zijn voor een kwalitatieve tuberculose bestrijding willen we ook daar een daling van de incidentie kunnen bekomen”.

Multi Drug Resistente (MDR) tuberculose is een andere bedreiging voor de eliminatie van tuberculose in de wereld. Er is nood aan efficiënter medicijnen met een korter behandelingschema en aan vaccins. Hiervoor zijn belangrijke investeringen in onderzoek nodig.

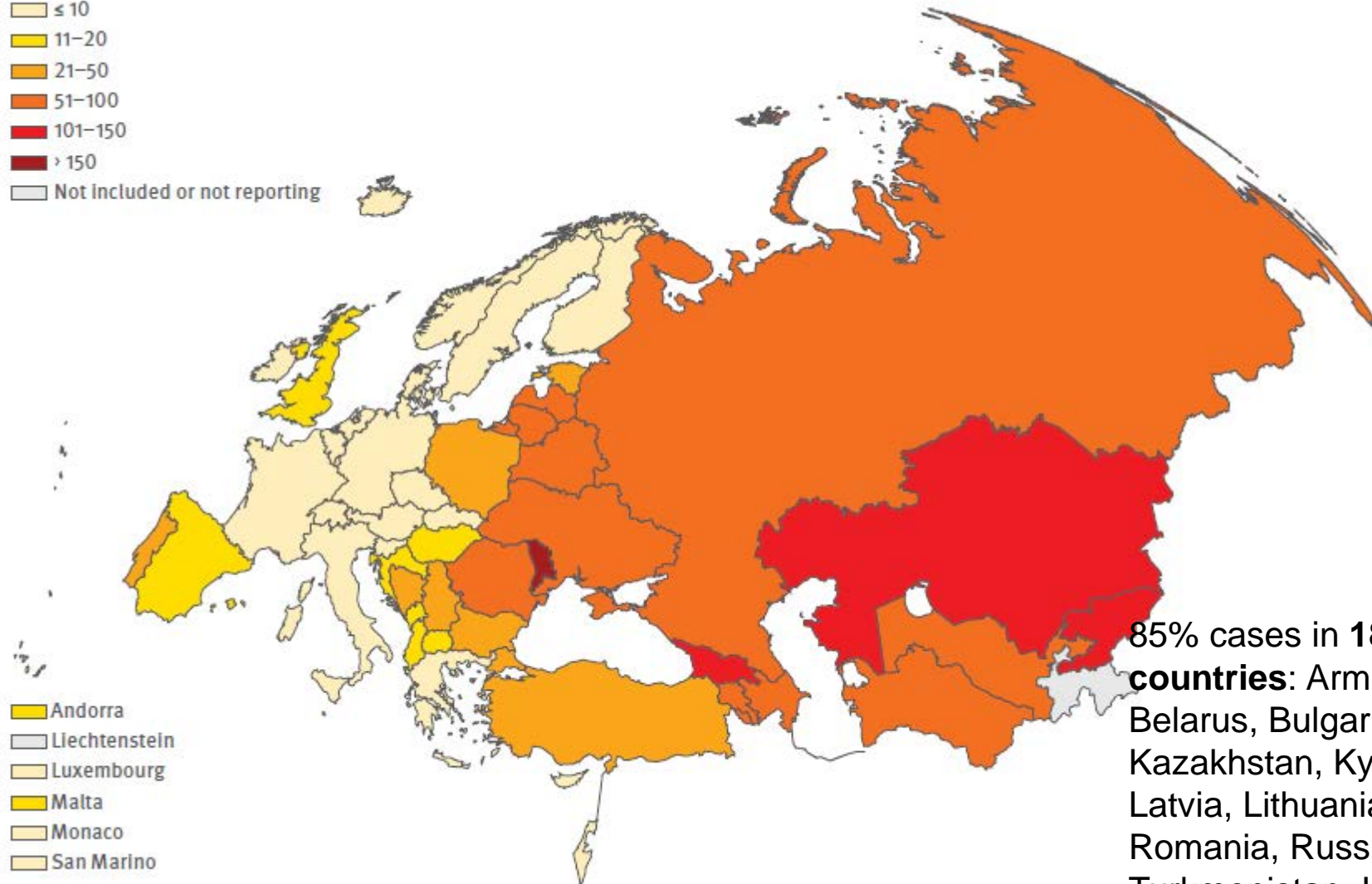
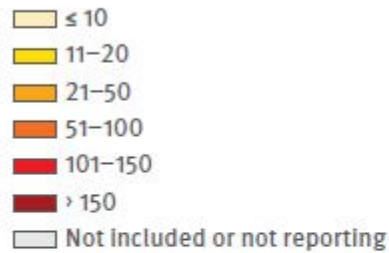
Estimated TB incidence rates, 2012



Estimated TB incidence rates, 2012

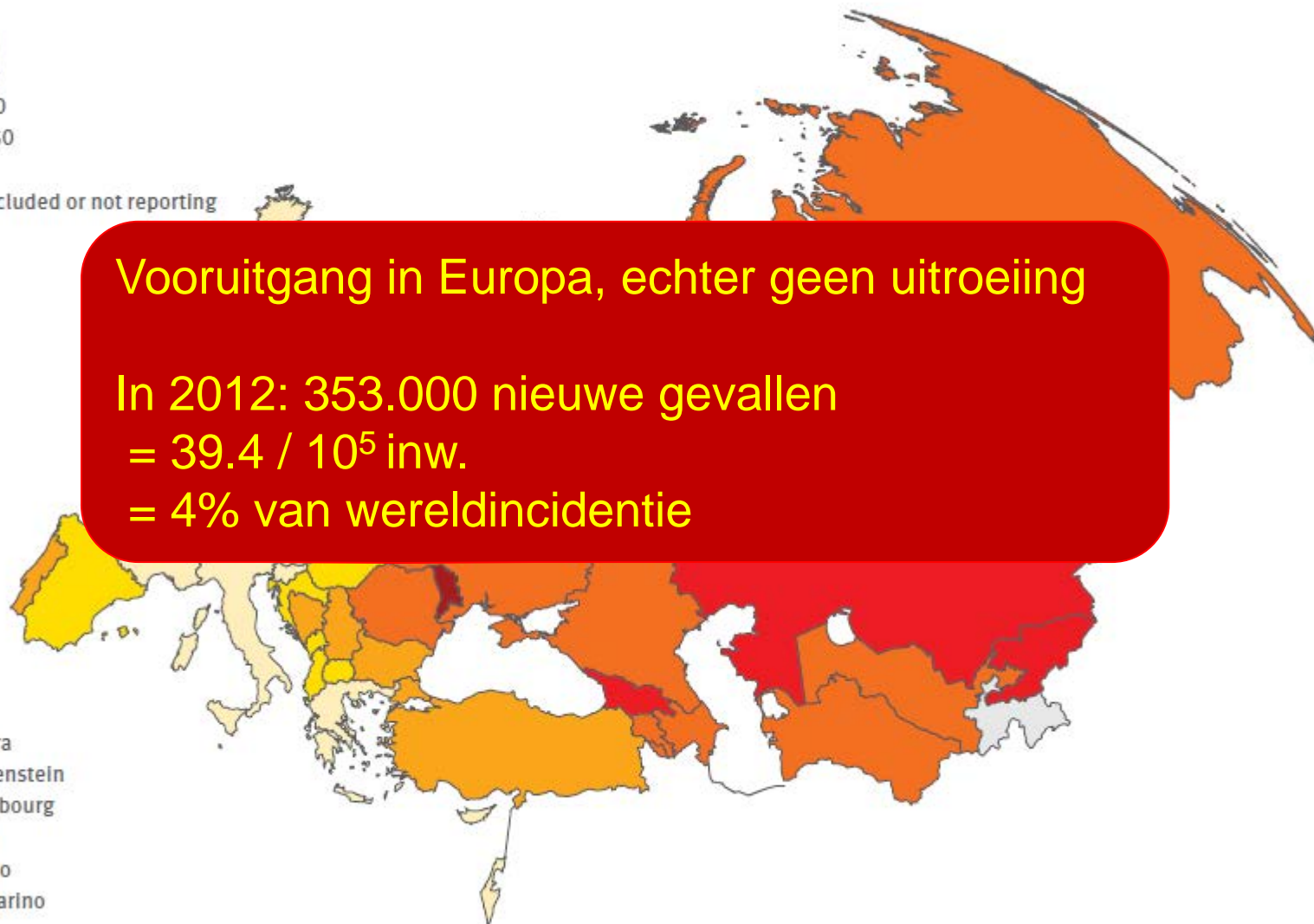
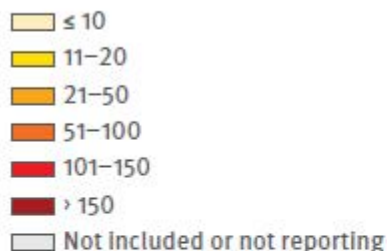


Map 1b: Estimated TB incidence per 100 000 population, European Region, 2012



85% cases in **18 high-priority countries**: Armenia, Azerbaijan, Belarus, Bulgaria, Estonia, Georgia, Kazakhstan, Kyrgyzstan, Latvia, Lithuania, Moldova, Romania, Russia, Tajikistan, Turkey, Turkmenistan, Ukraine and Uzbekistan.

Map 1b: Estimated TB incidence per 100 000 population, European Region, 2012



Vooruitgang in Europa, echter geen uitroeiing

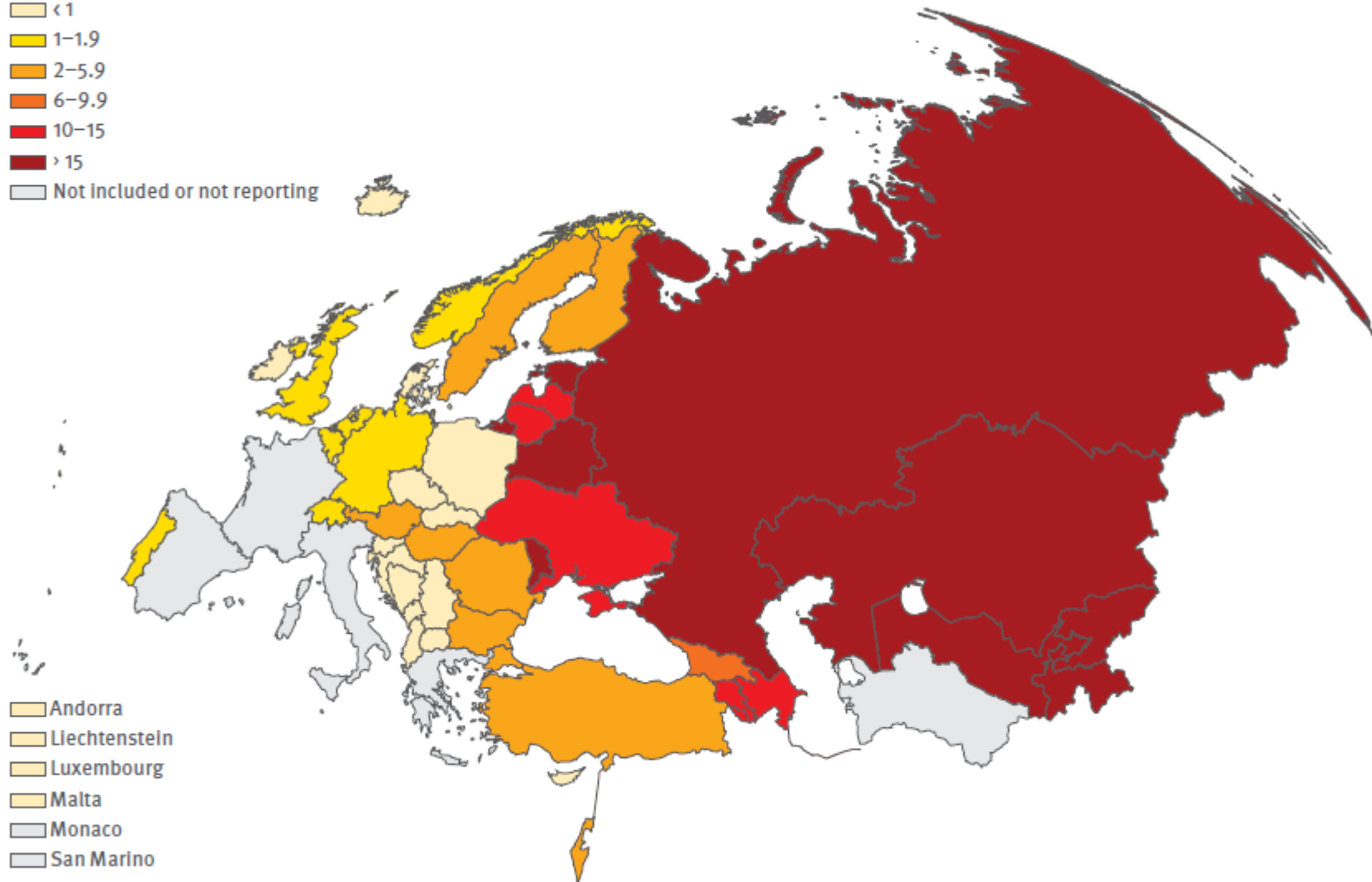
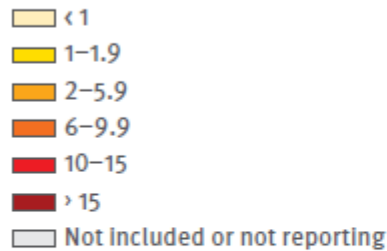
In 2012: 353.000 nieuwe gevallen

= 39.4 / 10⁵ inw.

= 4% van wereldincidentie

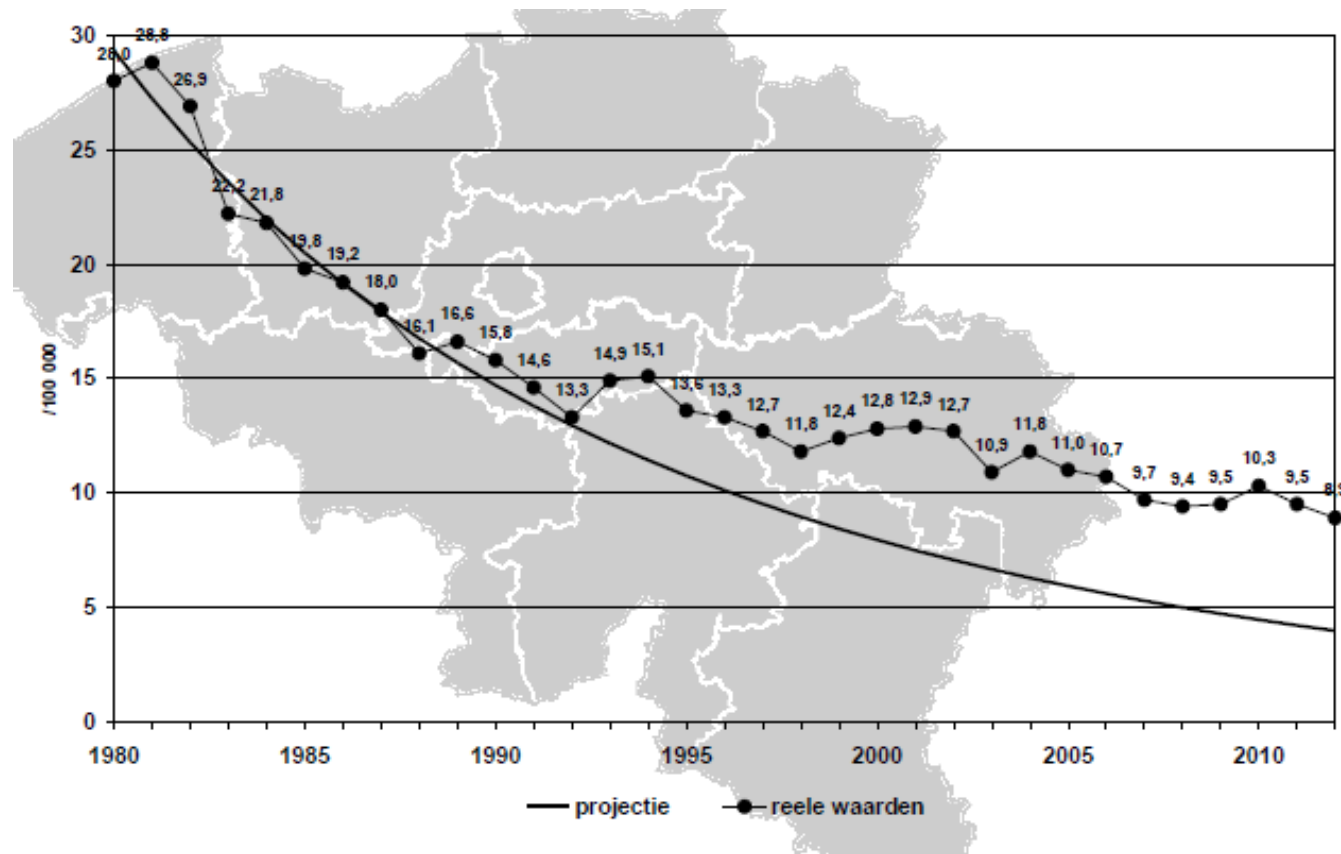


Map 8: Percentage of notified TB cases with multidrug resistance among new laboratory-confirmed pulmonary TB cases, European Region, 2012



- Andorra
- Liechtenstein
- Luxembourg
- Malta
- Monaco
- San Marino

Multidrug resistentie



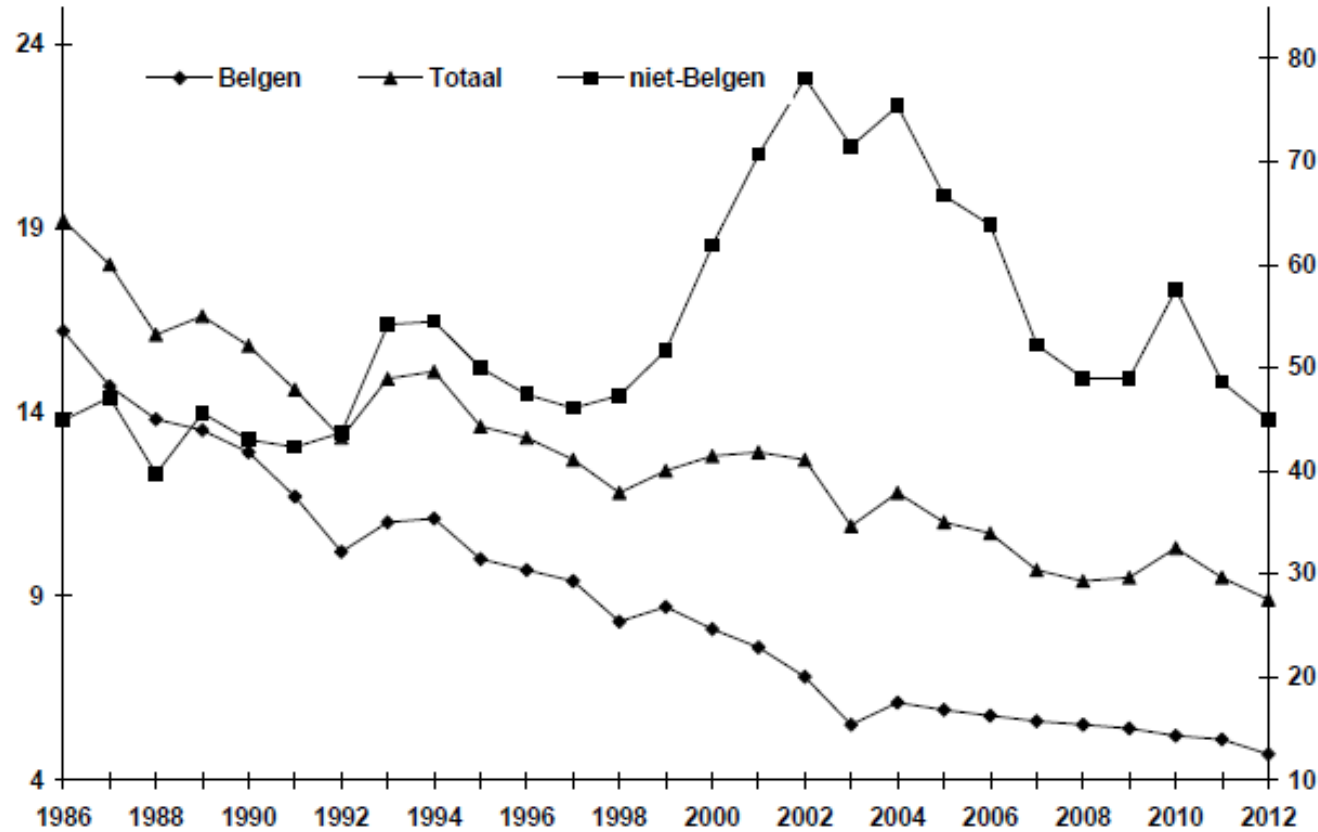
VRGT, tuberculoseregister België, 2012

Vrij stabiele incidentie sinds 1996: $10/10^5$ inw

Multiresistente TB: gem 16 nieuwe gevallen/jaar in België sinds 2000

/100.000 Belgen en totaal

/100.000 niet Belgen

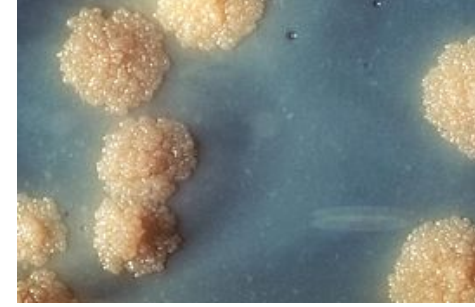


Figuur 8. Evolutie van de tuberculose-incidentie bij Belgen en niet-Belgen, 1986-2012

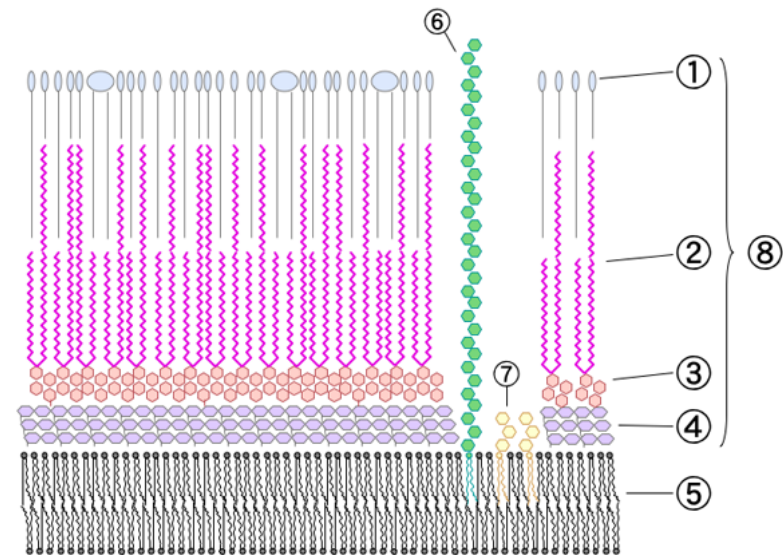
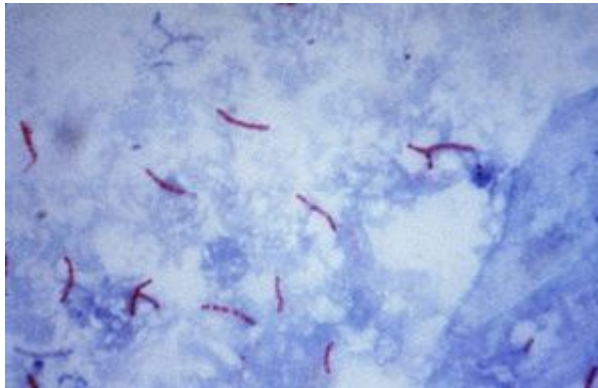
Tabel 8. Incidentie van tuberculose in Belgische steden met meer dan 100.000 inwoners (2001 – 2012)

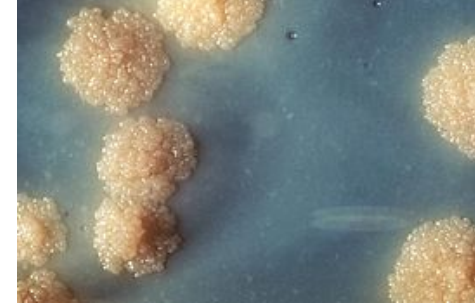
	/100.000											
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Brussel	36,5	42,6	36,1	34,2	34,1	36,7	28,5	28,9	29,9	34,6	31,4 (28,2;34,8)	27,4 (24,4;30,6)
Luik	24,9	18,4	18,4	16,2	21,6	19,8	23,3	27,4	29,9	35,8	19,5 (13,8;26,8)	22,5 (16,3;30,2)
Antwerpen	30,1	30,1	24,1	31,2	23,4	23,2	23,6	24,8	23,9	23,2	19,2 (15,6;23,5)	20,7 (16,9;25,1)
Charleroi	17,0	17,9	20,0	19,9	17,4	21,4	16,9	15,9	13,4	17,8	19,2 (13,6;26,2)	13,2 (8,7;19,3)
Gent	14,7	10,2	7,5	11,8	13,4	9,9	13,6	13,5	14,2	15,2	9,3 (5,9;13,9)	13,7 (9,5;19,1)
Brugge	13,7	9,4	10,3	6,0	13,6	11,9	3,4	13,7	5,1	12,0	15,4 (9,1;24,3)	11,1 (5,9;19,0)
Namen	3,8	9,5	6,6	4,7	9,4	6,5	5,6	7,4	8,3	6,4	8,2 (3,7;15,6)	6,4 (2,6;13,1)
>100.000 inw	26,1	29,5	25,3	25,9	25,2	26,0	22,3	23,6	23,6	26,8	23,1 (21,2;25,0)	21,5 (21,2;25,0)
<100.000 inw	9,2	8,0	6,8	7,8	6,9	6,4	6,1	5,4	5,4	5,5	5,6 (5,1;6,1)	5,2 (4,8;5,7)
België	12,9	12,7	10,9	11,8	11,1	10,7	9,7	9,4	9,6	10,7	9,5	8,9

Incidentie in grootsteden > 21.5/10⁵ inw



- Familie: *Mycobacteriaceae*
- Genus: *Mycobacterium*
 - Aërobe niet-sporulerende niet beweeglijke bacillen
 - Recht of licht gebogen
 - Trage groei: generatietijd 20u
 - Celwand met mycolzuren en lipiden → hydrofobe barrière
 - zuurvastheid bij kleuring





- ***Mycobacterium tuberculosis complex*** (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. pinnipedii*)
 - Obligat pathogenen
 - Reservoir: mens en warmbloedigen
- **Non-tuberculeuze mycobacteria (NTM)**
 - reservoir: (kraantjes)water, aarde
 - Opportunistische pathogenen of saprofieten
 - Pulmonair
 - Onderliggende longaandoeningen: COPD, bronchiëctasieën, CF, anatomisch
 - Lymfadenitis
 - Huid en weke deleninfectie
 - Penetrerend trauma, wonde
 - Gedissemineerde ziekte
 - HIV: T-cel depletie
 - Immuundeficiëntie IFN- γ /IL-12 pathway (TNF- α ↓)
- **Niet kweekbare mycobacteriën**
 - *M. leprae*
 - *M. lepraemurium*

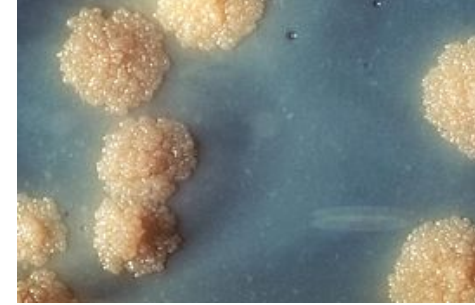
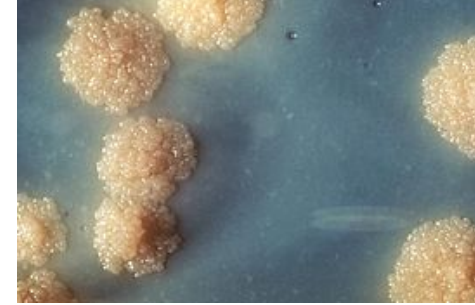


TABLE 2. CLINICAL DISEASE CAUSED BY NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA (ALPHABETICAL ORDER BY SPECIES)

Common	Page	Comment	Uncommon	Page	Comment
Pulmonary Disease					
<i>M. abscessus</i>	396	Worldwide; may be found concomitant with MAC	<i>M. asiaticum*</i>		Rarely isolated
<i>M. avium</i> complex	386	Worldwide; most common NTM pathogen in U.S.	<i>M. celatum*</i>		Cross-reactivity with TB-DNA probe
<i>M. kansasii</i>	395	U.S., Europe, South Africa, coal-mining regions	<i>M. chelonae</i>	398	
<i>M. malmoense</i>	399	U.K., northern Europe; uncommon in U.S.	<i>M. fortuitum</i>	398	Associated with aspiration
			<i>M. haemophilum</i>	399	Rarely isolated
<i>M. xenopi</i>	402	Europe, Canada; uncommon in U.S.; associated with pseudoinfection	<i>M. scrofulaceum</i>	400	South Africa; uncommon in U.S.
			<i>M. shimoidae*</i>		Rarely isolated
			<i>M. simiae</i>	401	Southwest U.S., associated with pseudo-outbreaks
			<i>M. smegmatis</i>	401	Rarely isolated
			<i>M. szulgai</i>	401	Rarely isolated; not an environmental contaminant
Lymphadenitis					
<i>M. avium</i> complex	386	Worldwide; most common NTM pathogen in U.S.	<i>M. abscessus</i>		Rarely isolated
<i>M. malmoense</i>	399	U.K., northern Europe (especially Scandinavia)	<i>M. chelonae</i>	398	
<i>M. scrofulaceum</i>	400	Worldwide; previously common, now rarely isolated in U.S.	<i>M. fortuitum</i>	398	
			<i>M. genovense</i>	399	Fastidious species (See LABORATORY PROCEDURES)
			<i>M. haemophilum</i>	399	Fastidious species (See LABORATORY PROCEDURES)
			<i>M. kansasii</i>		Rarely isolated
			<i>M. szulgai</i>	401	Rarely isolated
Disseminated Disease					
<i>M. avium</i> complex	386	Worldwide; AIDS; most common NTM pathogen in U.S.	<i>M. abscessus</i>	396	Non-AIDS immunosuppressed
<i>M. chelonae</i>	398	U.S.; non-AIDS immunosuppressed skin lesions	<i>M. celatum*</i>		AIDS, non-AIDS immunosuppressed
			<i>M. conspicuum*</i>		AIDS, non-AIDS immunosuppressed
			<i>M. fortuitum</i>	398	Non-AIDS immunosuppressed
<i>M. haemophilum</i>	399	AIDS; U.S., Australia; non-AIDS immunosuppressed	<i>M. genovense</i>	399	AIDS
<i>M. kansasii</i>	395	AIDS; U.S., South Africa	<i>M. immunogenum</i>	399	Rare, associated with pseudo-outbreaks
			<i>M. malmoense</i>	399	U.K., northern Europe; non-AIDS immunosuppressed
			<i>M. marinum</i>	400	Worldwide; AIDS
			<i>M. mucogenicum</i>	400	Central venous catheter infections
			<i>M. scrofulaceum</i>	400	Rarely isolated
			<i>M. simiae</i>	401	Southwest U.S., associated with pseudoinfection
			<i>M. szulgai</i>	401	Rarely isolated
			<i>M. xenopi</i>	402	Europe, Canada, associated with pseudoinfection
Skin, Soft Tissue, and Bone Disease					
<i>M. abscessus</i>	396	Penetrating injury	<i>M. avium</i> complex	386	Worldwide
<i>M. chelonae</i>	398	U.S., associated with keratitis and disseminated disease	<i>M. haemophilum</i>	399	Extremities, cooler body sites
			<i>M. immunogenum</i>	399	Rarely isolated; associated with pseudo-outbreaks
<i>M. fortuitum</i>	398	Penetrating injury, footbaths	<i>M. kansasii</i>		Rarely isolated
<i>M. marinum</i>	400	Worldwide, fresh- and saltwater	<i>M. malmoense</i>	399	U.K., northern Europe
<i>M. ulcerans</i>	402	Australia, tropics, Africa, Southeast Asia, not U.S.	<i>M. nonchromogenicum</i>	400	Tenosynovitis
			<i>M. smegmatis</i>	401	Rarely isolated
			<i>M. szulgai</i>	401	Rarely isolated
			<i>M. terrae</i> complex	402	Tenosynovitis
Specimen Contaminant					
<i>M. goodii</i>	399	Most common NTM contaminant			
<i>M. haemophilum</i>	399				
<i>M. mucogenicum</i>	400				
<i>M. nonchromogenicum</i>	400				
<i>M. terrae</i> complex	402				

Definition of abbreviations: MAC = *Mycobacterium avium* complex; NTM = nontuberculous mycobacteria.

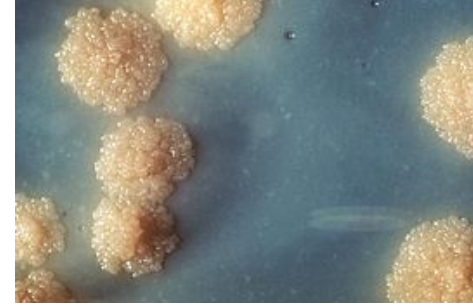
* See the online supplement.



Clinical and microbiologic criteria for diagnosing nontuberculous mycobacterial (NTM) lung disease

Clinical (both required)
1. Pulmonary symptoms, nodular or cavitary opacities on chest radiograph, or a high-resolution computed tomography scan that shows multifocal bronchiectasis with multiple small nodules
and
2. Appropriate exclusion of other diagnoses
Microbiologic
1. Positive culture results from at least two separate expectorated sputum samples. If the results from the initial sputum samples are nondiagnostic, consider repeat sputum AFB smears and cultures.
or
2. Positive culture result from at least one bronchial wash or lavage
or
3. Transbronchial or other lung biopsy with mycobacterial histopathologic features (granulomatous inflammation or AFB) and positive culture for NTM or biopsy showing mycobacterial histopathologic features (granulomatous inflammation or AFB) and one or more sputum or bronchial washings that are culture positive for NTM
Additional considerations
<ul style="list-style-type: none"> • Expert consultation should be obtained when NTM are recovered that are either infrequently encountered or that usually represent environmental contamination • Patients who are suspected of having NTM lung disease but do not meet the diagnostic criteria should be followed until the diagnosis is firmly established or excluded • Making the diagnosis of NTM lung disease does not, per se, necessitate the institution of therapy, which is a decision based on potential risks and benefits of therapy for individual patients

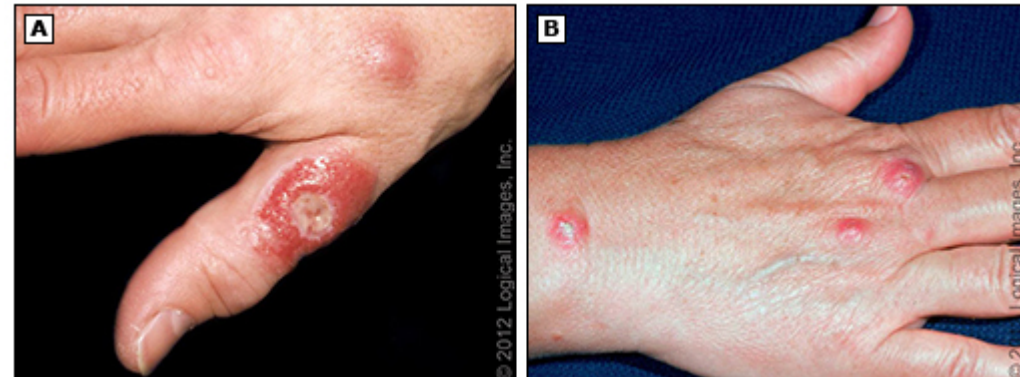
Reproduced with permission from: Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, treatment and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:367. Copyright © 2007 American Thoracic Society.



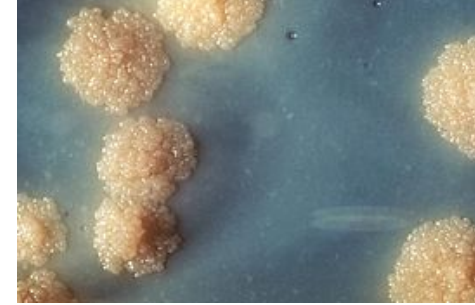
Immuungecompromitteerd kind met gedissemineerde
NTM infectie



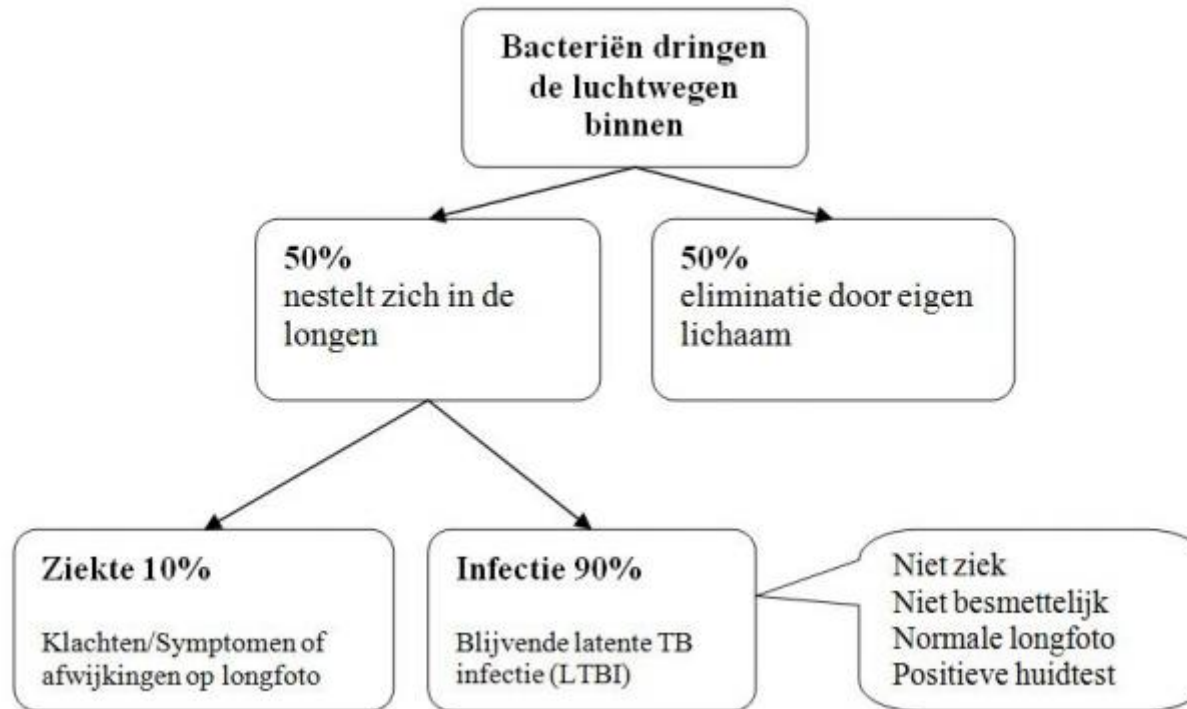
M. avium adenitis
parotis en
submandibulair



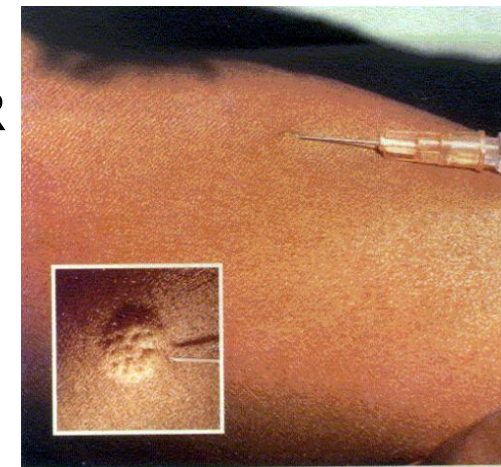
Fish tank granuloma (*M. marinum*)

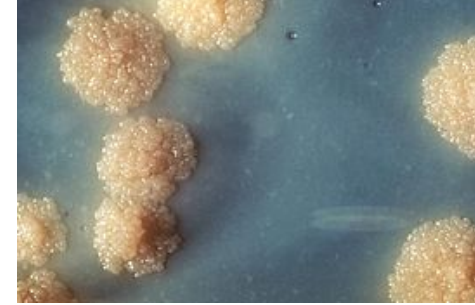


- *Mycobacterium tuberculosis* complex



- Actieve TB: diagnose obv kliniek, Rx, culturen / PCR
- Latente TB
 - Mantoux test – intradermo - TST
 - IGRA (interferon gamma release assays)





- *Mycobacterium tuberculosis* complex

Tabel 1 : Risico bij besmette mensen om een actieve tuberculose te ontwikkelen (RR of OR).

Risicofactoren	OR of RR
Immunosuppressie	
<i>Seropositief voor HIV</i>	50-110
<i>Zieke met AIDS</i>	110-170
<i>Transplantatie met immunosuppressieve therapie</i>	20-74
<i>Behandeling met anti-TNF-alfa</i>	1,5-17
<i>Behandeling met corticosteroiden gelijkwaardig aan 15 mg prednisolone per dag gedurende 2-4 weken</i>	4,9
Kanker	4-8
<i>Hematologische kanker (leukemie, lymfoom)</i>	16
<i>Hoofd- of hals- en longcarcinoom</i>	2,5-6,3
Gastrectomie	2,5
Jejuno-ileale bypass	27-63
Silicose	30
Chronische nierinsufficiëntie/hemodialyse	10-25
Diabetes van type 1	2-3,6
Roker	2-3
Alcoholisme	3
Ondergewicht	2- 2,6
Leeftijd < 5 jaar	2-5

QuantiFERON®-TB Gold



T-SPOT®.TB

- Latente TB: Mantoux → **IGRA test**
 - Antigenen: ESAT-6, CFP-10, (TB7.7)
 - Meet productie van IFN- γ door de effector geheugen T-lymfocyten na contact met TB antigenen
 - Quantiferon TB Gold In-Tube (Qiagen)
 - ELISPOT: T-spot.TB (Oxford TB)
 - ! Kruisreacties met *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. szulgai*
 - Indicaties Mantoux of IGRA: Cfr richtlijnen BVP

QuantIFERON®-TB Gold



T-SPOT®.TB

- Latente TB
- Indicaties Mantoux of IGRA: richtlijnen BVP
 - Kinderen: TST
 - Immuungecompromitteerden

Two-step approach:

1/ TST

- ↳ *positive* → IGRA only if BCG vaccinated, otherwise LTBI
- ↳ *negative* → IGRA

2/ IGRA

- ↳ *positive* → LTBI
- ↳ *negative* → most probably no LTBI (low-incidence setting)

- HIV

1/ CD4 cells $\leq 500/\text{ml}$ → **IGRA**

- IGRA positive: LTBI
- IGRA negative: *probably* no LTBI

2/ CD4 cells $> 500/\text{ml}$ → **TST** (cut-off 5 mm)

- TST positive: LTBI (IGRA if BCG vaccinated)
- TST negative → IGRA

- Latente TB
- Indicaties Mantoux of IGRA: richtlijnen BVP
 - Anti-TNF R/

QuantiFERON®-TB Gold



T-SPOT®.TB

1/ TST negative (< 5 mm): no LTBI

2/ TST positive (≥ 10 mm): LTBI (if BCG: IGRA)

3/ TST intermediate (5-9 mm) or negative with immunocompromising condition present and/or high-risk contact → IGRA

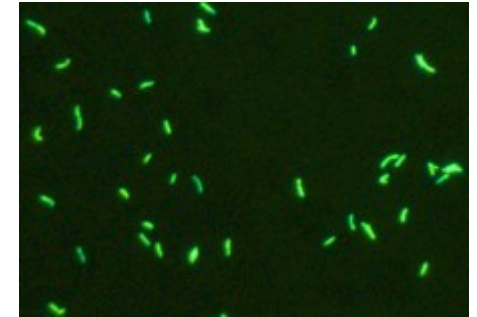
4/ IGRA

↳ *positive* → LTBI

↳ *negative* → most probably no LTBI (low-incidence setting)

Microscopie

- Sediment of rechtstreeks uitstrijkje
 - Koude Kinyoun (Ziehl) kleuring
 - Auraminekleuring (fluorescentietechniek)
 - Semikwantitatieve beoordeling van het aantal ZV bacillen
 - 3 x 10 microscopische velden



Rapportering	Fluorescentie (250x)	Ziehl-Neelsen (1000x)
Negatief	geen	Geen
Twijfelachtig	1-2/30 velden	1-2/300 velden
+	1-9/10 velden	1-9/100 velden
++	1-9/veld	1-9/10 velden
+++	10-100/veld	1-9/veld
++++	>100/veld	>9/veld

Staalverwerking

Decontaminatie en vrijzetting mycobacteria

- Voorbereiding stalen: decontaminatie – homogenisatie - vrijzetting
 - Bijbesmet → decontaminatie
 - Lichaamsvochten: indien > 10mL staal beschikbaar: centrifugatie (3000g, 15 min), sediment kweken
 - Steriele lichaamsvochten → geen decontaminatie

Decontaminatie	Geen decontaminatie
Respiratoire stalen (sputum, bronchusaspiraata)	Steriele lichaamsvochten:
Huid	CSV
Weke weefsels	Beenmerg
Maagvocht	bloed
Faeces	
Urine (gecentrifugeerde)	
Biopsies	

Staalverwerking

Decontaminatie en vrijzetting mycobacteria

- Voorbereiding stalen
 - Decontaminatie oplossing
 - Natrium hydroxide – Natrium citraat + N-acetyl-L-cysteïne
 - » Decontaminatie + mucolyticum
 - Evenredige hoeveelheid staal – decontaminatie oplossing
 - Incuberen op kamertemperatuur
 - Neutraliseren met steriele fosfaatbuffer pH 6.8
 - Centrifugeren en sediment toevoegen aan MGIT
 - » Deel sediment voor uitstrijkje
 - Antibiotica oplossing (PANTA)

Cultuur in vloeibaar medium



- BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube
 - Modified Middlebrook 7H9 broth met groeisupplement: **oleïnezuur** (metabolisme), **albumine** (bindt toxische VVZ), **dextrose** (energiebron), **catalase** (peroxide inactivatie)
 - PANTA antibiotica mengsel
 - Fluorescerende component in de bodem gevoelig aan O₂
 - Actief groeiende mycobacteria: O₂ consumptie en fluorescentie ↑
 - Tot 42 dagen incubatie op 37°C
 - Elke 60 min monitoring op fluorescentie
 - Zo positief: 10⁵-10⁶ CFU/mL



BACTEC MGIT

Cultuur in vast medium

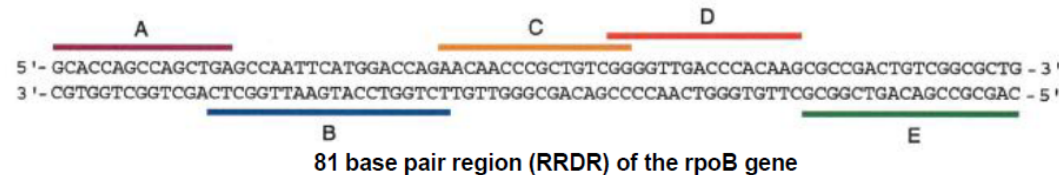
- Löwenstein-Jensen

- Gebaseerd op eieren, glycerine, aardappelbloem, asparagine, zouten, malachietgroen
- Supplement: Na pyruvaat/hemine voor moeilijk groeiende mycobacteria (*M. hemophilum* bv)
- 37°C ged 4-6 weken
- Wekelijkse groeicontrôle
- Optimale groeitemperaturen → indicatief voor species
 - *M. marinum*, *M. chelonae*, *M. ulcerans*: 30°C
 - *M. xenopi*: 42°C
- Uitzicht (aspect en kleur) en groeisnelheid (Runyon)
 - Traaggroeiende niet-chromogenen: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium/intracellulare*
 - Fotochromogenen: *M. kansasii*, *M. marinum*
 - Skotochromogenen: *M. gordonae*, *M. xenopi*
 - Snelgroeiende: *M. fortuitum*



Moleculaire diagnose

- Rechtstreeks op staal of op gegroeide cultuur
 - In-huis PCR: *Mycobacterium tuberculosis* – *Mycobacterium* spp.
 - Gentarget: 16S – 23S rRNA spacer regio (200-330bp)
 - GeneXpert MTB/Rif (Cepheid): *M. tuberculosis* – rifampicine resistentie
 - Semiquantitative hemi-nested RT-PCR



- 5 Probes bind to wild type
- Probes do not bind to mutant sequence
- 1 Probe for SPC (*B. globigii*)
- 6 fluorescent dyes detected simultaneously

- Op gegroeide cultuur:
 - PCR + sequencing: 16S rRNA gen (1500 bp)
 - INNO-LIPA mycobacteria (Fujirebio): 16S – 23S rRNA spacer regio
 - Andere target genen: 23S rRNA, hsp65 gen (440bp), rpoB gen

Massaspectrometrie

- Unieke spectrale profielen van geëxtraheerde mycobacteriële proteïnen
- Procedure
 - MGIT medium (bodem)
 - Centrifugeren 2 min 1300 rpm
 - Sediment oplossen in AD
 - Hitte inactivatie 30 min 95°C
 - Centrifugeren 2 min 1300 rpm
 - Sediment oplossen in AD
 - Ethanol
 - Verhitting 10 min 95°C
 - Drogen op kamertemperatuur
- Beperkingen
 - Lange voorbereidingsprocedure
 - Extra database
 - Beperkte ervaring

TABLE 2. Clinical isolates identified by MALDI-TOF MS

Species (no. of isolates tested)	No. of isolates with the following highest score:			
	<1.8	1.8–<1.9	1.9–<2.0	≥2.0
<i>M. abscessus</i> (6) ^a			1	5
<i>M. asiaticum</i> (2)				2
<i>M. avium</i> (7)			1	6
<i>M. chelonae</i> (5)				5
<i>M. chimaera</i> (2) ^b				2
<i>M. fortuitum</i> (6)				6
<i>M. gordonae</i> (5)				5
<i>M. intracellulare</i> (6) ^b				6
<i>M. kansasii</i> (15)	1	3	4	7
<i>M. marinum</i> (5)				5
<i>M. massiliense</i> (6) ^a			1	5
<i>M. mucogenicum</i> (5) ^c		1	1	3
<i>M. peregrinum</i> (4)				4
<i>M. smegmatis</i> (1)			1	
<i>M. szulgai</i> (2)				2
<i>M. tuberculosis</i> complex (26)				26
<i>M. xenopi</i> (1)				1
Total (104)	1	4	9	90

^a *M. abscessus* and *M. massiliense* were not differentiated from each other by MALDI-TOF MS.

^b *M. chimaera* and *M. intracellulare* were not differentiated from each other by MALDI-TOF MS.

^c *M. mucogenicum* was identified as *M. mucogenicum* and *M. phocaicum* by MALDI-TOF MS.



Performantie diagnostische testen

	Detectielimiet	TAT
microscopie	$> 10^4$ bact/mL	24 u
NAAT	$> 10^3$ bact/mL	24 u
cultuur	$\sim 10^2$ bact/mL	14 dagen
gevoeligheidsbepaling		30 dagen
genotypering		Enkele dagen

- Combinatietherapie
 - Snelle ontwikkeling van resistentie van MTB
 - Natuurlijk resistente mutanten in populatie mycobacteriën: $1/10^5$ - 10^8
 - Resistentie zo 1% vd populatie ($1/10^2$)
 - R aan eerstelijns AB: moeilijker en duurdere R/
 - MDR-TB: R aan isoniazide en rifampicine
 - XDR-TB: + R aan FQ en 1 injecteerbaar 2° lijnsAB (amikacapreo/streptomycine)
 - Snelle detectie van R: kritisch voor goede R/

	<i>M. tuberculosis</i> complex	Slowgrowing atypical mycobacteria (MAC, <i>M. xenopi</i> , <i>M. kansasii</i>)	Fastgrowing atypical mycobacteria (<i>M. marinum</i> , <i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>)
Eerstelijns AB	Ethambutol	Rifampicine/rifabutin	Rifampicine/rifabutin
	Isoniazide	Clarithromycine	Clarithromycine
	Rifampicine	amikacine	Amikacine/tobramycine
	Pyrazinamide	Ofloxacine	Doxycycline/minocycline
		Moxifloxacine	imipenem
			Cefoxitine
			ciprofloxacine
Tweedelijns AB	Streptomycine		
	Cycloserine		
	Kanamycine		
	Amikacine		
	Ofloxacine/levofloxacine		
	Moxifloxacine		
	PAS		

- Antibiogram
 - *M. tuberculosis* complex
 - Nontuberculeuze mycobacteria
- Moleculaire resistentie bepaling
 - NRC: in-huis PCR + sequencing
 - Commerciële testen
 - Line probe assays
 - GeneXpert RT-PCR

Antibiogram *M. tuberculosis*

- Proportionele methode van Canettii
 - Vergelijking # CFU in AB bevattende vs AB vrije media
 - Incubatie: gemiddeld **21 dagen**
 - Resistentie: $\geq 1\%$ bacteriële populatie R aan de AB concentratie
 - CLSI (M24-A2 vol 31): 2 concentraties isoniazide, ethambutol, rifampicine, pyrazinamide
 - Lage (kritische conc) en hoge conc
- BACTEC™ 460TB radiometrische gevoeligheidsbepaling
 - Productie van radioactieve ^{14}C -gelabelde CO_2 door groeiende mycobacteria, uitgedrukt in groei-index toename
 - **4 tot 12 dagen** incubatie

Antibiogram *M. tuberculosis*

- BACTEC MGIT 960 SIRE test (UZLeuven)
 - BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube
 - modified Middlebrook 7H9 broth
 - BACTECT MGIT 960 SIRE: kwalitatieve test
 - **4-13 dagen** incubatie, vertrekken vanuit positieve MGIT tube (dag 1-5)
 - AB bevattende vs AB vrije tube: Δ fluorescentie \rightarrow automatische interpretatie door toestel als R/S
 - CLSI (M24-A2 vol 31)

Antibioticum	Finale concentratie in MGIT tube
rifampicine	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
isoniazide	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ethambutol	5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Antibiogram *M. tuberculosis*

- BACTEC MGIT 960 PZA test (UZLeuven)
 - BBL MGIT Mycobacteria Growth Indicator Tube
 - BACTECT MGIT 960 PZA: kwalitatieve test
 - **4-21 dagen** incubatie, vertrekken vanuit positieve MGIT tube (dag 1-5)
 - AB bevattende vs AB vrije tube: Δ fluorescentie \rightarrow automatische interpretatie door toestel als R/S
 - CLSI (M24-A2 vol 31)
 - R voor PZA \rightarrow *M. bovis* ?

Antibioticum	Finale concentratie in MGIT tube
pyrazinamide	100 μ g/mL

Antibiogram nontuberculeuze mycobacteria

- Broth microdilutie methode
 - Aanbevolen methode volgens CLSI
 - referentiecentrum

species	AB to be tested
MAC	Azithromycine/clarithromycine ETH Rifampicine Amikacine/streptomycine Moxifloxacin Linezolid
<i>M. Kansasii</i> + Traaggroeiende NTM, goed groeidend (<i>M. gordonae</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. malmoense</i> , <i>M. simiae</i>)	RIF ETH Clarithromycine INH
<i>M. marinum</i>	RIF ETH Bactrim Clarithromycine (Doxycycline) (Minocycline) Evtl monotherapie zonder AST
Snelgroeende NTM (<i>M. fortuitum</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i>)	Clarithromycine + Amikacine/tobramycine Cefoxitine Imipenem Ciprofloxacin Doxycycline (minocycline) Bactrim

Moleculair *M. tuberculosis*

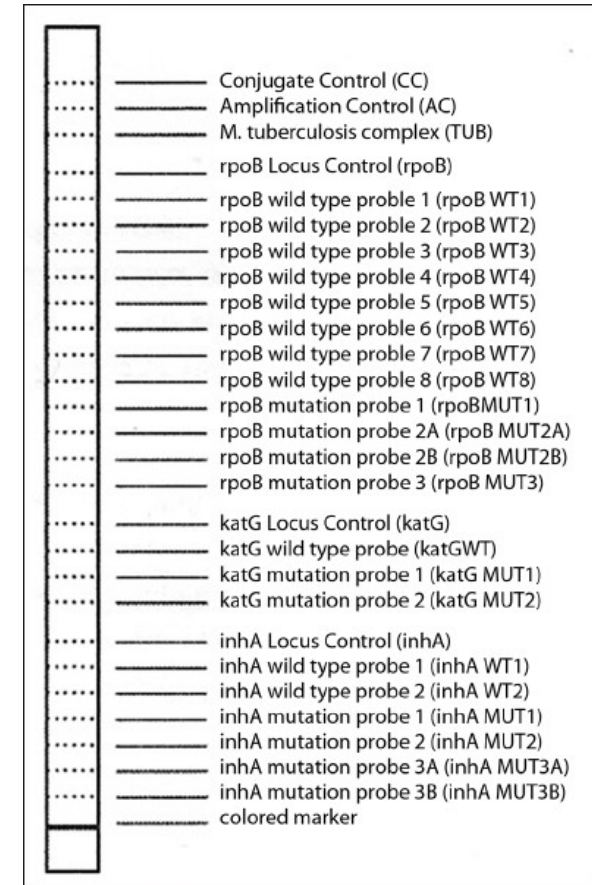
- Moleculaire resistentiebepaling
 - NRC: in-house PCR + sequencing
 - Commerciële kits
 - Line-Probe assays
 - INNOLIPA Rif.TB (Innogenetics): rifampicine
 - Genotype MTBDRplus (HAIN Life Science)
 - » INH + RIF
 - Genotype MTBDRsl: ETH + FQ + AG
 - Real-time PCR: GeneXpert: rifampicine

TABLE 2. Mycobacterial genes with mutations associated with antimicrobial resistance

Antimicrobial agent	Species	Gene ^a	Size (bp)	Product	Representative reference(s)
RIF	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. africanum</i> , <i>M. leprae</i> , <i>M. avium</i>	<i>rpoB</i>	3,534	β subunit of RNA polymerase	77, 103, 158, 170
INH	<i>M. tuberculosis</i>	<i>katG</i>	2,205	Catalase-peroxidase	57, 106, 111, 180
INH-ETH	<i>M. tuberculosis</i>	<i>inhA</i> locus	810 (<i>inhA</i>) 744 (<i>orf1</i>)	<i>envM</i> analog ^b 3-Ketoacyl-acyl carrier protein reductase analog ^c	5 77, 106
STR	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. smegmatis</i>	<i>rpsL</i>	372	Ribosomal protein S12	41, 83, 112
STR	<i>M. tuberculosis</i>	<i>rs</i>	1,464	16S rRNA	36, 41
FQ Clarithromycin	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. smegmatis</i> <i>M. intracellulare</i>	<i>gyrA</i> 23S rRNA	2,517 Unknown	DNA gyrase A subunit 23S rRNA	77, 150, 156 99

^a GenBank numbers: *rpoB* (LO5910, L27989); *inhA* (UO2492); *gyrA* (L27512); *rpsL* (X70995); *rs* (X52917); *katG* (X68081). Note that for the *rpoB* gene, accession number LO5910 contains a fragment of the gene described in reference 158, whereas the entire gene is deposited under accession number L27989 (103).

^b The inferred protein encoded by *inhA* shares 40% amino acid identity over 203 amino acids with the EnvM proteins (12, 162) of *Salmonella nohimirum* and *E.*



Genotype MTBDR Plus

Moleculair *M. tuberculosis*

- **Snelle** moleculaire resistentiebepaling (< 2u)
 - **RT-PCR: Xpert MTB/Rif[®] Cepheid:** Rifampicine: *rpoB* genmutaties
 - Sensitiviteit MTB: 88% (MTB) en 94% (rif) (Cochrane Database Syst Rev 2014)
 - Specificiteit MTB: 98% (MTB) en 98% (rif)
 - **Indicaties**
 - Gevallen waar de clinicus een sterk vermoeden heeft van TB
 - Vermoeden rifampicine/MDR TB op basis van herkomst
 - Vermoeden MDR TB: chronische gevallen, niet converterende gevallen, contacten met MDR-TB gevallen, falen van een herhalingsbehandeling
 - Vermoeden HIV-geassocieerde TB
 - Niet beantwoordend aan de routine combinatietherapie voor TB en de klinische toestand vereist een dringende gevoeligheidsbepaling aan rifampicine



Moleculair *M. tuberculosis*

- Correlatie resistentiegen en gevoeligheidsbepaling

antibioticum	resistentiegen	produkt	Sensitiviteit bij positieve culturen	Sensitiviteit bij Auramine positieve stalen
Isoniazide	<i>katG</i>	catalase-peroxidase	92%	90.2%
	<i>inhA</i>	enoyl-ACP reductase		
Rifampicine	<i>rpoB</i>	β subunit van RNA polymerase	98.7%	96.8%
Ethambutol	<i>embB</i>	arabinosyl transferase	69.2%	38.5%
Pyrazinamide	<i>pncA</i>	pyrazinamidase		
FQ	<i>gyrA</i>	DNA gyrase A subunit	90.6%	88.9%
Amikacine	<i>rrs</i>	16S rRNA	84.8%	75.0%

- **Universitair Medisch Centrum (Groningen, Nederland)**
- **‘Dried blood spot’ / serum / plasma / diepgevrozen bloed**
 - Bv panel : rifampicine – ethambutol – pyrazinamide – isoniazide
 - Bv panel : moxifloxacine – linezolid – meropenem - amikacine
- **Selectiecriteria TDM**
 - Uitgebreide resistentie: voldoende hoge dosis AB verzekeren
 - Nevenwerkingen: mogelijk om dosisreductie te doen?
 - Nierinsufficiëntie
 - Gastric bypass
 - malabsorptie
- **kostprijs?**

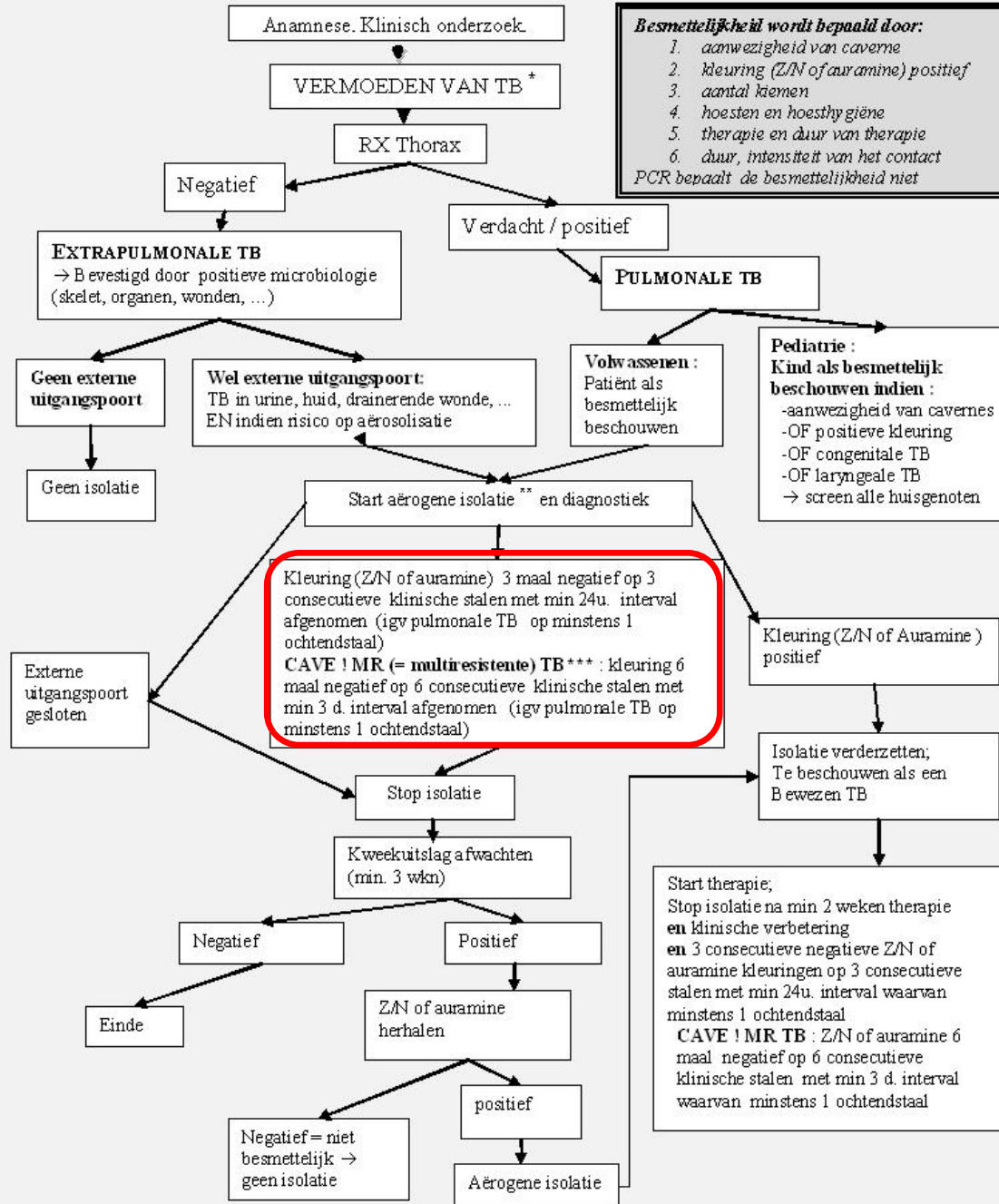
- Overdracht: aërogeen ‘droplet nuclei’ (1-5 μm)
- Infectieuze dosis: 1-10 CFU
- Besmettelijk: Long- en larynxtuberculose (niet pleura of extrapulmonale TB)
- Luchtvoorzorgsmaatregelen
 - Isolatie in eenpersoonskamer en dragen van een chirurgisch masker door de patiënt bij verlaten kamer
 - Luchtdichte isoleerkamer met sas, 6-12 luchtwisselingen/uur, negatieve druk (5-7 Pa) en continu monitoring
 - Duur van de maatregelen \approx microscopisch onderzoek en oorspronkelijke besmettelijkheid
- Personeel/bezoeker: draagt FFP2 masker

Tabel 4 : Klassen van respiratoire maskers met toenemende doeltreffendheid.

	% doordringing van het filterend gedeelte ⁽¹⁾	% totale doordringing
FFP1	<20%	<22%
FFP2	<6%	<8%
FFP3	<0.6%	<2%

⁽¹⁾ % deeltjes die het gelaatsgedeelte onmiddellijk doordringen. Proeven met deeltjes met een mediane doorsnede van 0.6 μ (0.02 tot 1 μ)

2.1.2.1. MAATREGELEN T.A.V. TUBERCULOSE – BESLISSINGSBOOM



Vermoeden van een atypische mycobacterium: zelfde procedure tot bevestiging van atypische

* In deze fase van het onderzoek draagt de patiënt bij voorkeur een masker, type FFP2 i. g. v. productieve hoest
 ** Bij voorkeur isolatie in kamer met onderdruk op E651 / steeds FFP2 of FFP3 masker
 *** Multiresistente TB = indien er tenminste sprake is van gecombineerde resistentie tegen isoniazide en rifampicine.

Document **SBB0306CU003NL** van 6 juni 2003

aangepast 28 juni 2012



Referentiedocument dat door de Dienst Bioveiligheid en Biotechnologie gebruikt wordt als bijlage aan de adviezen die afgeleverd worden aan de bevoegde overheden of aan de kennisgevers in het kader van de regionale besluiten inzake ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde organismen en/of pathogenen.

De lijst in onderstaand kader is opgesteld door de [Dienst Bioveiligheid en Biotechnologie](#) in het kader van zijn functie als technisch expert bepaald door het [Samenwerkingsakkoord van 25 april 1997](#). Deze verklarende lijst is opgesteld op basis van de bepalingen van de [regionale besluiten betreffende het ingeperkt gebruik van genetisch gemodificeerde organismen en/of pathogenen](#). Zij beschrijft in omgangstaal de minimale inperkingsvereisten waaraan inrichtingen moeten voldoen die onder de toepassing van deze besluiten vallen. Zij moet gevolgd worden onverminderd supplementaire inperkingsmaatregelen die geval per geval zouden kunnen opgelegd worden in het kader van toelatingen die afgeleverd worden door de bevoegde overheden in toepassing van bovenvermelde besluiten.

Generieke inperkingsmaatregelen en andere beschermingsmaatregelen Geval van laboratoria van niveau L3

Inrichting en technische karakteristieken van de laboratoria

1. Het laboratorium is fysisch gescheiden van andere werkzones in het gebouw of is in een apart gebouw gelegen.
2. De toegang tot dit laboratorium gebeurt via een sas*.
3. De toegangsdeur tot het sas is vergrendelbaar en is voorzien van een elektronische of equivalente controle.
4. De deuren van het sas zijn voorzien van een automatische sluiting. Er is een speciaal systeem (bv. interlock) voorzien waardoor beide deuren van het sas niet tegelijkertijd open kunnen, maar dit is zo ingericht dat bij ongeval de hulpverleners niet gehinderd worden.
5. Het lokaal heeft vaste ramen die hermetisch afgesloten zijn.
6. Het lokaal kan luchtdicht gemaakt worden om decontaminatie met een gas mogelijk te maken. (luchtleidingen, nutsvoorzieningen)
7. Het meubilair is dusdanig ontworpen dat het vlotte reiniging en ontsmetting toelaat en een controleprogramma voor insecten en knaagdieren vergemakkelijkt.
8. Het lokaal heeft een kijkvenster of gelijkwaardig systeem dat toelaat van buitenaf te zien wie zich in het lokaal bevindt.
9. De ingeperkte zone is voorzien van een wasbak met niet-manuele bediening voor het wassen en het decontamineren van de handen. Deze wasbak staat in het sas.
10. Er zijn kapstokken of een kleedkamer voorzien voor beschermende kleding. Stadskledij en beschermende kleding moeten van elkaar gescheiden blijven.
11. Toevoerbuizen voor vloeistoffen zijn voorzien van een terugvloeibeveiliging.
12. De werktafels en vloer zijn gemakkelijk schoon te maken, waterdoorringbaar en zijn bestand tegen zuren, basen, organische oplosmiddelen, gebruikte ontsmettingsmiddelen en decontaminatiemiddelen.
13. Er is een autonoom elektronisch systeem voorzien ingeval van stroomonderbreking om minimaal de stroomvoorziening voor het ventilatiesysteem te voorzien.
14. Er is een automatisch brandalarmsysteem.
15. In de zone is er een interfoon, telefoon of elk ander systeem waarmee communicatie buiten de inperkingzone mogelijk is.
16. De zone wordt permanent in onderdruk gehouden t.o.v. de aangrenzende zone's om mogelijke besmetting buiten de zone te verhinderen.
17. De negatieve luchtdruk in de zone wordt gecreëerd en behouden door middel van een ventilatiesysteem, waarbij zowel de luchttoevoer als de luchtafvoer door een motor aangedreven zijn.
18. De onderdruk wordt gecontroleerd door een manometer en het is vereist dat er een alarmsysteem aan gekoppeld is ingeval van panne van het ventilatiesysteem.
19. Luchttoevoer- en luchtafvoersysteem zijn gescheiden van aangrenzende lokalen. (Indien het luchttoevoersysteem niet gescheiden is van dit van de aangrenzende lokalen moet er een HEPA filter of klappen geïnstalleerd worden om het