

---

**CAT Laboratoriumdiagnostiek van  
mycobacteriën: Kwaliteitsindicatoren &  
Klinische relevantie van niet-tuberculeuze  
mycobacteriën**

---

## **Introductie**

Dit werk bestaat uit drie onderdelen, die allen tezamen het doel hebben om de kwaliteit van de laboratoriumdiagnostiek van mycobacteriën in GZA te optimaliseren.

In het eerste deel van dit werk gaan we dieper in op de verschillende criteria die vervuld moeten worden om een kwaliteitsvolle mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek te garanderen. Op basis hiervan definiëren we kwaliteitsindicatoren (=KPI's of Key Performance Indicators) om de kwaliteit van onze diagnostiek verder op te volgen in tijd.

Het tweede deel bestaat uit een retrospectieve studie met bespreking en grafische voorstelling van de resultaten van alle mycobacteriële stalen die gedurende een periode van 4 jaar (2015-2018) werden geanalyseerd in het laboratorium van GZA. Op basis van deze gegevens stellen we tevens richtwaarden op voor de in het eerste deel gedefinieerde KPI's. Om een idee te krijgen hoe andere microbiologische laboratoria in Vlaanderen de mycobacteriële diagnostiek monitoren, hebben we aan de BILULU laboratoria gevraagd om een korte vragenlijst in te vullen. De resultaten hiervan worden tevens kort besproken in deel 2.

Het laatste deel omvat een literatuuronderzoek naar de relevantie van atypische mycobacteriën geïsoleerd uit klinische stalen. Hierin trachten we een antwoord te formuleren op algemene vragen zoals: 'Wat zijn risicofactoren voor het ontwikkelen van niet-tuberculeuze mycobacteriële infectie?' en 'Hoe kan men onderscheid maken tussen infectie, kolonisatie en contaminatie?'. Verder gaan we hier ook dieper in op de klinische relevantie van de meest frequent geïsoleerde niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) uit respiratoire stalen in GZA.

# **I Laboratoriumdiagnostiek van mycobacteriën & kwaliteitsbewaking**

## **I.1 Kwaliteitseisen voor laboratoriumdiagnostiek van mycobacteriën**

### **I.1.1 Introductie: algemene kwaliteitseisen**

In de ISO 15189 norm voor medische laboratoria staat vermeld dat elk laboratorium kwaliteitsindicatoren dient op te stellen om zo de kwaliteit van al zijn processen, gaande van de pre- tot post-analytische fase, te garanderen. Deze monitoring met behulp van kwaliteitsindicatoren dient systematisch en periodiek te worden uitgevoerd waarbij vooraf concrete doelstellingen worden geformuleerd, met inbegrip van het vaststellen van normaalwaarden en de te ondernemen acties indien men hiervan afwijkt.<sup>7</sup>

Het Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) heeft specifiek voor de laboratoriumdiagnostiek en identificatie van mycobacteriën richtlijnen gepubliceerd, welke zijn gebundeld in het CLSI M48 document. Dit document vormt een handige leidraad voor het opstellen en opvolgen van kwaliteitsindicatoren bij de mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek.<sup>1</sup> Naast CLSI heeft ook de American Society for Microbiology (ASM) praktijkrichtlijnen opgesteld omtrent de laboratoriumdiagnostiek van mycobacteriën.<sup>3</sup> Naast deze twee Amerikaanse richtlijnen, bestaan er ook Europese richtlijnen voor de kwaliteitswaarborging van mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek gepubliceerd door het European Centre for Disease prevention and Control (ECDC).<sup>2</sup> Het Global Laboratory Initiative (GLI) uitgaande van het Stop TB Partnership heeft daarnaast ook een praktijkhandboek gepubliceerd dat specifiek gericht is op laboratoriumdiagnose van tuberculose.<sup>4</sup> Naast deze richtlijnen is het artikel van McCarthy et al. (2008) over kwaliteitsmonitoring in mycobacteriële laboratoria tevens een handige bron van informatie waarin enkele praktische tips voor het opstellen en opvolgen van kwaliteitsindicatoren worden gegeven.<sup>21</sup>

## **I.2 Kwaliteitsindicatoren voor mycobacteriële diagnostiek**

Als onderdeel van de goede laboratoriumpraktijk (GLP) dient elk laboratorium zijn activiteiten te registreren. Deze gegevens worden op een op voorhand vastgelegd tijdstip opgevraagd, waarbij men meestal een interval van 1-3 maanden hanteert. Dit om eventuele afwijkingen tijdig te detecteren en te corrigeren om zo de kwaliteit van de aangeboden service te kunnen garanderen.<sup>7</sup>

### **I.2.1 Kwaliteitsmonitoring auramine kleuring**

Bij het maken van de uitstrijkjes voor auramine kleuring raadt men aan om sputumstalen eerst te vervloeien en te concentreren. Het maken van directe uitstrijkjes wordt afgeraden, aangezien deze methode globaal minder gevoelig is. Voor vochten wordt er best een uitstrijkje gemaakt van het sediment van het gecentrifugeerde staal. Het materiaal moet egaal verspreid worden over een oppervlakte van 2cm<sup>2</sup>, hierbij is het belangrijk om het uitstrijkje niet te dik te maken, dit om afbrokkelen tijdens het kleuringsproces of zuurvaste artefacten te voorkomen. De Amerikaanse richtlijnen geven de voorkeur aan hittefixatie of chemische fixatie van de uitstrijkjes, de Europese richtlijnen verkiezen de traditionele vlamfixatie. Hierbij wordt het uitstrijkje 2-3 keer kortdurende (max 2-3 seconden) doorheen de vlam verplaatst.<sup>1-3</sup>

Fluorochroom gekleurde uitstrijkjes dienen eerst gescreend te worden met een vergroting van 250x, hierbij dienen minstens 30 velden te worden bekeken. Confirmatie van aanwezigheid van zuurvaste bacillen gebeurt best met een vergroting van 450x. Elke positieve auramine kleuring dient gecontroleerd te worden door een tweede laborant.

Men raadt aan om elke run of ten minste wekelijks een controle positieve en negatieve auramine kleuring mee te nemen. Idealiter ondergaan deze interne controles het ganse proces van droging, fixatie en kleuring gelijktijdig met de geanalyseerde patiëntstalen. Als positieve interne controle wordt een traag groeiend NTM species aangeraden (geen bijkomende bioveiligheidsmaatregelen nodig), als negatieve interne controle een *E. coli* stam. De controle auramine uitstrijkjes dienen steeds voor de uitstrijkjes van klinische stalen te worden geïnterpreteerd. Het resultaat van de auramine kleuring moet binnen de 24u na staalcollectie worden

gerapporteerd. Uitstrijkjes dienen gestockeerd te worden in een gesloten systeem totdat de cultuur volledig afgewerkt is, wat in praktijk neerkomt op 6 weken (de standaard incubatieperiode voor mycobacteriën).

Om het ganse proces van de auramine kleuring te monitoren, zijn er 3 belangrijke KPI's die op vastgelegde tijdstippen dienen te worden berekend en opgevolgd (zie tabel 1).

Tabel 1: Auramine kleuring KPI's

| KPI  | Berekening   | Richtwaarde <sup>1</sup>                       |
|--|--|--|
| Aantal en percentage positieve auramine kleuringen   | Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal auramine kleuringen   | labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| Correlatie positieve auramine met positieve kweek<br>= Sensitiviteit van auramine kleuring | Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal kweken positief voor MTC<br>Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal kweken positief voor NTM | MTC: 30-70%<br>MTC > NTM                       |
| Correlatie kweek met positieve auramine<br>= Specificiteit van auramine kleuring           | Aantal positieve auramine kleuringen met positieve kweek voor MTC + NTM / Totaal aantal kweken met positieve auramine kleuring (ongeacht kweekresultaat)       | 90-98%   |

Een plotse shift in één van deze drie KPI's kan te wijten zijn aan vals positieve of vals negatieve auramine kleuringen en vereist gepaste actie.

Bij de KPI's met betrekking tot de correlatie tussen kweek en auramine kleuring kan een afwijkend resultaat ook te wijten zijn aan de inclusie van stalen van patiënten onder therapie. Auramine kleuringen van stalen van patiënten onder therapie kunnen tot 14 weken na start van de tuberculostatika positief blijven. In deze context zien we dus een positieve auramine kleuring met een negatieve mycobacteriële cultuur.<sup>22</sup>

De meest frequente en vermijdbare oorzaken van vals positieve en vals negatieve auramine kleuringen staan opgesomd in tabel 2 en tabel 3.

Tabel 2: Frequentie oorzaken van vals positieve auramine kleuringen

| Vals positieve auramine kleuring  | Mogelijke preventieve acties  |
|---|---|
| Kruiscontaminatie   | Uitstrijkjes mogen niet in contact komen met elkaar tijdens het drogen, fixeren en kleuren om overdracht van zuurvaste bacillen te voorkomen                                  |
| Contaminatie door zuurvaste bacillen in immersieolie  | Na elk positief auramine uitstrijkje dient de objectief lens te worden gereinigd  |
| Te dikke uitstrijkjes waardoor:<br>- aanwezigheid van cellulair debris met zuurvaste artefacten tot gevolg<br>- materiaal wordt weggewassen tijdens kleuringsproces | Extra aandacht tijdens maken uitstrijkje<br>Ter controle kan het uitstrijkje 4-5 cm boven een geprinte tekst worden gehouden, normaal moet de tekst nog perfect leesbaar zijn |
| Zuurvaste artefacten die foutief worden geïnterpreteerd als zuurvaste bacillen  | Elk positief auramine uitstrijkje moet gecontroleerd worden door een tweede laborant<br>Competentie laboranten regelmatig testen (bv. ringtest)                               |

Tabel 3: Frequentie oorzaken van vals negatieve auramine kleuringen

| Vals negatieve auramine kleuring                    | Mogelijke preventieve acties  |
|---|---|
| Te dun uitgestreken stalen                          | Extra aandacht tijdens maken uitstrijkje, de oppervlakte van een ideaal uitstrijkje bedraagt 2 cm <sup>2</sup>  |
| Onvolledig bekeken uitstrijkjes                     | Elk uitstrijkje moet op een uniforme manier bekeken worden<br>Bij een vergroting van x250 dienen minstens 30 velden te worden gescreend op de aanwezigheid van zuurvaste bacillen |
| Gemiste zuurvaste bacillen                          | Competentie laboranten regelmatig test (bv. ringtest)   |
| Technische problemen met kleurtoestel of microscoop | Regelmatig nazicht van microscoop en kleurtoestel door firma<br>Gebruik positieve en negatieve interne controles zodat technische problemen tijdig gedetecteerd worden            |

## 1.2.2 Kwaliteitsmonitoring mycobacteriële kweekmethode: MGIT

In GZA wordt er enkel een vloeibaar kweekmedium ingezet voor mycobacteriële cultuur, namelijk het BACTEC MGIT medium geleverd door Becton Dickinson (BD). De MGIT flesjes worden standaard gedurende 42 dagen geïncubeerd in het automatisch BACTEC MGIT 960 systeem van BD. Indien het toestel de flesjes als positief vlagt, worden deze doorgestuurd naar het Sciensano referentielaboratorium voor verdere diagnostiek en gevoeligheidsbepaling. Op vlak van kwaliteitsmonitoring gaan we dus enkel in op de eisen die gesteld worden omtrent het gebruik van commerciële vloeibare kweekmedia.

Men raadt bij het gebruik van commerciële vloeibare media aan om de QC data van de leverancier bij te houden (analysecertificaat) en op te volgen. De kwaliteitseisen die hier gesteld worden gelden zowel voor de eigenlijke MGIT flesjes met Middlebrook 7H9 bouillon als voor het daarbij horende groei supplement en antibioticamengsel (PANTA). Bij elke ingebruikname van een nieuw lot, dient dit lotnummer samen met de vervaldatum te worden geregistreerd. De MGIT flesjes dienen visueel te worden nagekeken om eventuele mankementen en/of contaminatie te detecteren. Bij ingebruikname van een nieuw lot wordt er tevens aangeraden om een positieve en negatieve controle in te zetten, waarvan de positieve controle een *Mycobacterium tuberculosis* referentiestam is.

Na een incubatieperiode van 6 weken worden de MGIT flesjes als negatief geantwoord. Omdat het BD BACTEC MGIT 960 systeem aanleiding kan geven tot vals negatieve resultaten, dienen de MGIT flesjes manueel te worden nagekeken bij het uitladen. Dit fenomeen doet zich vooral voor bij *M. xenopi* isolaten, waarbij groei op te merken valt door aanwezigheid van ronde geelgekleurde korrels in het MGIT flesje.<sup>26</sup>

Indien de auramine kleuring en/of PCR op het ingezette staal positief was/waren en de MGIT na 6 weken nog niet als positief werd gevestigd, dient het flesje een bijkomende 4 weken te worden geïncubeerd. Ook voor stalen van patiënten die vanuit klinisch standpunt sterk verdacht zijn voor een mycobacteriële infectie, kan een verlengde incubatieduur nuttig zijn. Sommige traag groeiende mycobacteriën zoals *M. genavense* worden immers pas zeer laat positief.<sup>3,4</sup> Naast deze algemene aanbevelingen, dienen de KPI's opgesomd in tabel 4 op vaste tijdstippen gemonitord te worden.

Tabel 4: Mycobacteriële kweek KPI's

| KPI   | Berekening   | Richtwaarde                                    |
|---|--|--|
| Aantal en percentage positieve mycobacteriële kweken                  | Aantal positieve mycobacteriële kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| Aantal en percentage <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex kweken | Aantal positieve MTC kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken            | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| Aantal en percentage positieve atypische mycobacteriële of NTM kweken | Aantal positieve NTM kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken            | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

Een plotse toename van een bepaalde mycobacteriële soort kan te wijten zijn aan kruiscontaminatie. Dit kan eenvoudig achterhaald worden door na te gaan welke stalen samen werden ingezet. Een plotse toename van een NTM species kan te wijten zijn aan contaminatie vanuit de omgeving met als typevoorbeeld *M. goodii*, hiervoor wordt dan ook een bijkomende monitoring aangeraden (zie 1.2.5).

Een afname van het aantal positieve mycobacteriële kweken kan het gevolg zijn van een te agressieve decontaminatie procedure waarbij niet alleen de bacteriële groei maar ook de mycobacteriële groei wordt geremd. Ook een te zwakke decontaminatie procedure kan aanleiding geven tot een verlaagd aantal positieve mycobacteriële kweken doordat massieve bacteriële overgroei de groei van vooral NTM species onderdrukt. In deel 1.2.4 gaan we dieper in op de verschillende decontaminatie procedures en het opvolgen van de bacteriële contaminatiegraad van mycobacteriële kweken.

### 1.2.3 Kwaliteitsmonitoring staalvoorbehandeling: de bacteriële contaminatiegraad

Stalen afkomstig uit niet-steriele lichaamscompartimenten zoals sputumstalen dienen te worden voorbehandeld. Deze voorbehandeling dient om het materiaal te homogeniseren, te vervloeien, te decontamineren en uiteindelijk de mycobacteriën te concentreren. Het homogeniseren zorgt voor het vrijkomen van de intracellulaire mycobacteriën uit de macrofagen en verdeelt deze gelijkmatig over het staal. De meest gebruikte methode om stalen te homogeniseren, vervloeien en te decontamineren is de N-acetyl L-cysteïne (NALC) - natriumhydroxide (NaOH) methode. NALC is een mucolyticum en maakt mucozeuze stalen vloeibaar door disulfidebruggen te verbreken. NaOH heeft een toxische werking en draagt ook bij tot de homogenisatie en vervloeiing van het staal. NaOH is minder toxisch voor mycobacteriën dan voor de meeste andere bacteriën omwille van hun sterkere celwand. Door gecontamineerde stalen bloot te stellen aan NaOH tracht men bacteriële overgroei te voorkomen. Hierbij is het belangrijk om de concentratie en blootstellingsduur aan NaOH perfect te balanceren. Een te sterke decontaminatie omwille van een te hoge concentratie NaOH of een te lange blootstelling aan NaOH zal immers ook mycobacteriën doden en aanleiding geven tot valsnegatieve culturen. Een te zwakke decontaminatie daarentegen geeft aanleiding tot groei van contaminanten en verloren culturen. NaOH wordt in combinatie met NALC veelal gebruikt in een concentratie van 2%. Voor sterk gecontamineerde stalen kunnen hogere concentraties van NaOH tot 5-6% worden gebruikt, dit gaat echter gepaard met een belangrijk verlies aan mycobacteriën (tot 90% minder opbrengst).<sup>1,3</sup> Andere minder frequent gebruikte decontaminatie methoden zijn de natriumhydroxide methode, de benzalkoniumchloride trinitriumfosfaat methode, de oxaalzuur methode en de cetylpyridinium chloride methode.<sup>1</sup>

De voorbehandeling van respiratoire stalen van mucoviscidose patiënten vereist speciale aandacht. Mucoviscidose patiënten zijn immers gevoeliger voor NTM gerelateerde longziekte omwille van een lokale en vaak ook algemeen verstoorde afweer. Bij ongeveer 6-13% van de mucoviscidosepatiënten worden NTM geïsoleerd. Het is dus zeer belangrijk om bij deze patiëntenpopulatie bedacht te zijn op aanwezigheid van NTM in respiratoire stalen.<sup>28</sup> Het isoleren van NTM species uit respiratoire stalen van mucoviscidose patiënten wordt echter bemoeilijkt doordat 50-70% van deze stalen gecontamineerd zijn met *Pseudomonas aeruginosa*. Deze kiem is resistent echter resistent aan de NALC-NaOH methode waardoor de bacteriële contaminatiegraad kan oplopen tot 35-70% van de ingezette mycobacteriële kweken.<sup>3</sup> Dit probleem kan omzeild worden door deze stalen te decontamineren met oxaalzuur, al dan niet in combinatie met de NALC-NaOH methode. Oxaalzuur is echter ook toxisch voor mycobacteriën en gaat gepaard met een lagere mycobacteriële opbrengst. De chloorhexidine methode is in vergelijking tot de NALC-NaOH-oxaalzuur methode in staat om meer NTM aan te tonen, maar kan niet gebruikt worden bij het BD Bactec MGIT systeem omwille van interfererende fluorescentie.<sup>3</sup> Het RGM agar medium is een nieuw selectief medium speciaal ontwikkeld voor het opsporen van NTM in respiratoire stalen van mucoviscidose patiënten. Stalen kunnen hierop zonder voorafgaande decontaminatiestap worden geënt. De eerste resultaten van dit selectief medium zijn zeer beloftevol met een significant lagere bacteriële contaminatiegraad in vergelijking met de NALC-NaOH methode. Bovendien groeien er op dit medium enkel NTM waardoor dit in elk microbiologisch laboratorium veilig kan worden gebruikt.<sup>28</sup> Na het homogeniseren, vervloeien en decontamineren dienen te stalen gecentrifugeerd te worden om de mycobacteriën te concentreren. Om een goede mycobacteriële opbrengst te garanderen dienen stalen gekoeld te worden gecentrifugeerd bij 8-10°C aan 3000x g en dit gedurende minstens 15 minuten. In GZA maken we gebruik van de NALC-NaOH methode met een eindconcentratie van 2% NaOH. Onze stalen worden tijdens de voorbehandeling 20 minuten gekoeld gecentrifugeerd aan 3000xg. Het sediment wordt uiteindelijk geïnoculeerd in een MGIT tube, waaraan voorafgaand PANTA/groei-supplement werd toegevoegd.

De belangrijkste parameter om de kwaliteit van de staalvoorbereiding op te volgen is de bacteriële contaminatiegraad. De bacteriële contaminatiegraad wordt gedefinieerd als het aantal gecontamineerde culturen op het totaal aantal ingezette culturen die de decontaminatieprocedure hebben ondergaan. Hierbij dient er dus enkel rekening gehouden te worden met de culturen die werden ingezet vanuit niet-steriele stalen. De ideale bacteriële contaminatiegraad voor vloeibare media ligt volgens de Amerikaanse richtlijnen tussen de 7 - 8%.<sup>1,3</sup> De Europese richtlijnen hanteren een bredere marge voor de bacteriële contaminatiegraad van

vloeibare media, namelijk tussen de 5 - 10%. Indien de bacteriële contaminatiegraad herhaaldelijk de 10% overschrijdt, kan dit te wijten zijn aan een te zwakke decontaminatieprocedure. Het verhogen van de NaOH concentratie kan in dit geval soelaas brengen.<sup>2</sup> Een toename van de contaminatiegraad is vaak echter het gevolg van suboptimale staalfname- en/of transportcondities die bacteriële overgroei in de hand werken. Zo moet een sputumstaal gekoeld worden bewaard indien dit niet binnen het uur na collectie naar het laboratorium wordt verzonden. Het is dus belangrijk om als laboratorium duidelijke afname –en transportcondities te formuleren om een optimale kwaliteit van stalen voor mycobacteriële diagnostiek te garanderen. Het aanpassen van de NaOH concentratie dient pas als laatste stap te worden overwogen aangezien deze steeds ongewild gepaard gaat met een verminderde mycobacteriële opbrengst.

Een recente publicatie van Soetaert et al. (2019) beschrijft een forse stijging van het aantal vals positieve culturen opgestuurd naar Belgisch referentielaboratorium, namelijk van 19,8% in 2007 naar 43,3% in 2016. Deze toename wordt voornamelijk toegeschreven aan de verstrengde bioveiligheidsnormen die in 2007 werden ingevoerd, waardoor momenteel heel wat perifere laboratoria niet langer uitgerust zijn om zelf positieve MGIT's te screenen op de aanwezigheid van contaminatie. Bovendien zijn er vermoedelijk meerdere laboratoria tijdens deze periode overgeschakeld van vaste manuele kweekmedia naar vloeibare geautomatiseerde systemen voor mycobacteriële diagnostiek, welke gevoeliger zijn voor contaminatie. Toch kan de stijging van het aantal valspositieve culturen hier niet helemaal door worden verklaard en zijn er dus argumenten voor een echte toename van het aantal valspositieve culturen in België.<sup>31</sup>

#### 1.2.4 Turnaround tijden (TAT) monitoring

In tabel 5 staan de belangrijkste TATs voor mycobacteriële diagnostiek opgesomd. Deze TATs hebben een grote impact op het beleid van de patiënt (isolatiebeleid, initiatie therapie) en dienen zeer strikt te worden nageleefd.<sup>1,3</sup>

Tabel 5: Algemene TATs voor mycobacteriële diagnostiek

| TAT                                      | Definitie TAT (tijd tussen beiden)               | Richtwaarde |
|--|--|-------------|
| Resultaat auramine kleuring              | Staalreceptie – rapporteren resultaat            | < 24 uren   |
| Resultaat MTC PCR                        | Staalreceptie/aanvraag – rapporteren resultaat   | < 48 uren   |
| Resultaat MTC kweek                      | Staalreceptie – rapporteren resultaat            | < 21 dagen  |
| Resultaat (eerste) gevoeligheidsbepaling | Rapporteren kweek ID – rapporteren AST resultaat | < 17 dagen  |

Een bijkomende nuttige TAT ter kwaliteitsbewaking van de mycobacteriële diagnostiek is de gemiddelde tijd tot detectie van *Mycobacterium tuberculosis* complex isolaten (en eventueel NTM isolaten) en dit in functie van het resultaat van de auramine kleuring. Elk laboratorium dient hiervoor zelf richtwaarden op te stellen. Deze TATs dienen nagenoeg constant te blijven. De gemiddelde tijd tot detectie voor MTC isolaten zullen we specifiek opvolgen zoals gedefinieerd in tabel 6.

Tabel 6: TAT KPI

| KPI  | Berekening   | Richtwaarde                                    |
|--|--|--|
| Gemiddelde tijd tot detectie voor MTC (in dagen) | TAT = tijdstip MGIT positief gevlagd op BACTEC MGIT systeem - tijdstip staalreceptie | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

Een afname van de gemiddelde tijd tot detectie kan wijzen op een verbeterde mycobacteriële workflow en dient verder te worden gehandhaafd. Een toename daarentegen dient ten alle tijde te worden vermeden en kan te wijten zijn aan suboptimale staalvoorbereiding (bv. te agressieve decontaminatie waardoor ook mycobacteriële groei wordt geremd of onvoldoende/slecht afdraaien van de stalen).

### 1.2.5 Monitoring van *M. gordonae*

*Mycobacterium gordonae* komt wijdverspreid voor in de natuur en wordt ook vaak aangetroffen in drinkwater. Er zijn reeds meerdere pseudo-uitbraken van *M. gordonae* gerapporteerd die te wijten waren aan gecontamineerde waterbronnen zoals drinkwaterfontein, ijsmachines, waterige ontsmettingsmiddelen en spoelwater van bronchoscopen wasmachines.<sup>24</sup> Hierdoor kan het nuttig zijn om het aantal isolaten van *M. gordonae* nauwkeurig te monitoren. Indien een duidelijke toename van *M. gordonae* in het laboratorium wordt geregistreerd, kan het nemen van waterstalen helpen om een gemeenschappelijke bron van besmetting te achterhalen.<sup>24,35</sup>

### 1.2.6 Monitoring moleculaire mycobacteriële diagnostiek

Het laboratorium voor moleculaire microbiologie in GZA beschikt over een in-house *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) PCR. In kader van de kwaliteitsmonitoring van de mycobacteriële diagnostiek wensen we dus ook de resultaten van de MTC PCR op te volgen. Concreet zullen we jaarlijks het aantal MTC PCR aanvragen bijhouden, met de fractie positieve en negatieve PCR resultaten. Verder wensen we de correlatie tussen PCR en klassieke mycobacteriële kweek op te volgen. Zo kunnen mogelijks vals negatieve of vals positieve kweek of PCR resultaten beter opgepikt worden (zie tabel 7).

Tabel 7: Moleculaire mycobacteriële KPI's

| KPI  | Berekening   | Richtwaarde                                    |
|--|--|--|
| Aantal MTC PCR aanvragen met aantal en percentage positieve resultaten | Aantal positieve MTC PCR aanvragen / Totaal aantal MTC PCR aanvragen   | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| Correlatie MTC PCR met klassieke mycobacteriële kweek                  | Sensitiviteit, specificiteit, NPV en PPV van MTC PCR (klassieke mycobacteriële kweek resultaat ter referentie of gouden standaard) | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

### 1.2.7 Samenvatting KPI monitoring mycobacteriële diagnostiek

In tabel 8 staan alle op te volgen KPI's met betrekking tot de laboratoriumdiagnostiek opgesomd met hun definitie en richtwaarde.

Tabel 8: Te monitoren KPI's bij mycobacteriële diagnostiek

| KPI   | Berekening   | Richtwaarde <sup>1</sup>                       |
|---|--|--|
| 1 Aantal mycobacteriële stalen  | n.v.t.   | n.v.t.   |
| 2 Aantal en percentage positieve auramine kleuringen                                      | Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal auramine kleuringen   | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| 3 Correlatie positieve auramine met positieve kweek = Sensitiviteit van auramine kleuring | Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal kweken positief voor MTC<br>Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal kweken positief voor NTM | MTC: 30-70%<br>MTC > NTM                       |
| 4 Correlatie kweek met positieve auramine = Specificiteit van auramine kleuring           | Aantal positieve auramine kleuringen met positieve kweek voor MTC + NTM / Totaal aantal kweken met positieve auramine kleuring (ongeacht kweekresultaat)       | 90-98%   |
| 5 Aantal en percentage positieve mycobacteriële kweken                                    | Aantal positieve mycobacteriële kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken   | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| 6 Aantal en percentage <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex kweken                   | Aantal positieve MTC kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken  | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| 7 Aantal en percentage positieve atypische mycobacteriële of                              | Aantal positieve NTM kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken  | Labo specifiek: richtwaarde zelf op            |



|    |  |  |  |
|----|--|--|--|
|    | NTM kweken   |  | te stellen                                     |
| 8  | Bacteriële contaminatiegraad   | Aantal gecontamineerde kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken  | 5-10%  |
| 9  | Aantal en percentage <i>M. gordonae</i> isolaten                       | Aantal positieve <i>M. gordonae</i> kweken / Totaal aantal culturen positief voor NTM  | Labo specifiek                                 |
| 10 | Gemiddelde tijd tot detectie voor MTC (in dagen)                       | TAT = tijdstip MGIT positief gevlagd op BACTEC MGIT systeem - tijdstip staalreceptie   | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| 11 | Aantal MTC PCR aanvragen met aantal en percentage positieve resultaten | Aantal positieve MTC PCR / Totaal aantal uitgevoerde MTC PCR   | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| 12 | Correlatie MTC PCR met klassieke mycobacteriële kweek                  | Sensitiviteit, specificiteit, NPV en PPV van MTC PCR (klassieke mycobacteriële kweek resultaat ter referentie of gouden standaard) | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

## 2 **Retrospectieve studie mycobacteriën in GZA periode 2015-2018**

### 2.1 Vaststellen normaalwaarden kwaliteitsindicatoren

#### 2.1.1 Aandachtspunten bij het opstellen van normaalwaarden

CLSI formuleert volgende criteria voor het opstellen van normaalwaarden:

- De normaalwaarden dienen opgesteld te worden op basis van resultaten van minstens 1000 verschillende stalen;
- Met exclusie van follow-up stalen van patiënten onder therapie;
- Indien er meerdere kweken van eenzelfde staal worden ingezet, dienen deze samen te worden geïnterpreteerd.

Indien we van deze criteria afwijken, wordt dit steeds vermeld en verantwoord.

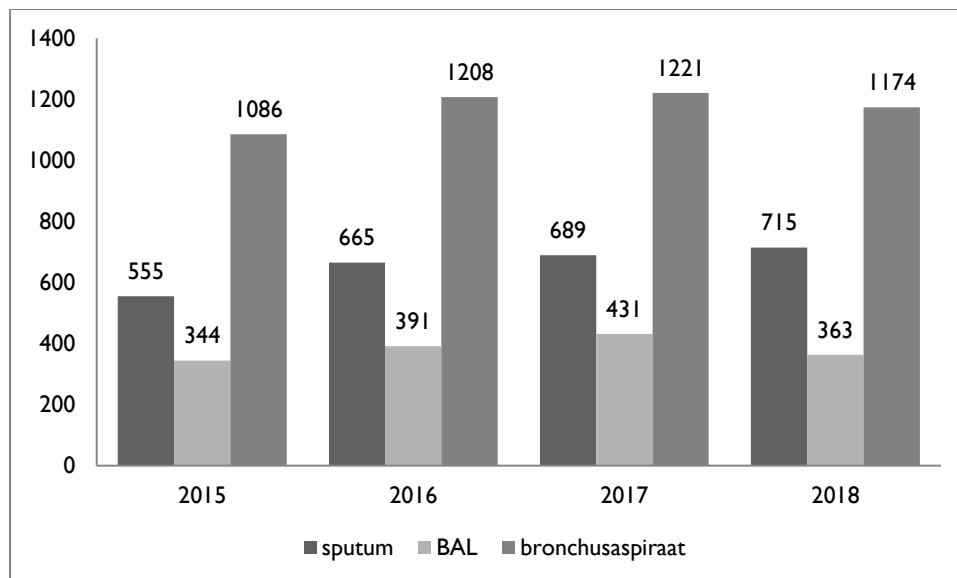
#### 2.1.2 KPI 1: Aantal mycobacteriële stalen

| KPI                            | Berekening | Richtwaarde |
|--------------------------------|------------|-------------|
| 1 Aantal mycobacteriële stalen | n.v.t.     | n.v.t.      |

##### 2.1.2.1 Respiratoire stalen

Gedurende de periode 2015-2018 werden in er in GZA 8842 mycobacteriële kweken ingezet vanuit respiratoire stalen. Totaal aantal aanvragen en onderlinge verhouding tussen bronchusaspiraats, sputum en BAL-vochten bleef relatief constant gedurende deze periode. Meer dan de helft van alle respiratoire kweken werd aangevraagd op bronchusaspiraats (zie figuur 1).

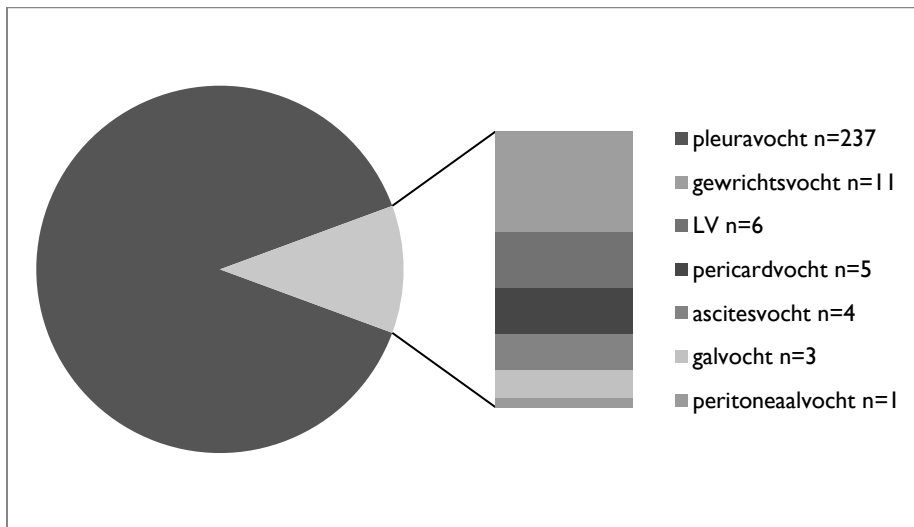
Figuur 1: Aantal respiratoire mycobacteriële kweken volgens staaltipe voor 2015-2018



##### 2.1.2.2 Punctievochten

In 2018 werden er 267 mycobacteriële kweken aangevraagd op punctievochten, waarvan de meerderheid op pleuravocht (n=237 of 87,7%).

Figuur 3: Mycobacteriële kweek op verschillende punctievochten in 2018



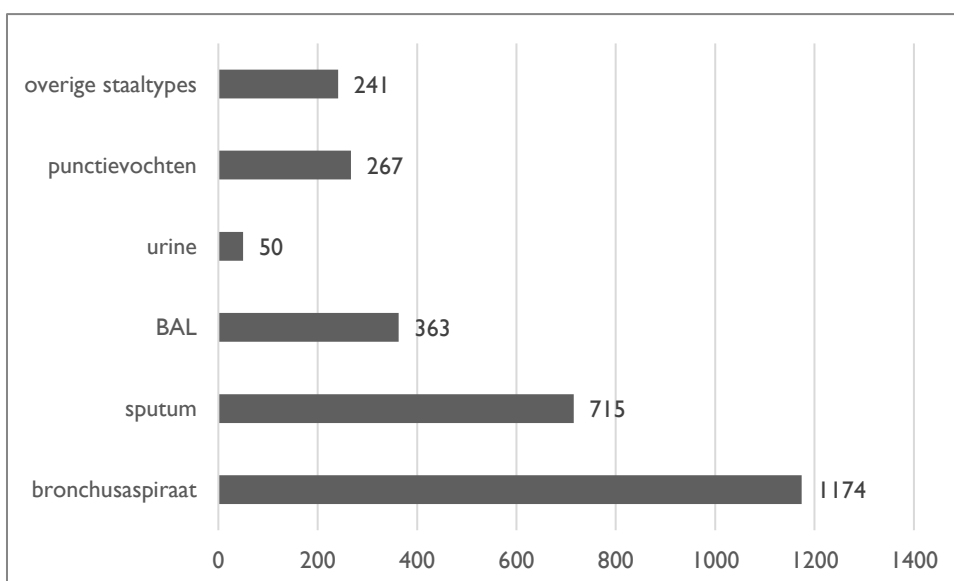
### 2.1.2.3 Overige staaltypes

In 2018 werden er 291 mycobacteriële kweken uitgevoerd op staaltypes die niet tot de 2 bovenstaande groepen behoorden. Het ging hier onder meer over kweken ingezet vanuit urines (n=50), wondwissers, cystes, abcessen en maagvocht, naast kweken op gepreleveerde lymfeklieren en bipten.

### 2.1.2.4 Totaal aantal mycobacteriële kweken in 2018

In 2018 werden er in totaal 2810 mycobacteriële kweken aangevraagd in GZA. De meerderheid van de aanvragen was op respiratoire stalen (n=2251 of 80,1%). Mycobacteriële kweek op punctievochten (n=267 of 9,5%), overige staaltypes (n=241 of 8,6%) en ochtendurine (n=50 of 1,8%) werden beduidend minder aangevraagd (zie figuur 4).

Figuur 4: Mycobacteriële kweken in 2018 per staaltipe



#### Conclusie GZA KPI 1:

- Aantal mycobacteriële kweken en onderlinge verhouding tussen staaltypes toont weinig variatie over periode 2015-2018.
- Geen acties noodzakelijk. Verder op te volgen.

#### 2.1.3 KPI 2: Aantal en percentage positieve auramine kleuringen

| KPI  | Berekening   | Richtwaarde                                    |
|--|--|--|
| 2 Aantal en percentage positieve auramine kleuringen | Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal auramine kleuringen | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

Het aantal en percentage positieve auramine kleuringen voor 2018, staat per staaltipe opgesomd in tabel 9, voor de volledigheid staat hier ook het aantal en percentage negatieve auramine kleuringen vermeld.

Tabel 9: Absolute/relatieve aantal stalen met positieve/negatieve auramine in 2018

|                        | Auramine positief |        | Auramine negatief |         |
|------------------------|-------------------|--------|-------------------|---------|
| Respiratoir totaal     | 40                | (1,7%) | 2305              | (98,3%) |
| Bronchusaspiraatsputum | 7                 | (0,6%) | 1170              | (99,6%) |
| BAL                    | 25                | (3,2%) | 759               | (96,8%) |
| Urine                  | 8                 | (2,1%) | 376               | (97,9%) |
| Punctievocht           | 0                 | (0%)   | 50                | (100%)  |
| Overige                | 1                 | (0,4%) | 266               | (99,6%) |
|                        | 0                 | (0%)   | 241               | (100%)  |
| Totaal 2018            | 41                | (1,4%) | 2862              | (98,6%) |

Bij de respiratoire stalen zat er gedurende de periode 2015-2018 een beperkte variatie op het absolute en relatieve aantal positieve en negatieve auramine kleuringen (zie tabel 10). In totaal waren slechts 209 van de 8993 uitgevoerde auramine kleuringen op respiratoire stalen positief. De kans op een positieve auramine kleuring was het grootst bij sputumstalen en het kleinst bij bronchusaspiraten.

Er zijn bijna geen studies uitgevoerd waarbij de sensitiviteit van de auramine kleuring voor de verschillende respiratoire staaltypes onderling werd onderzocht. Een studie van Prakash et al. (2016) bij sputum negatieve patiënten met vermoeden van pulmonale tuberculose toont aan dat de sensitiviteit van de auramine kleuring van geïnduceerd sputum gelijkwaardig is aan deze van BAL-vocht.<sup>25</sup> De auramine kleuring op BAL-vocht daarentegen is volgens een andere Indische studie (Bodal, 2015) duidelijk gevoeliger voor het aantonen van *M. tuberculosis* dan deze op bronchusaspiraatsputum.<sup>12</sup>

Tabel 10: Absolute/relatieve aantal respiratoire stalen met positieve/negatieve auramine 2015-2018

|        |                        | Aantal auramine kleuringen | Auramine positief |        | Auramine negatief |         |
|--------|------------------------|----------------------------|-------------------|--------|-------------------|---------|
| 2015   | Respiratoir            | 1985                       | 48                | (2,4%) | 1937              | (97,6%) |
|        | Bronchusaspiraatsputum | 1086                       | 14                | (1,3%) | 1072              | (98,7%) |
|        | Sputum                 | 555                        | 27                | (4,9%) | 528               | (95,1%) |
|        | BAL                    | 344                        | 7                 | (2,0%) | 337               | (98,0%) |
| 2016   | Respiratoir            | 2267                       | 73                | (3,2%) | 2194              | (96,8%) |
|        | Bronchusaspiraatsputum | 1208                       | 13                | (1,1%) | 1195              | (98,9%) |
|        | Sputum                 | 668                        | 46                | (6,9%) | 622               | (93,1%) |
|        | BAL                    | 391                        | 14                | (3,6%) | 377               | (96,4%) |
| 2017   | Respiratoir            | 2396                       | 48                | (2,0%) | 2348              | (98,0%) |
|        | Bronchusaspiraatsputum | 1224                       | 8                 | (0,6%) | 1170              | (99,4%) |
|        | Sputum                 | 737                        | 32                | (4,3%) | 705               | (95,7%) |
|        | BAL                    | 435                        | 8                 | (1,8%) | 427               | (98,2%) |
| 2018   | Respiratoir            | 2345                       | 40                | (1,7%) | 2305              | (98,3%) |
|        | Bronchusaspiraatsputum | 1177                       | 7                 | (0,6%) | 1170              | (99,6%) |
|        | Sputum                 | 784                        | 25                | (3,2%) | 759               | (96,8%) |
|        | BAL                    | 384                        | 8                 | (2,1%) | 376               | (97,9%) |
| Totaal | Respiratoir            | 8993                       | 209               | (2,3%) | 8784              | (97,7%) |
|        | Bronchusaspiraatsputum | 4695                       | 42                | (0,9%) | 4653              | (99,1%) |
|        | Sputum                 | 2744                       | 130               | (4,7%) | 2614              | (95,3%) |
|        | BAL                    | 1554                       | 37                | (2,4%) | 1517              | (97,6%) |

Conclusie GZA KPI 2:

- Percentage positieve auramine kleuringen toont weinig variatie over periode 2015-2018.
- Geen acties noodzakelijk. Evolutie verder op te volgen.

2.1.4 KPI 3 en KPI 4: Sensitiviteit en specificiteit van de auramine kleuring (correlatie met kweek)

| KPI | Berekening   | Richtwaarde  |                          |
|-----|--|--|--------------------------|
| 3   | Correlatie positieve auramine met positieve kweek<br>= Sensitiviteit van auramine kleuring | Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal kweken positief voor MTC<br>Aantal positieve auramine kleuringen / Totaal aantal kweken positief voor NTM | MTC: 30-70%<br>MTC > NTM |
| 4   | Correlatie kweek met positieve auramine<br>= Specificiteit van auramine kleuring           | Aantal positieve auramine kleuringen met positieve kweek voor MTC + NTM / Totaal aantal kweken met positieve auramine kleuring (ongeacht kweekresultaat)       | 90-98%                   |

Het aantal en percentage positieve mycobacteriële kweken van 2018 met positieve en negatieve auramine kleuring wordt weergegeven in tabel 11

Tabel 11: Aantal en percentage positieve MTC/NTM kweken met positieve versus negatieve auramine

|                        | Positieve kweek voor MTC |                   |                   | Positieve kweek voor NTM |                   |                   |
|------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|
|                        | Aantal                   | Auramine positief | Auramine negatief | Aantal                   | Auramine positief | Auramine negatief |
| Respiratoir totaal     | 41                       | 30 (73,2%)        | 11 (26,8%)        | 42                       | 1 (2,4%)          | 41 (97,6%)        |
| Bronchusaspiraatsputum | 10                       | 7 (70,0%)         | 3 (30,0%)         | 28                       | 0                 | 28 (100%)         |
| Sputum                 | 21                       | 15 (71,4%)        | 6 (28,6%)         | 11                       | 1 (9,1%)          | 10 (90,9%)        |
| BAL                    | 10                       | 8 (80,0%)         | 2 (20,0%)         | 3                        | 0                 | 3 (100%)          |
| Urine                  | 0                        | n.v.t.            | n.v.t.            | 0                        | n.v.t.            | n.v.t.            |
| Punctievocht           | 6                        | 1 (16,7%)         | 5 (83,3%)         | 0                        | n.v.t.            | n.v.t.            |
| Overige                | 8                        | 0                 | 8 (100%)          | 0                        | n.v.t.            | n.v.t.            |
| Totaal 2018            | 55                       | 31 (56,4%)        | 24 (43,6%)        | 42                       | 1 (2,4%)          | 41 (97,6%)        |

Als we kijken naar de sensitiviteit van de auramine kleuring bij positieve MTC kweken lag deze met 56,4% in 2018 volledig in lijn met de opgegeven richtwaarde van CLSI. De sensitiviteit van de auramine kleuring in GZA voor NTM isolaten bedroeg 2,4%. Een auramine kleuring van sputumstalen is meestal pas positief indien de minimale concentratie van  $10^4$  mycobacteriën per mL staal wordt overschreden. Isolatie van NTM species door contaminatie vanuit de omgeving gaat veelal gepaard met een veel lagere mycobacteriële load waardoor deze species niet aantoonbaar zijn via auramine kleuring. Zo toonde een studie van Debrunner, Salfinger, Brändli en von Graevenitz (1992) aan dat klinisch significante isolatie van NTM species in 44% van de gevallen gepaard ging met een positieve auramine, indien de isolatie echter als niet significant werd beschouwd was de auramine slechts positief in 2% van de stalen.<sup>1</sup> Als we gedurende de periode 2015-2018 voor de gevoeligheid van de auramine kleuring rekening hielden met de klinisch relevantie van NTM isolatie uit respiratoire stalen, gedefinieerd volgens de ATS/IDSA criteria (zie deel 3), dan bekwamen we in GZA gelijkaardige resultaten. Bij klinisch significante isolatie van NTM species uit respiratoire stalen bedroeg de sensitiviteit van de auramine kleuring 57% en bij niet significante isolatie slechts 2% (zie tabel 12).

Tabel 12: Sensitiviteit van auramine kleuring bij NTM species in functie van klinische relevantie

| NTM species              | Klinische relevantie volgens ATS/IDSA | Positieve auramine bij aanwezigheid van ATS/IDSA longziekte | Positieve auramine bij afwezigheid van ATS/IDSA longziekte |
|--------------------------|---------------------------------------|---|--|
| <i>M. avium</i> complex  | 17/70                                 | 7/17 (41%)  | 1/53   |
| <i>M. avium</i>          | 11/42                                 | 5/11 (45%)  | 1/31   |
| <i>M. intracellulare</i> | 1/13                                  | 1/1 (100%)  | 0/12   |
| <i>M. chimaera</i>       | 5/16                                  | 1/5 (20%)   | 0/11   |
| <i>M. kansasii</i>       | 2/10                                  | 2/2 (100%)  | 0/8  |
| <i>M. xenopii</i>        | 4/8                                   | 4/4 (100%)  | 0/4  |
|                          |                                       | 13/23 (57%)   | 1/65 (2%)  |

De lagere gevoeligheid van de auramine kleuring voor NTM species is deels ook te wijten aan het feit dat sommige snelgroeiende species zuur variabel zijn en dus niet altijd aantoonbaar zijn met behulp van de auramine kleuring.<sup>4,34</sup>

Tabel 13: Specificiteit van de auramine kleuring berekend per staaltype

|                        | Positieve auramine Kweek positief | Positieve auramine Kweek positief of negatief | Specificiteit |
|------------------------|-----------------------------------|---|---------------|
| Respiratoir totaal     | 30                                | 31  | 96,8%         |
| Bronchusaspiraatsputum | 7                                 | 7   | 100%          |
| BAL                    | 15                                | 16  | 93,8%         |
| Urine                  | 8                                 | 8   | 100%          |
| Punctievocht           | 0                                 | 0   | n.v.t.        |
| Overige                | 1                                 | 1   | 100%          |
| Overige                | 0                                 | 0   | n.v.t.        |
| Totaal 2018            | 31                                | 32  | 96,9%         |

De specificiteit van de auramine kleuring bedroeg 96,9% in 2018 en zelfs 100% na exclusie van follow-up stalen van patiënten onder therapie (zie tabel 13). In 2018 was er 1 sputumstaal waarbij op auramine kleuring zuurvaste bacillen te zien waren, deze konden echter niet via kweek aangetoond worden. Bij nader onderzoek bleek het om een gekende tuberculose patiënt te gaan waarbij reeds een behandeling werd opgestart.

#### Conclusie GZA KPI 3 en 4:

- Sensitiviteit auramine kleuring t.o.v. kweek lag voor MTC in 2018 met 56,4% binnen verwachte grenzen.
- Sensitiviteit auramine kleuring t.o.v. kweek laag is laag voor NTM. Bij klinisch relevante isolatie van NTM species ligt de sensitiviteit met 57% beduidend hoger dan bij niet klinisch relevante isolatie (2%).
- Specificiteit auramine kleuring t.o.v. kweek zowel voor MTC als NTM binnen verwachte grenzen.

2.1.5 KPI 5, KPI 6 en KPI 7: Aantal en percentage positieve kweken met isolatie van *Mycobacterium tuberculosis* versus niet-tuberculeuze mycobacteriën

| KPI | Berekening  | Richtwaarde  |
|-----|---|--|
| 5   | Aantal en percentage positieve mycobacteriële kweken                  | Aantal positieve mycobacteriële kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken |
| 6   | Aantal en percentage <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex kweken | Aantal positieve MTC kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken            |
| 7   | Aantal en percentage positieve atypische mycobacteriële of NTM kweken | Aantal positieve NTM kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken            |

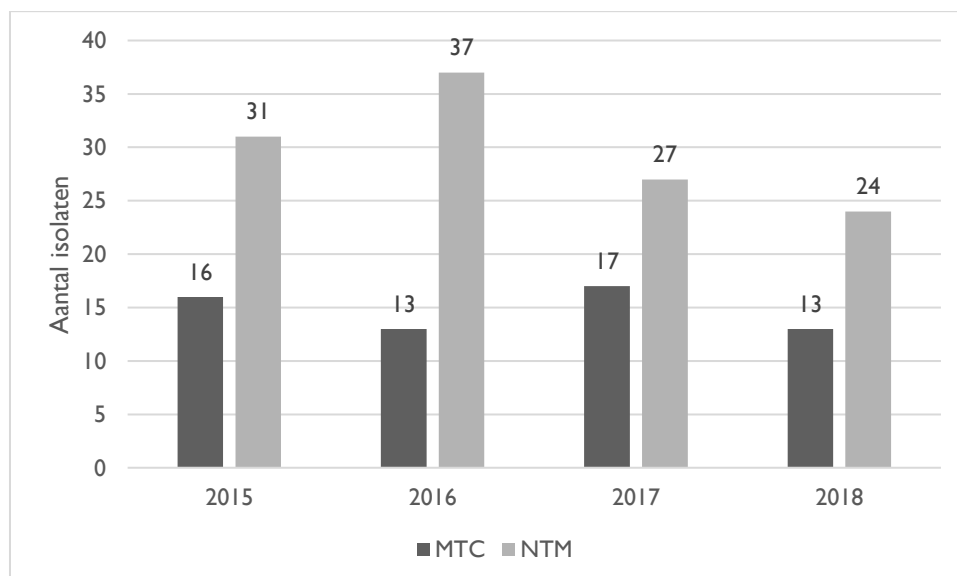
Het aantal en percentage positieve kweken met isolatie van *Mycobacterium tuberculosis* complex en niet-tuberculeuze mycobacteriën voor 2018 staat samengevat in tabel 14.

Tabel 14: Aantal en percentage positieve mycobacteriële kweken met isolatie van MTC vs. NTM voor 2018

|                    | Aantal kweken | Positieve kweken | <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex | Niet-tuberculeuze Mycobacteriën |
|--------------------|---------------|------------------|---|---------------------------------|
| Respiratoir        | 2252          | 83 (3,7%)        | 41 (49,4%)                                | 42 (50,6%)                      |
| Bronchusaspiraats  | 1174          | 38 (3,2%)        | 10 (26,3%)                                | 28 (73,7%)                      |
| Sputum             | 715           | 32 (4,5%)        | 21 (65,6%)                                | 11 (24,4%)                      |
| BAL                | 363           | 13 (3,6%)        | 10 (76,9%)                                | 3 (23,1%)                       |
| Urine              | 50            | 0                | 0   | 0                               |
| Punctievochten     | 267           | 6 (2,2%)         | 6 (100%)                                  | 0                               |
| Overige staaltypes | 241           | 8 (3,3%)         | 8 (100%)                                  | 0                               |
| Totaal 2018        | 2810          | 97 (3,5%)        | 55 (56,7%)                                | 42 (43,3%)                      |

Het aantal positieve respiratoire kweken in GZA met isolatie van *Mycobacterium tuberculosis* complex en niet-tuberculeuze mycobacteriën staat voor de periode 2015-2018 grafisch weergegeven in figuur 5.

Figuur 5: Aantal positieve MTC en NTM isolaten uit respiratoire stalen gedurende 2015-2018, met exclusie van follow-up stalen en *M. gordonae*



Hierbij hebben we een correctie gemaakt voor het meermaals kweken van hetzelfde isolaat bij dezelfde patiënt door follow-up stalen te excluseren. Verder wordt er hier bij de niet-tuberculeuze mycobacteriën geen

rekening gehouden met *M. gordonae* isolaten. Als we dan naar bovenstaande figuur kijken, valt het op dat er in GZA duidelijk meer NTM dan MTC uit respiratoire stalen werden geïsoleerd gedurende de laatste 4 jaar, wat volledig in lijn ligt met de nationale en internationale trend.<sup>27,29,31-33</sup>

Conclusie GZA KPI 5, 6 en 7:

- Lichte schommelingen in het aantal positieve kweken MTC en NTM zonder duidelijke trend. Verhouding NTM versus MTC in lijn met (inter)nationale epidemiologie
- Geen acties noodzakelijk. Evolutie verder op te volgen.

#### 2.1.6 KPI 8: Bacteriële contaminatiegraad

| KPI | Berekening  | Richtwaarde |
|-----|---|-------------|
| 8   | Bacteriële contaminatiegraad<br>Aantal gecontamineerde kweken / Totaal aantal ingezette mycobacteriële kweken | 5-10%       |

Zoals in het eerste deel besproken definiëren we in GZA de bacteriële contaminatiegraad als het aantal vals positieve MGIT's op het totaal aantal ingezette MGIT's vanuit gedecontamineerde, niet-steriele stalen. Voor het berekenen van de contaminatiegraad gedurende periode 2015-2018 werden enkel ingezette kweken vanuit respiratoire stalen geïncubeerd. De herkomst van de overige staaltypes werd immers niet standaard gelogd, waardoor het onduidelijk was welke stalen gedecontamineerd werden en welke niet. Gedurende de periode 2015-2018 vertegenwoordigden de respiratoire stalen in ons labo ongeveer 90% van de mycobacteriële kweken ingezet vanuit niet-steriel stalen. De bacteriële contaminatiegraad die werd berekend op basis van deze staaltypes, kan dus gebruikt worden als richtwaarde voor de ware contaminatiegraad (zie tabel 15).

Tabel 15: Bacteriële contaminatiegraad in GZA berekend op basis van kweekresultaten van respiratoire stalen gedurende 2015-2018

|      |                        | Aantal MGIT's | Aantal VP MGIT's | Bacteriële contaminatiegraad |
|------|------------------------|---------------|------------------|------------------------------|
| 2015 | Bronchusaspiraatsputum | 1086          | 116              | 10,7%                        |
|      | Sputum                 | 555           | 146              | 26,3%                        |
|      | BAL                    | 344           | 16               | 4,7%                         |
|      | Totaal Respiratoir     | 1985          | 278              | 14,0%                        |
| 2016 | Bronchusaspiraatsputum | 1208          | 94               | 7,8%                         |
|      | Sputum                 | 665           | 117              | 17,6%                        |
|      | BAL                    | 391           | 8                | 2,1%                         |
|      | Totaal respiratoir     | 2264          | 219              | 9,7%                         |
| 2017 | Bronchusaspiraatsputum | 1221          | 59               | 4,8%                         |
|      | Sputum                 | 689           | 108              | 15,7%                        |
|      | BAL                    | 431           | 6                | 1,4%                         |
|      | Totaal respiratoir     | 2341          | 173              | 7,4%                         |
| 2018 | Bronchusaspiraatsputum | 1174          | 103              | 8,8%                         |
|      | Sputum                 | 715           | 135              | 18,9%                        |
|      | BAL                    | 363           | 11               | 3,0%                         |
|      | Totaal Respiratoir     | 2252          | 249              | 11,1%                        |

VP: vals positief

Als we kijken naar bovenstaande resultaten lag de bacteriële contaminatiegraad in GZA in 2018 met 11,1% boven de vooropgestelde grens van 10%. Ook in 2015 lag de bacteriële contaminatiegraad in GZA met 14,0% ver boven deze limiet. Deze cijfers wijzen dus op een suboptimale mycobacteriële diagnostiek en vereisen concrete actie.

Het meermaals overschrijden van de 10% bij de bacteriële contaminatiegraad kan zoals in het eerste deel van deze CAT werd besproken, te wijten zijn aan een te zwakke decontaminatieprocedure. Veelal echter kan de oorzaak pre-analytisch gevonden worden in slechte afname-, transport- en bewaarcondities van stalen voor mycobacteriële diagnostiek. Het wel halen van de grens van 10% in 2016 (bacteriële contaminatiegraad van 9,7%) en 2017 (bacteriële contaminatiegraad van 7,4%), samen met het feit dat onze decontaminatieprocedure



gedurende de periode 2015-2018 niet werd gewijzigd, wijst ook eerder in de richting van een pre-analytische oorzaak. Educatie van zorgverleners en patiënten lijkt ons dan ook de belangrijkste te ondernemen actie.<sup>31</sup>

Om bacteriële overgroei te beperken en een zo hoog mogelijke mycobacteriële opbrengst te garanderen, is het zeer belangrijk om strikte afname, transport en bewaarcondities te formuleren voor stalen waarop mycobacteriële diagnostiek wordt uitgevoerd. In tabel 16 staan de belangrijkste pre-analytische aandachtspunten opgesomd per staaltype, evenals de mogelijke corrigerende acties die genomen kunnen worden indien hiervan afgeweken wordt. Men raadt concreet aan om alle stalen te verwerken. Indien de kwaliteit van het aangeboden staal suboptimaal is, dient de arts/patiënt hierover geïnformeerd te worden. Dit met het oog op het ontvangen van een nieuw staal en/of om gelijkaardige fouten in de toekomst te vermijden.<sup>1-3</sup> In GZA zullen we de arts informeren over de suboptimale staalkwaliteit voor mycobacteriële diagnostiek door het toevoegen van standaardcommentaren aan het rapport.

Tabel 16: Belangrijkste pre-analytische foutenbronnen per staaltype met preventieve en corrigerende acties

| Staaltype                      | Pre-analytische foutenbronnen (afname, transport en bewaring)  | Mogelijke preventieve en corrigerende acties   |
|--------------------------------|--|--|
| Sputum                         | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Staalcollectie: sputum (geen speeksel of nasofaryngeale afscheidingen) + steriel!</li> <li>- Volume: idealiter 5-10mL, minimum 3 mL</li> <li>- Transport op kamertemperatuur</li> <li>- Indien niet binnen 1u getransporteerd: gekoeld bewaren (koelkast)</li> <li>- Maximum 3 stalen per patiënt met minstens 8-24u tussen, waarvan minstens 1 ochtendsputum</li> <li>- Stalen niet poolen!</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Correcte instructies aan patiënt omtrent sputumcollectie en bewaring</li> <li>- Uitzicht staal rapporteren met toevoegen van commentaar indien kwaliteit suboptimaal</li> <li>- Indien &lt;3 mL staal toevoegen van commentaar: 'resultaat onder voorbehoud: minder dan 3 mL staal ontvangen'</li> </ul>                              |
| Bronchus aspiraat en BAL vocht | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume: minimum 3 mL</li> <li>- Transport op kamertemperatuur</li> <li>- Indien niet binnen 1u getransporteerd: gekoeld bewaren (koelkast)</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indien &lt;3 mL staal toevoegen van commentaar: 'resultaat onder voorbehoud, minder dan 3 mL staal ontvangen'</li> </ul>  |
| Urine                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Staalcollectie: verse ochtendurine</li> <li>- Midstream afgenomen, anders via katheter</li> <li>- Volume: minimum 10-15 mL</li> <li>- Geen bewaarmiddelen</li> <li>- Transport op kamertemperatuur</li> <li>- Indien niet binnen 1u getransporteerd: gekoeld bewaren (koelkast)</li> <li>- Maximum 3 opeenvolgende ochtendstalen per patiënt</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Urinecollecties, stalen met bewaarmiddelen worden beantwoord met commentaar: 'geen geschikt staal ontvangen'</li> <li>- Indien staal in NM op labo toekomt toevoegen van commentaar: 'kweek bij voorkeur op verse ochtendurine'</li> </ul>  |
| CSV                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Volume: idealiter 10 mL, minimum 2 mL</li> <li>- Aparte collectie voor celtelling en biochemie</li> <li>- Transport en bewaring op kamertemperatuur</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indien &lt;2 mL staal toevoegen van commentaar: 'resultaat onder voorbehoud, minder dan 2 mL staal ontvangen'</li> </ul>  |
| Maagvocht                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collectie: 's morgens en nuchter, lavage met 25-50mL koud gesteriliseerd water</li> <li>- Volume: maximum 15 mL</li> <li>- Transport en bewaring op kamertemperatuur</li> <li>- Indien niet binnen 4u getransporteerd: neutralisatie met NaCO<sub>3</sub> binnen 1u na collectie noodzakelijk</li> <li>- Maximum 3 opeenvolgende ochtendstalen per patiënt</li> </ul>                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indien staal in NM op labo toekomt toevoegen van commentaar: 'kweek bij voorkeur op nuchter maagvocht'</li> <li>- Noteren van tijdstip van afname op staalrecept: indien &gt;1u na afname in labo en niet onmiddellijk geneutraliseerd toevoegen van commentaar: 'resultaat onder voorbehoud, staal niet tijdig ontvangen'</li> </ul> |
| Punctievocht                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collectie: strikte asepsis</li> <li>- Volume: idealiter 15 mL, minimum 2 mL</li> <li>- Transport op kamertemperatuur</li> <li>- Indien niet binnen 1u getransporteerd: gekoeld bewaren (koelkast)</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indien &lt;2 mL staal toevoegen van commentaar: 'resultaat onder voorbehoud, minder dan 2 mL staal ontvangen'</li> </ul>  |
| Biopsie (weefsel,              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Collectie: strikte asepsis</li> <li>- Onmiddellijk na afname in steriel recipiënt met</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Indien biopt droog opgestuurd toevoegen van commentaar:</li> </ul>  |

|                  |  |   |
|------------------|--|---|
| lymfeklier)      | - minimum 2-3 mL fysiologische zoutoplossing<br>- Transport: zo snel mogelijk op kamertemperatuur  | 'resultaat onder voorbehoud, staal niet in fysiologische zoutoplossing getransporteerd'   |
| Abces, wondvocht | - Collectie: voorkeur voor wondvocht of weefsel in fysiologische zoutoplossing<br>- Wissers: ESwab aanvaardbaar indien geen alternatief <sup>6</sup><br>- Transport op kamertemperatuur<br>- Indien niet binnen 1u getransporteerd: gekoeld bewaren (koelkast) | - Indien ontvangst van ESwab toevoegen commentaar: 'resultaat onder voorbehoud, kweek op wisser'<br>- Droge wissers of wissers anders dan ESwab worden beantwoord met commentaar: 'geen geschikt staal ontvangen' |

#### Conclusie GZA KPI 8:

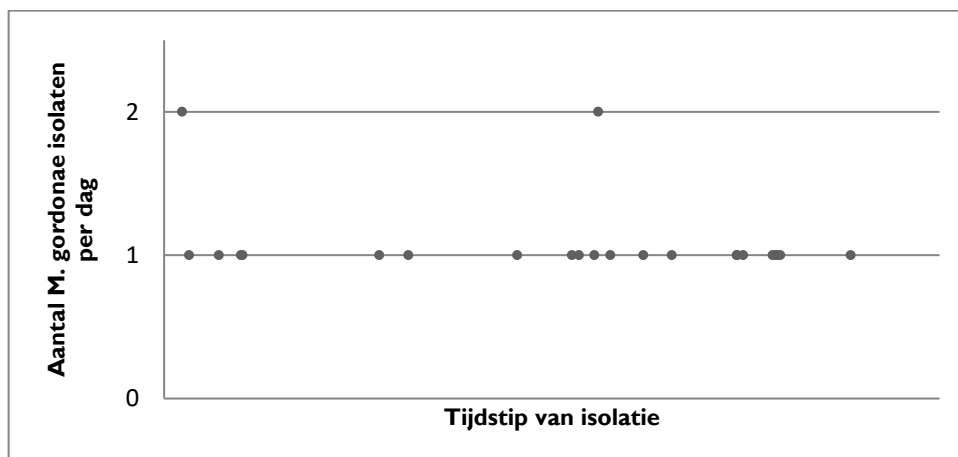
- Bacteriële contaminatieratio respiratoire monsters (voornamelijk voor sputa) duidelijk boven de aanvaardbare grens.
- Acties: Optimaliseren pre-analytische condities in samenwerking met de pneumologen in GZA.

#### 2.1.7 KPI 9: Monitoring van *M. gordonae*

| KPI  | Berekening  | Richtwaarde    |
|--|---|----------------|
| 9 Aantal en percentage <i>M. gordonae</i> isolaten | Aantal positieve <i>M. gordonae</i> kweken / Totaal aantal culturen positief voor NTM | Labo specifiek |

Gedurende de periode 2015-2018 werd *Mycobacterium gordonae* 42 maal geïsoleerd uit respiratoire stalen. Naast isolatie uit 6 sputumstalen, werd *M. gordonae* 36 keer geïsoleerd uit een bronchusaspiraaf of BAL-vocht, waarvan 30 stalen werden afgenomen op campus Sint-Augustinus (zie figuur 6).

Figuur 6: Isolatie *M. gordonae* uit bronchusaspiraten en BAL-vochten in campus Sint-Augustinus



Elk punt op de grafiek stelt een *M. gordonae* isolaat voor.  
De tijdlijn op de X-as loopt van januari 2015 tot november 2018.

Als we rekening houden met het tijdstip van *M. gordonae* isolatie in Sint-Augustinus vallen er twee zaken op:

- Dat er tweemaal 2 *M. gordonae* isolaten op eenzelfde dag werden teruggevonden. Het ging in beide gevallen om stalen verkregen via bronchusaspiraaf op dezelfde afdeling afgenomen.
- Dat de isolatie van *M. gordonae* geclusterd in de tijd voorkomt.

Als we echter kijken naar de fractie *M. gordonae* isolaten op het totaal aantal NTM isolaten in GZA gedurende de periode 2015-2018 zien we dat GZA met 21% volledig in lijn ligt met het Belgische gemiddelde.<sup>30</sup> Ook in de andere BILILU laboratoria werden gelijkaardige percentages bekomen (zie infra).

Conclusie KPI 9:

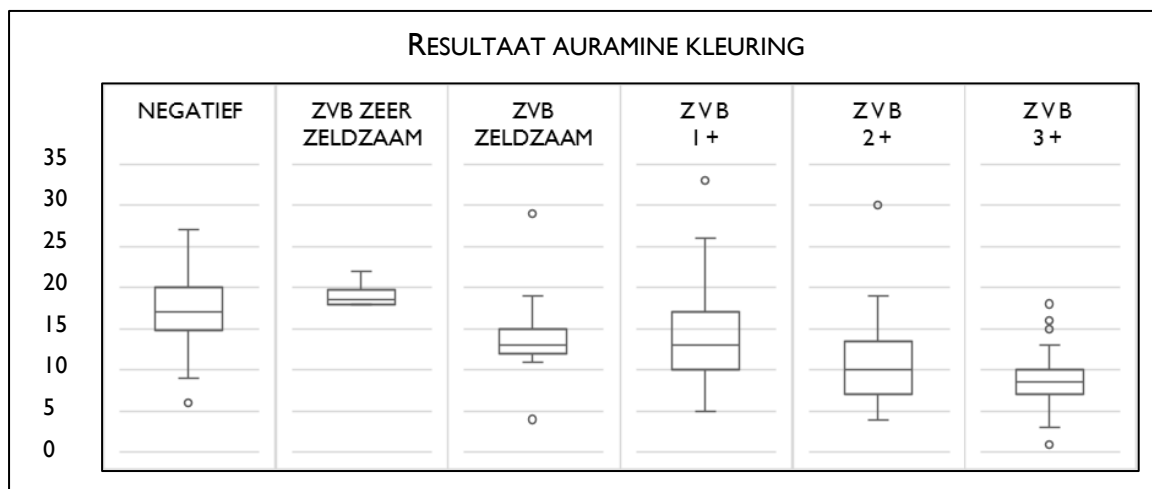
- Ratio *M. gordonae* isolaten t.o.v. andere NTM vergelijkbaar met nationale epidemiologie. Isolatie *M. gordonae* in clusters in GZA: gemeenschappelijke bron van contaminatie?
- Acties: Gedurende 1 jaar zullen alle bronchoscopenwasmachines tijdens de 3 maandelijks sterilitetscontrole gescreend worden op de aanwezigheid van *M. gordonae*.

#### 2.1.8 KPI 10: Gemiddelde tijd tot detectie voor *Mycobacterium tuberculosis* complex

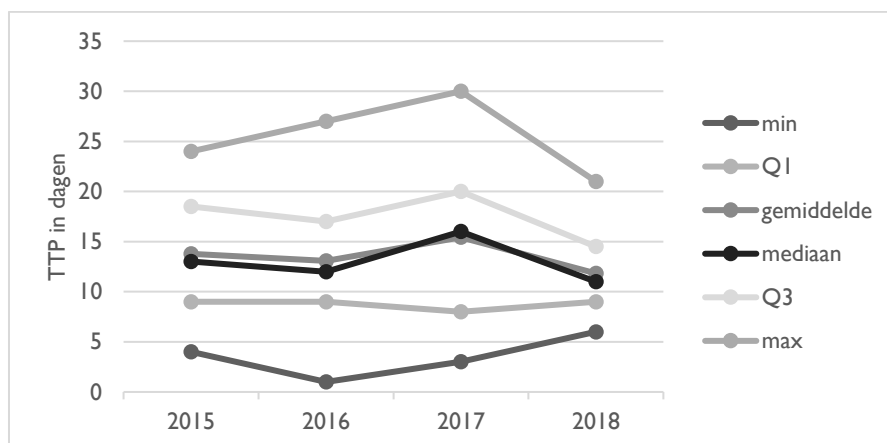
| KPI   | Berekening   | Richtwaarde                                    |
|---|--|--|
| 10 Gemiddelde tijd tot detectie voor MTC (in dagen) | TAT = tijdstip MGIT positief gevlagd op BACTEC MGIT systeem - tijdstip staalreceptie | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

De gemiddelde tijd tot positief worden van de MGIT flesjes op het BACTECT MIGT systeem voor respiratoire stalen die positief waren voor *Mycobacterium tuberculosis* complex gedurende de periode 2015-2018 staat in figuur 7 weergegeven in functie van het auramine resultaat. Van de 188 positieve respiratoire kweken voor MTC hadden 66 (35,1%) een negatieve auramine kleuring en 122 (64,9%) een positieve auramine kleuring. De gemiddelde tijd tot positief worden van de MGIT bij een negatieve auramine kleuring bedroeg 17 dagen, in tegenstelling tot gemiddeld 12 dagen bij een positieve auramine.

Figuur 7: Gemiddelde tijd tot detectie (dagen) van *Mycobacterium tuberculosis* complex in functie van het resultaat van de auramine kleuring in respiratoire stalen gedurende 2015-2018 in GZA



Figuur 8: Verschillen in detectietijd van *Mycobacterium tuberculosis* complex uit respiratoire stalen gedurende 2015-2018 in GZA



In figuur 8 staat voor de periode 2015-2018 de jaarlijkse detectietijd van *Mycobacterium tuberculosis* complex isolaten op het MGIT BACTEC systeem grafisch weergegeven. De gemiddelde tijd tot detectie, onafhankelijk van het auramine resultaat, varieerde van 12 dagen in 2018 tot 15 dagen in 2017.

De gemiddelde tijd tot positief worden van de MGIT bij NTM in respiratoire stalen gedurende de periode 2015-2018 kan in bijlage x per species worden teruggevonden.

Conclusie KPI 10:

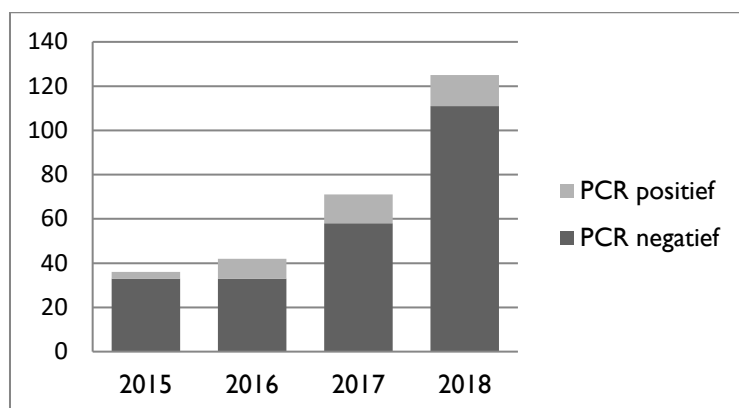
- Gemiddelde tijd tot detectie voor MTC blijft stabiel gedurende periode 2015-2018.
- Acties: Geen acties noodzakelijk. Evolutie verder op te volgen.

#### 2.1.9 KPI 11 en 12: Moleculaire mycobacteriële diagnostiek

| KPI   | Berekening   | Richtwaarde                                    |
|---|--|--|
| 11 Aantal MTC PCR aanvragen met aantal en percentage positieve resultaten | Aantal positieve MTC PCR aanvragen / Totaal aantal MTC PCR aanvragen   | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |
| 12 Correlatie MTC PCR met klassieke mycobacteriële kweek                  | Sensitiviteit, specificiteit, NPV en PPV van MTC PCR (klassieke mycobacteriële kweek resultaat ter referentie of gouden standaard) | Labo specifiek: richtwaarde zelf op te stellen |

Gedurende de periode 2015-2018 werden er op 274 stalen zowel een klassieke mycobacteriële kweek als *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) PCR uitgevoerd. Een opvallende vaststelling is de bijna verviervoudiging van MTC PCR aanvragen tussen 2015 en 2018 (zie figuur 9). Over de totale periode van 2015-2018 waren 14.2% van de MTC PCR resultaten positief.

Figuur 9: Aantal MTC PCR aanvragen met positief/negatief resultaat



|      | PCR positief | PCR negatief |
|------|--------------|--------------|
| 2015 | 3 (8%)       | 33 (92%)     |
| 2016 | 9 (21%)      | 33 (79%)     |
| 2017 | 13 (18%)     | 58 (82%)     |
| 2018 | 14 (11%)     | 111 (89%)    |

Voor het aantal MTC PCR aanvragen valt het af te wachten of de stijgende trend zich voortzet naar 2019. De fractie positieve PCR resultaten dient wel in dezelfde lijn te liggen met deze van de afgelopen jaren, en dan hoofdzakelijk deze van 2018 (11,2% positief, n=125).

Vermits de PCR minder gevoelig is voor het aantonen van *Mycobacterium tuberculosis* dan de klassieke kweek, wordt een MTC PCR idealiter steeds samen aangevraagd met een klassieke mycobacteriële kweek. In tabel 17 staan de voorlopige richtwaarden opgesomd op basis van de PCR/kweek resultaten gedurende de periode 2015-2018.

Tabel 17: Sensitiviteit, specificiteit en voorspellende waarde van een positieve en negatieve MTC PCR (met kweek als gouden standaard)

|               | Kweek positief <sup>f*</sup> | Kweek negatief <sup>f*</sup> | Totaal                   |
|---------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| PCR positief  | 31                           | 8 (6 <sup>**</sup> )         | 39 (37 <sup>**</sup> )   |
| PCR negatief  | 11                           | 224                          | 235                      |
| Totaal        | 42                           | 232 (230 <sup>**</sup> )     | 274 (272 <sup>**</sup> ) |
| Sensitiviteit | 73,8%                        |                              |                          |
| Specificiteit | 96,6% (98,4% <sup>**</sup> ) |                              |                          |
| PPV           | 79,5% (83,8% <sup>**</sup> ) |                              |                          |
| NPV           | 95,3%                        |                              |                          |

\* kweek positief/negatief voor *Mycobacterium tuberculosis* complex (NTM isolatie = kweek negatief)

\*\* exclusie 2 follow-upstalen van patiënten onder therapie

Als we kijken naar de literatuur, zien we dat sensitiviteit van specificiteit van onze MTC PCR in lijn ligt met de percentages die beschreven worden door Luetkemyer AF et al. (2016). Zij rapporteren een sensitiviteit en specificiteit tussen de 63.3%–88.0% en 97.0%–99.8% voor MTC PCR op niet voorbehandelde sputumstalen.<sup>21</sup>

Ter volledigheid hebben we voor de periode 2015-2018 onze PCR MTC resultaten en klassieke mycobacteriële kweekresultaten ook vergeleken met het resultaten van de auramine kleuring. Deze gegevens staan opgesomd in tabel 18, waarbij de correlatie tussen PCR en kweek staat uitgedrukt in functie van het auramine resultaat. Omdat onze PCR enkel *Mycobacterium tuberculosis* complex isolaten kan aantonen hebben we voor deze correlatie mycobacteriële kweken positief voor NTM geëxcludeerd.

Tabel 18: Correlatie tussen MTC PCR, klassieke kweek en auramine kleuring

|               | Kweek positief             |                   | kweek negatief             |                   |
|---------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------|
|               | Auramine positief          | Auramine negatief | Auramine positief          | Auramine negatief |
| PCR positief  | 26                         | 5                 | 1                          | 7                 |
| PCR negatief  | 1                          | 10                | 26                         | 186               |
| Sensitiviteit | Auramine positief<br>96,3% |                   | Auramine negatief<br>41,7% |                   |
| Specificiteit | 96,3%                      |                   | 94,9%                      |                   |
| PPV           | 96,3%                      |                   | 33,3%                      |                   |
| NPV           | 96,3%                      |                   | 96,4%                      |                   |

Concreet waren er gedurende 2015-2018 in GZA 8 stalen met positieve PCR (1 met positieve auramine, 7 met negatieve auramine) waarbij de MGIT negatief bleef. Het ging bij deze 8 stalen telkens om een vals negatieve kweek en niet om een vals positief PCR resultaat (zie bijlage 3). Bij een negatieve auramine kleuring ligt de gevoeligheid van onze PCR met 41,7% beduidend lager dan met een positieve auramine kleuring (sensitiviteit van 96,3%). Als we kijken naar de literatuur ligt de sensitiviteit van de MTC PCR tussen 88,8% - 99,1% bij een positieve auramine kleuring en tussen 40.7% - 75.5% bij een negatieve auramine kleuring.<sup>21</sup>

Conclusie KPI 11 en 12:

- Belangrijke toename van het aantal PCR testen vermoedelijk kaderend in gewijzigde terugbetaling en toenemende bekendheid van deze test. Positiviteitsratio blijft stabiel de laatste 3 jaar.
- Sensitiviteit 73,8%, specificiteit 98,4%, PPV 83,8% en NPV 95,3% t.o.v. kweek in 2018: binnen verwachte grenzen.
- Acties: Geen acties noodzakelijk. Evolutie verder op te volgen.

#### 2.1.10 Kwaliteitsindicatoren voor laboratoriumdiagnostiek: ervaring vanuit BILULU samenwerking

Om een idee te krijgen hoe andere microbiologische laboratoria in Vlaanderen omgaan met kwaliteitsbewaking bij de laboratoriumdiagnostiek van mycobacteriën, hebben we aan de laboratoria in het BILULU samenwerkingsverband gevraagd om een korte vragenlijst in te vullen. De resultaten hiervan zijn terug te vinden in bijlage 4.

### 3 Literatuurstudie omtrent klinische relevantie meest frequent geïsoleerde atypische mycobacteriën in GZA gedurende 2015-2018

#### 3.1 Niet-tuberculeuze mycobacteriën: epidemiologie

De term NTM of atypische mycobacteriën wordt gebruikt voor alle mycobacteriën niet behorende tot het *Mycobacterium tuberculosis* complex én met uitzondering van *M. leprae* en *M. lepromatosis*, welke lepra kunnen veroorzaken. De NTM zijn alom vertegenwoordigd in onze omgeving (bodem, water, planten), waardoor er bij isolatie vaak geen eenduidig onderscheid gemaakt kan worden tussen contaminatie, kolonisatie en infectie.<sup>5,14</sup>

Ondanks dat er geen meldingsplicht bestaat voor NTM in België, zijn er duidelijke argumenten voor een toenemende prevalentie van klinisch relevante NTM infecties. Zo merken we dat het aantal geïsoleerde NTM uit klinische stalen de laatste jaren fors is toegenomen. Deze toename kan natuurlijk deels toegeschreven worden aan de verbeterde laboratoriumdiagnostiek van deze vroeger moeilijk kweekbare kiemen. Maar ook in andere ontwikkelde landen wordt er een gelijkaardige trend, namelijk een stijging van NTM infecties gepaard gaande met een lichte daling van *Mycobacterium tuberculosis* infecties, waargenomen.<sup>6,10,27,29,31-33</sup>

Onderstaande tabel geeft overzichtelijk de meest beschreven risicofactoren voor het ontwikkelen van NTM infecties weer, globaal wordt er hierbij een onderscheid gemaakt tussen gastheer gerelateerde risicofactoren en risicofactoren door een verhoogde blootstelling en gevoeligheid aan NTM in de omgeving.

Tabel 19: Risicofactoren voor ontwikkelen van NTM infecties<sup>5,6,9,10</sup>

|   |
|---|
| 1. Verhoogde blootstelling/gevoeligheid aan NTM in de omgeving  |
| 1.1. Blootstelling o.a. bij zwemmen, tuinieren, aquariums houden, gebruik van sauna's, ...  |
| 1.2. Gevoeligheid: daling van <i>Mycobacterium tuberculosis</i> infecties zou aanleiding geven tot verminderde immuniteit tegen NTM.  |
| 2. Gastheer gerelateerde factoren   |
| 2.1. Onderliggend longlijden: NTM infecties worden frequenter vastgesteld bij personen met chronische longaandoeningen zoals COPD, astma, $\alpha$ 1-antitrypsine deficiëntie, mucoviscidose en allergische bronchopulmonaire aspergillose. Chronische epitheelcel inflammatie en verminderde mucociliaire klaring worden hier als uitlokkende factoren weerhouden; |
| 2.2. Leeftijd, geslacht en BMI: Lady Windermere syndroom of NTM gerelateerde longaantasting die typisch wordt beschreven bij postmenopauzale, grote en magere vrouwen die niet roken.   |
| 2.3. Immuundeficiënties:  |
| 2.3.1. Verworven immuundeficiënties zoals HIV/AIDS, hairy cel leukemie en circulerende anti-interferon- $\gamma$ autoantistoffen;   |
| 2.3.2. Aangeboren immuundeficiënties die aanleiding geven tot een verstoorde immuunrespons met uitblijven van de typische granulomateuze ontstekingsreactie, bv. interferon- $\gamma$ receptor deficiëntie.   |
| 2.4. Medicatie:   |
| 2.4.1. Immunosuppressiva: gebruik van orale en inhalatiecorticosteroïden, anti-tumor necrosis factor- $\alpha$ therapie, combinatietherapie in kader van solide orgaantransplantatie, combinatietherapie bij hematologische stamceltransplantatie;  |
| 2.4.2. Inhalatie antibiotica, protonpomp inhibitors (beperkte evidentie).   |

### 3.2 NTM in respiratoire stalen: infectie, kolonisatie of contaminatie?

De klinische relevantie van NTM in respiratoire stalen is, in tegenstelling tot NTM isolatie uit normaal steriele compartimenten zoals lymfeklierbiopten of punctievochten, vaak moeilijk te achterhalen. Om dit probleem aan te pakken heeft de American Thoracic Society (ATS) in samenwerking met de Infectious Diseases Society of America (IDSA) in 2007 diagnostische criteria opgesteld op basis van klinische, radiologische en microbiologische gegevens (zie tabel 20).<sup>5</sup>

Tabel 20: ATS/IDSA criteria voor diagnose NTM longziekte (2007)

|   |
|---|
| <b>1. Klinisch/radiologisch</b>   |
| 1.1. <u>Pulmonale symptomen met nodulaire of cavitaire opaciteiten</u> op Rx Thorax, <u>of met multifocale bronchiëctasieën met multipele kleine noduli</u> op hoge resolutie CT (HRCT)<br>én<br>1.2. <u>Exclusie van andere diagnoses</u>  |
| <b>2. Microbiologisch</b>   |
| 2.1. Positieve culturen voor NTM van <u>minstens twee afzonderlijk afgenomen sputumstalen</u><br>of<br>2.2. Positieve cultuur voor NTM van <u>minstens één bronchoalveolair lavagevocht of bronchusaspiraatsputum</u><br>of<br>2.3. Transbronchiale of andere <u>longbiopsie met mycobacterieel histopathologisch uitzicht</u> (granulomateuze inflammatie of aanwezigheid zuurvaste bacillen) <u>met corresponderende positieve kweek voor NTM</u> of met minstens één <u>positieve sputumkweek of BAL-vocht/bronchusaspiraatsputum kweek voor NTM</u> |
| Bovendien wordt aangeraden om bijkomende expertise in te roepen bij isolatie van NTM die gewoonlijk als contaminatie worden beschouwd of bij zeldzaam geïsoleerde types.  |
| Patiënten verdacht voor NTM longziekte, maar die niet voldoen aan bovenstaande criteria, dienen strikt opgevolgd te worden totdat diagnose definitief gesteld of uitgesloten kan worden.  |
| De diagnose van NTM longziekte leidt niet noodzakelijk tot opstart van therapie. Het al dan niet opstarten van therapie dient een weloverwogen beslissing te zijn waarbij voor- en nadelen worden afgewogen voor de individuele patiënt.  |

Bron: Griffith et al. (2007)

Om gebruik te kunnen maken van deze criteria dient de patiënt dus uitgebreid te worden onderzocht met minimaal uitvoeren van Rx Thorax én indien deze normaal met bijkomende HRCT, en door afname en kweek van minstens 3 sputumstalen op afzonderlijke tijdstippen verkregen. Bovendien wordt duidelijk vermeld dat de diagnose NTM longziekte een uitsluitingsdiagnose is waarbij meer voor de hand liggende oorzaken van het longlijden eerst dienen te worden uitgesloten.

De ATS/IDSA criteria voor de diagnose van NTM longziekte worden inmiddels algemeen aanvaard, toch dienen er enkele kanttekeningen te worden gemaakt bij hun gebruik in de praktijk. Zo zijn de criteria gebaseerd op literatuuronderzoek en jarenlange ervaring omtrent het management van patiënten met chronisch longlijden én isolatie van *M. avium* complex (MAC), *M. kansasii* of *M. abscessus* uit respiratoire stalen. Bij isolatie van andere NTM species uit respiratoire stalen en/of bij patiënten in een andere klinisch setting (zonder onderliggend longlijden, bij mucoviscidose, ...) dienen deze criteria dus met enige omzichtigheid te worden geïnterpreteerd.<sup>3,5,6,32</sup>



Of er voor NTM in de respiratoire tractus zoiets bestaat als kolonisatie, blijft voor velen een punt van discussie. Onderscheid tussen echte kolonisatie en een indolent verlopende of zeer traag progressieve infectie valt immers enkel te maken op basis van een invasief histopathologisch onderzoek (afwezigheid van longschade), wat in de praktijk vaak niet wordt uitgevoerd. Door de toegenomen gevoeligheid van de huidige beeldvormingsmodaliteiten (met introductie van HRCT), worden er bovendien steeds vaker reeds subtiele afwijkingen gevonden in de longen van asymptomatische NTM dragers.<sup>5,8,10</sup>

De mogelijkheid van contaminatie dient bij elke isolatie van NTM uit een niet-steriel staal te worden overwogen. Bij respiratoire stalen kan men hiervoor gebruik maken van bovenstaande ATS/IDSA criteria. Los van deze criteria, wordt het risico op contaminatie ook bepaald door de identiteit van het NTM species met het daaraan verbonden intrinsiek pathogeen vermogen. Zo kunnen de meeste isolaten van *M. gordonae* en *M. mucogenicum* uit respiratoire stalen als contaminant beschouwd worden.<sup>1,3,6,32-33</sup>

### 3.3 Klinische presentatie van NTM infectie

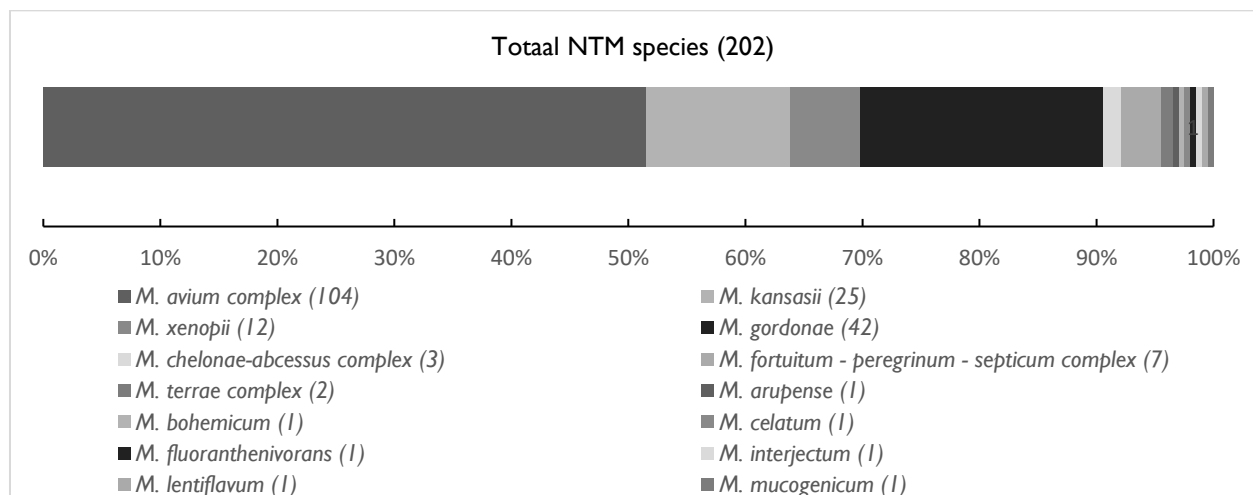
Niet-tuberculeuze mycobacteriën kunnen aanleiding geven tot verschillende ziektebeelden bij de patiënt. Deze klinische presentaties kunnen worden ingedeeld in 5 grote fenotypes waarvan fenotype I nog verder wordt opgesplitst naargelang het type van longaantasting en de aanwezigheid van onderliggend longlijden.<sup>1,3,8,33</sup>

- Onder fenotype IA verstaan we de klassieke NTM longziekte met fibrocavitaire aantasting, welke voornamelijk wordt gezien bij rokende patiënten met onderliggend longlijden zoals COPD of longemfyseem.
- Bij patiënten met mucoviscidose kunnen NTM aanleiding geven tot een nodulair-bronchiëctatische longaantasting. Deze NTM longziekte wordt fenotype IB genoemd en wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door *Mycobacterium abscessus* en kiemen van het *Mycobacterium avium* complex.
- Ook bij niet muco-patiënten kunnen NTM aanleiding geven tot nodulair-bronchiëctatische longziekte. Dit fenotype IC komt voor bij patiënten met reeds vooraf bestaande bronchiëctasieën.
- Fenotype II of het Lady Windermere syndroom wordt ook wel als idiopathische NTM-longziekte omschreven omwille van de afwezigheid van onderliggend longlijden zoals COPD of mucoviscidose bij deze patiënten. Ook hier veroorzaken de NTM een nodulair-bronchiëctatische longaantasting. De naam Lady Windermere verwijst naar een personage van Oscar Wilde en duidt op het karakteristieke voorkomen van deze patiënten. Deze vorm van NTM longziekte wordt immers vooral bij grote, magere postmenopauzale vrouwen gezien en wordt geassocieerd met de aanwezigheid van pectus excavatum, mitralis klep prolaps en scoliosis. Bovendien worden er bij deze patiënten vaak mutaties gevonden in het 'cystic fibrosis transmembrane conductance regulator'-gen of mucoviscidose gen.
- De zogenaamde 'hot tub lung' of hypersensitiviteitspneumonitis wordt geklasseerd als fenotype III. Deze chronische inflammatoire overgevoeligheidsreactie wordt zoals de naam doet vermoeden veelal gezien bij patiënten na blootstelling aan NTM in de context van een saunabezoek. Ook in de metaalbewerking industrie wordt dit type frequent beschreven waarbij de hypersensitiviteitspneumonie waarschijnlijk toe te wijten is aan de aanwezigheid van NTM in aerosols van de aldaar gebruikte vloeistoffen. De geïsoleerde NTM behoren meestal tot de snelgroeïende mycobacteriën of tot de traag groeiende MAC species.
- Bij patiënten met een ernstig gestoorde immuniteit kan een NTM longinfectie uitzaaien naar andere lichaamsdelen en aldaar infectie veroorzaken. Deze vorm van gedissemineerde NTM ziekte wordt als fenotype IV omschreven.
- Extra-pulmonale NTM-infecties, bijvoorbeeld huid en weke delen infecties, worden geklasseerd onder fenotype V.

### 3.4 Klinische relevantie van meest frequent geïsoleerde respiratoire NTM in GZA

Gedurende de periode 2015-2018, waren er 391 positieve mycobacteriële kweken vanuit respiratoire stalen (sputum, BAL en bronchusaspiraats). Hiervan behoorden 202 isolaten of 52% van het totaal aantal tot de atypische mycobacteriën of NTM. Meer dan de helft van onze geïsoleerde NTM species behoorden tot het *Mycobacterium avium* complex (*M. avium*, *M. intracellulare* en *M. chimaera*). Daarnaast werden ook *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopii* vrij frequent geïsoleerd in ons laboratorium (zie figuur 10 infra).

Figuur 10: Aantal NTM isolaten per species uit respiratoire stalen gedurende 2015-2018 in GZA



#### 3.4.1 *Mycobacterium avium* complex

Het *Mycobacterium avium* complex (MAC) omvat verschillende species waarvan de traag groeiende *M. avium*, *M. intracellulare* en *M. chimaera* species het frequentst geïsoleerd worden. De MAC species vormen samen met *M. kansasii* de belangrijkste bron van NTM gerelateerde ziekte wereldwijd. De sterke toename van het aantal pulmonale MAC isolaten in Engeland, Wales en Noord-Ierland wordt bovendien door Shah et al. (2016) de belangrijkste oorzaak van de toegenomen NTM incidentie aldaar over de periode 2007-2012 genoemd.<sup>29</sup>

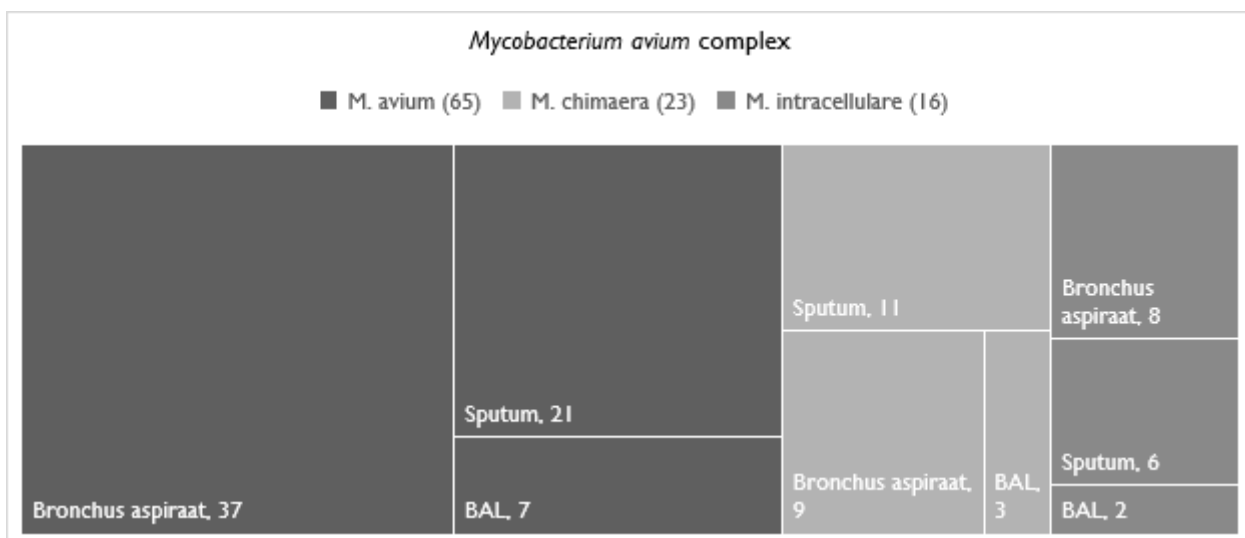
De MAC species geven in vergelijking met andere NTM species vaker aanleiding tot pulmonale infecties bij vrouwen. Op beeldvorming presenteren MAC infecties zich meestal onder de vorm van nodulaire-bronchiëctatische longaantasting, fibrocavitaire ziekte wordt minder frequent beschreven. Globaal heeft MAC longziekte een betere prognose dan andere NTM species gerelateerde longziekte, welke gedeeltelijk verklaard kan worden door het feit dat MAC species frequenter worden geïsoleerd uit respiratoire stalen van niet-rokende patiënten in afwezigheid van ernstig onderliggend longlijden.<sup>20</sup> De gerapporteerde klinische relevantie van MAC species uit respiratoire stalen varieert sterk tussen verschillende studies: gaande van 22% in Taiwan, 33% in Nederland tot 43% in de Verenigde Staten en zelfs 67% in Zuid-Korea.<sup>13,18,30,32</sup>

Identificatie tot op species niveau is aangewezen, aangezien er vanuit klinisch standpunt belangrijke verschillen worden beschreven tussen *M. avium*, *M. intracellulare* en *M. gordonae* isolaten. Zo toonden Koh et al. (2012) aan dat *M. intracellulare* in vergelijking met *M. avium* frequenter werd geïsoleerd bij oudere patiënten. *Mycobacterium intracellulare* gerelateerde longziekte gaf bovendien vaker aanleiding tot fibrocavitaire longaantasting. Globaal hadden patiënten met *M. intracellulare* isolatie een ernstiger en geavanceerder ziektebeeld bij diagnose, een slechtere respons op antimicrobiële therapie en een slechtere prognose.<sup>19</sup> Boyle et al. (2015) onderzochten de klinische relevantie en virulentie van de MAC species in de Verenigde Staten en kwamen tot de conclusie dat isolatie van *M. avium* en *M. intracellulare* vaker klinisch relevant was dan isolatie van *M. chimaera*, respectievelijk 61%, 70% en 43% van de patiënten voldeden aan de ATS/IDSA criteria voor NTM longziekte. Patiënten met *M. chimaera* longinfectie waren bovendien vaker immuun gecompromitteerd in vergelijking met de andere MAC

species.<sup>13</sup> Kim et al. (2017) voerden een gelijkaardig onderzoek uit in Zuid-Korea en kwamen tot gelijkaardige conclusies: 1) *M. avium* was met 54% van de MAC isolaten de best vertegenwoordigde kiem, 2) isolatie van *M. intracellulare* was in 72% van de gevallen klinische significant en 3) *M. chimaera* was de minst virulente kiem van MAC.<sup>18</sup> Meerdere studies hebben een link aangetoond tussen *Mycobacterium chimaera* isolatie uit respiratoire stalen en gecontamineerd kraantjeswater.<sup>1</sup> De klinische relevantie van *M. intracellulare* lag bij een Nederlandse studie door Van Ingen et al. (2009) met 13% beduidend lager dan de hierboven beschreven percentages van 70-72% in Zuid-Korea en de Verenigde Staten.<sup>13,18,31</sup> Dit opvallend verschil in klinische relevantie is vermoedelijk deels te wijten aan verschillen in geografische distributie van MAC subtypes.<sup>6,18,32</sup>

Er werden 104 MAC isolaten, afkomstig uit respiratoire stalen van 70 verschillende patiënten, opgekweekt in GZA gedurende de periode 2015-2018, met een gemiddelde time-to-positivity (TTP) van 14 dagen. *Mycobacterium avium* was met 65 isolaten bij 42 verschillende patiënten het best vertegenwoordigde MAC species en tevens het frequentst geïsoleerde NTM species in GZA (figuur 11).

Figuur 11: *Mycobacterium avium* complex in respiratoire stalen in GZA gedurende 2015-2018



De klinische relevantie van de MAC isolatie uit respiratoire stalen in GZA werd nagegaan door te kijken of deze patiënten voldeden aan de ATS/IDSA criteria voor NTM longziekte (zie supra). In tabellen 21, 22 en 23 staan de patiëntkarakteristieken van de klinisch relevante isolaten per MAC species opgesomd.

Tabel 21: Patiëntkarakteristieken *Mycobacterium avium* infectie in GZA volgens ATS/IDSA criteria

| n=11/42         | Kliniek                                  | Radiologisch                                      | Immuun status           | Onderliggend longlijden                                       | Co-infecties            | Roken | Outcome   |
|-----------------|--|---|-------------------------|---|-------------------------|-------|-----------|
| 86-jarige man   | Hoest, dyspnoe, atypische thoracale pijn | Cavitaire longaantasting                          | Immuun competent        | Neen  | Neen                    | Neen  | Overleden |
| 65-jarige man   | Koorts, nachtzweeten, hoest en dyspnoe   | Bronchiëctasieën en fibronodulaire longaantasting | Immuun gecompromitteerd | Ja, chronische asthmatische bronchitis                        | Bacterieel              | Ja    | Stabiel   |
| 61-jarige vrouw | Hoest, dyspnoe                           | Bronchiëctasieën                                  | Immuun gecompromitteerd | Ja, bronchiale hyperreactiviteit en recidiverende pneumonieën | Neen                    | Neen  | Stabiel   |
| 57-jarige vrouw | Dyspnoe                                  | Bronchiëctasieën                                  | Immuun competent        | Ja, pleurodese en recidiverende pneumonieën                   | Chronische HBV infectie | Neen  | Stabiel   |
| 88-jarige vrouw | Hoest                                    | Bronchiëctasieën                                  | Immuun competent        | Ja, recidiverende pneumonieën                                 | Bacterieel              | Neen  | Stabiel   |
| 93-jarige man   | Vermagering, vermoeidheid                | Bronchiëctasieën                                  | Immuun competent        | Neen  | Bacterieel              | Neen  | Stabiel   |
| 86-jarige man   | Dyspnoe, atypische thoracale pijn        | Bronchiëctasieën met multipole noduli             | Immuun competent        | Ja, astma bronchiale met longemfyseem                         | Neen                    | Neen  | Stabiel   |
| 45-jarige vrouw | Atypische thoracale pijn, vermoeidheid   | Bronchiëctasieën                                  | Immuun competent        | Ja, recidiverende pneumonieën                                 | Neen                    | Ja    | Stabiel   |
| 80-jarige man   | Hoest, koorts                            | Bronchiëctasieën met longemfyseem                 | Immuun competent        | Ja, COPD  | Neen                    | Neen  | Stabiel   |
| 67-jarige vrouw | Hoest, koorts                            | Bronchiëctasieën met multipole noduli             | Immuun gecompromitteerd | Ja, bronchiale hyperreactiviteit, CFTR mutatie                | Neen                    | Neen  | Stabiel   |
| 73-jarige vrouw | Atypische thoracale pijn                 | Bronchiëctasieën en cavitaire longaantasting      | Immuun gecompromitteerd | Neen  | Neen                    | Ja    | Stabiel   |

In totaal werden bij 11 van 42 patiënten met *M. avium* isolatie alle ATS/IDSA criteria voor NTM longziekte vervuld, wat neerkomt op een klinische significantie van 23%. Bij 8 patiënten met *M. avium* isolatie uit respiratoire stalen kon de klinische relevantie op basis van de ATS/IDSA criteria in twijfel worden getrokken en werd de kiem door de behandelende pneumoloog beschouwd als contaminatie. Verder ging één patiënt met isolatie van *M. avium* uit een bronchusaspiraats en bronchiëctasieën op beeldvorming verloren in follow-up waardoor de klinische relevantie van deze isolatie onduidelijk bleef. Bij 5 patiënten werd *M. avium* meermaals geïsoleerd uit respiratoire stalen. Beeldvorming toonde uitgebreide bronchiëctasieën en longemfyseem aan. Bij elke patiënt was er echter steeds een gelijktijdige andere longpathologie aanwezig waardoor deze isolatie uiteindelijk klinisch als niet relevant werd beschouwd door de behandelende arts.

Tabel 22: Patiëntkarakteristieken *Mycobacterium intracellulare* infectie in GZA volgens ATS/IDSA criteria

| n=1/13          | Kliniek | Radiologisch     | Immuun status    | Onderliggend longlijden           | Co-infecties | Roken | Outcome   |
|-----------------|---------|------------------|------------------|-----------------------------------|--------------|-------|-----------|
| 76-jarige vrouw | Hoest   | Bronchiëctasieën | Immuun competent | Ja, bronchiale hyper-reactiviteit | Bacterieel   | Neen  | Overleden |

In totaal voldeed slechts 1 van 13 patiënten met *M. intracellulare* isolatie aan alle ATS/IDSA criteria voor NTM longziekte, wat neerkomt op een klinische significantie van 8%. Deze casus wordt hieronder kort toegelicht gezien hij het gevaar illustreert van het langdurig miskennen van NTM relevantie.

Casus *M. intracellulare* infectie:

Reeds 6 jaar voor de uiteindelijke diagnose van atypische tuberculose bij deze patiënte werd *Mycobacterium intracellulare* voor de eerste maal geïsoleerd uit een respiratoir staal. Ondanks de opvallende aanwezigheid van bronchiëctasieën, klinische alarmsymptomen zoals hemoptoe en herhaaldelijke isolaties de jaren daaropvolgend, werd deze kiem echter als niet relevant beschouwd door de behandelende externe arts. Pas bij presentatie in ons ziekenhuis omwille van ernstige dyspnoe en na aantonen van zuurvaste bacillen in zowel sputum als bronchusaspiraats werd er uitgegaan van een atypische mycobacteriële infectie. De patiënte overleed een kleine maand later.

Tabel 23: Patiëntkarakteristieken *Mycobacterium chimaera* infectie in GZA volgens ATS/IDSA criteria

| n=5/16          | Kliniek                                   | Radiologisch             | Immuun status           | Onderliggend longlijden                         | Co-infecties | Roken | Outcome |
|-----------------|---|--------------------------|-------------------------|---|--------------|-------|---------|
| 78-jarige vrouw | Hoest, dyspnoe, vermagering, vermoeidheid | Bronchiëctasieën         | Immuun competent        | Ja, bronchiale hyper-reactiviteit, CFTR mutatie | Bacterieel   | Neen  | Stabiel |
| 64-jarige man   | Hoest, dyspnoe, vermagering               | Cavitaire longaantasting | Immuun gecompromitteerd | Ja, VG spinocellulair longCa                    | Aspergillose | Ja    | Stabiel |
| 60-jarige vrouw | Hoest, koorts, vermagering                | Bronchiëctasieën         | Immuun gecompromitteerd | Ja, astma bronchiale                            | Neen         | Neen  | Stabiel |
| 57-jarige vrouw | Hoest, hemoptoe                           | Polynodulaire massa      | Immuun competent        | Ja, astma bronchiale                            | Neen         | Neen  | Stabiel |
| 67-jarige vrouw | Hoest                                     | Bronchiëctasieën         | Immuun competent        | Ja, bronchiale hyper-reactiviteit               | Neen         | Neen  | Stabiel |

Bij *M. chimaera* voldeden 5 van de 16 patiënten aan de ATS/IDSA criteria, wat neerkomt op een klinische significantie van 31% (zie tabel 23).

In GZA was MAC isolatie uit respiratoire stalen dus slechts in 24% van de patiënten klinisch relevant, 11 van deze 17 patiënten of 65% behoorden tot het vrouwelijke geslacht. Bij het overgrote deel van deze patiënten was er sprake van een lokale of algemene verminderde immuniteit (15/17 of 88%). Radiologisch stond bronchiëctatische longaantasting op de voorgrond (14/17 patiënten), multiële noduli en cavitaire aantasting werden gezien bij respectievelijk 4 en 3 patiënten. Twee van de 17 patiënten kwam te overlijden ten gevolge van de NTM longziekte. Als we onze resultaten vergelijken met deze van een Nederlandse studie gepubliceerd door Van Ingen et al. (2009) zien we meerdere gelijkenissen. Zo ligt onze gevonden klinische relevantie van *Mycobacterium intracellulare* van 8% (1/13 patiënten) in lijn met hun gerapporteerde klinische relevantie van 13% (2/16 patiënten). Verder was *Mycobacterium avium* ook het meest frequent geïsoleerde NTM in Nederland en lag de totale klinische relevantie van MAC met 33% dicht bij onze gerapporteerde 24%. Ook qua outcome lagen onze bevindingen volledig in lijn met deze studie, namelijk een mortaliteit van 12% (2/17 patiënten) bij MAC longziekte in GZA versus 15% (4/26 patiënten) in de studie. Een opvallend verschil met deze studie is echter het type gerapporteerde longaantasting: in GZA was er een duidelijk overwicht van nodulair-

bronchiëctatische aantasting. Van Ingen et al. (2009) rapporteerden een overwicht van fibrocavitaire aantasting. Dit verschil kan verklaard worden door het feit dat slechts bij 50% van de patiënten met MAC isolatie in de Nederlandse studie een CT thorax werd uitgevoerd, in GZA lag dit aantal met 96% beduidend hoger.<sup>31</sup>

### 3.4.2 *Mycobacterium kansasii*

*Mycobacterium kansasii* infecties worden veelal in clusters gerapporteerd, zo ligt de incidentie van *M. kansasii* longziekte in Centraal-Europa veel hoger dan elders in het continent. Deze clustervorming heeft vermoedelijk te maken met het feit dat *M. kansasii* vooral in drinkwaterreservoirs wordt aangetroffen en minder in de omgeving. *Mycobacterium kansasii* longinfectie wordt gezien in alle leeftijdscategorieën, maar meer dan de helft van de patiënten is ouder dan 70 jaar bij diagnose. Bij meer dan 60% van de patiënten is er sprake van onderliggend longlijden waarvan een voorgeschiedenis van tuberculose of NTM-longziekte en COPD de belangrijkste zijn. De afwezigheid van onderliggend longlijden sluit *M. kansasii* infectie echter niet uit. *Mycobacterium kansasii* geeft veelal aanleiding tot fibrocavitaire longaantasting met een opvallende predilectie voor de bovenste longkwab. Vanuit klinisch en radiologisch standpunt is het onderscheid met klassieke longtuberculose hierdoor niet altijd mogelijk. *M. kansasii* longziekte heeft een zeer gunstige prognose met goede therapierespons. De gerapporteerde klinische relevantie van *M. kansasii* uit respiratoire stalen ligt algemeen zeer hoog: gaande van 44% in Taiwan, 50% in Kroatië/Israël, 52% in Zuid-Korea, 53% in Australië tot zelfs 71% in Nederland, 73% in het Verenigd Koninkrijk en 80% in Polen.<sup>11,17</sup>

In GZA werden er over de periode 2015-2018 vijftientig *Mycobacterium kansasii* isolaten geïdentificeerd, met een gemiddelde TTP van 18 dagen. Hierdoor is *M. kansasii* op MAC en *M. gordonae* na het frequentst geïsoleerde NTM in GZA. Deze isolaten waren afkomstig uit respiratoire stalen van 10 verschillende patiënten. Slechts twee van de tien patiënten voldeden aan de ATS/IDSA criteria voor NTM longziekte, beiden hadden een normale immuun status en werden succesvol behandeld.

Tabel 24: Patiëntkarakteristieken *Mycobacterium kansasii* infectie in GZA volgens ATS/IDSA criteria

| n=2/10          | Kliniek                        | Radiologisch                | Immuun status    | Onderliggend longlijden  | Co-infecties | Roken | Outcome |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------|--------------|-------|---------|
| 88-jarige vrouw | Hoest                          | Bronchiëctasieën met noduli | Immuun competent | Ja, small airway disease | Neen         | Neen  | Genezen |
| 43-jarige man   | Thoracale pijn en nachtzweeten | Cavitaire aantasting        | Immuun competent | Neen                     | Neen         | Ja    | Genezen |

Bij 5 patiënten met *M. kansasii* isolatie uit respiratoire stalen kon de klinische relevantie op basis van de ATS/IDSA criteria in twijfel worden getrokken. Zo voldeden 2 patiënten wel aan de radiologische en microbiologische criteria, maar werd er uitgegaan van kolonisatie gezien de gelijktijdige aanwezigheid van een bacteriële infectie. Verder waren er twee patiënten waarbij *M. kansasii* op twee separaat afgenomen sputumstalen werd teruggevonden, beiden gingen echter verloren in follow-up. Verder was er 1 patiënt waarbij *M. kansasii* pas in december 2018 werd geïsoleerd, radiologisch kon de relevantie nog niet worden gestaafd. Deze vijf patiënten hadden allen ernstig onderliggend longlijden (4/5 COPD en 1/5 extrinsiek astma). Als we rekening houden met deze vermoedelijke gevallen van NTM longziekte, komt de klinische relevantie van *M. kansasii* op 70% te liggen (wat wel in lijn ligt met gepubliceerde data uit Nederland en het Verenigd Koninkrijk).

### 3.4.3 *Mycobacterium xenopi*

*Mycobacterium xenopi* wordt frequent geïsoleerd uit klinische stalen in België en Europa en behoort tot de groep van de traag groeiende, chromogene mycobacteriën. Vijfenzeventig tot 90% van de pulmonale *M. xenopi* infecties vindt plaats bij mannen. Het merendeel van deze patiënten heeft onderliggende comorbiditeiten, waarvan chronisch obstructief longlijden de belangrijkste is. De cavitaire longaantasting bij pulmonale *M. xenopi* geeft vaak aanleiding tot co-infecties met filamenteuze fungi zoals *Aspergillus* species. Verder worden er ook co-

infecties met *Pneumocystis jiroveci* beschreven. Mede hierdoor zijn *M. xenopi* infecties geassocieerd met een hoge ziekte-gerelateerde mortaliteit. Langdurige behandeling met antimycobacteriële combinatietherapie, eventueel aangevuld met chirurgische resectie, kan de outcome gunstig beïnvloeden.<sup>15,26</sup>

In GZA werden er over de periode 2015-2018 twaalf *Mycobacterium xenopi* isolaten, met een gemiddelde TTP van 24 dagen, geïdentificeerd. Deze stalen waren afkomstig uit respiratoire stalen van 8 verschillende patiënten, waarvan de helft ook effectief werd behandeld. De karakteristieken van deze 4 patiënten met *M. xenopii* gerelateerde longziekte volgens de ATS/IDSA criteria staan hieronder samengevat.

Tabel 25: Patiëntkarakteristieken *Mycobacterium xenopii* infectie in GZA volgens ATS/IDSA criteria

| n=4/8           | Kliniek        | Radiologisch         | Immuun status           | Onderliggend longlijden                | Co-infecties | Roken | Outcome   |
|-----------------|----------------|----------------------|-------------------------|--|--------------|-------|-----------|
| 60-jarige man   | Vermagering    | Cavitaire aantasting | Immuun gecompromitteerd | Ja, COPD en longemfyseem               | Neen         | Ja    | Stabiel   |
| 66-jarige man   | Vermagering    | Cavitaire aantasting | Immuun competent        | Ja, chronische asthmatische bronchitis | Aspergillose | Ja    | Overleden |
| 72-jarige man   | Hoest, dyspneu | Cavitaire aantasting | Immuun competent        | Ja, COPD en longemfyseem               | Bacterieel   | Ja    | Overleden |
| 65-jarige vrouw | Hoest          | Cavitaire aantasting | Immuun competent        | Neen                                   | Neen         | Ja    | Stabiel   |

#### 3.4.4 *Mycobacterium gordonae*

Zoals in het eerste deel van deze CAT reeds werd aangehaald, heeft isolatie van *M. gordonae* vaak geen klinische betekenis en is dit voornamelijk te wijten aan contaminatie vanuit de omgeving. Toch mag *M. gordonae* in respiratoire stalen niet zomaar als contaminant worden afgeschreven. Morimoto et al. onderzochten de klinische relevantie van *M. gordonae* isolatie uit respiratoire stalen in Japan en kwamen tot de conclusie dat *M. gordonae* zeer zeldzaam aanleiding kan geven tot NTM longziekte. De gerapporteerde klinische relevantie in deze monocentrische studie bedroeg 1,4% (3/209 patiënten). Bij de klinisch relevante casussen werd *M. gordonae* meermaals geïsoleerd uit zowel sputum, bronchusaspiraats als BAL-vocht. De gemiddelde TTP van de geïncubeerde MGIT tubes op het BACTEC systeem was significant sneller bij klinisch relevante isolaten in vergelijking met deze van contaminanten, respectievelijk 9 dagen versus 24 dagen. Bijkomend onderzoek toonde aan dat alle *M. gordonae* isolaten die NTM longziekte veroorzaakten, behoorden tot subtype C.<sup>23</sup>

*Mycobacterium gordonae* werd in GZA over de periode 2015-2018 welgeteld 42 maal geïsoleerd uit respiratoire stalen van evenveel patiënten, met een gemiddelde TTP van 27 dagen. Geen enkele patiënt voldeed aan de ATS/IDSA criteria en allen werden toegeschreven aan contaminatie.

#### 3.4.5 Zeldzaam geïdentificeerde Mycobacteriën in GZA

In GZA werden er gedurende periode 2015-2018 welgeteld 7 kiemen behorende tot het *Mycobacterium fortuitum peregrinum septicum* complex geïsoleerd, geen enkele van deze RGM species was klinisch relevant. Er werden tevens 3 isolaten behorende tot het *Mycobacterium chelonae - abscessus* complex geïsoleerd en twee behorende tot het *Mycobacterium terrae complex*, ook deze respiratoire isolaten waren allen niet relevant. *Mycobacterium arupense*, *M. bohemicum*, *M. celatum*, *M. fluoranthenorans*, *M. interjectum*, *M. lentiflavum* en *M. mucogenicum* werden elk slechts eenmaal geïsoleerd uit respiratoire stalen in GZA gedurende de periode 2015-2018. Gezien deze species allen slechts éénmaal bij eenzelfde patiënt werden geïsoleerd, gaan we hier ook niet dieper op in.

### 3.4.6 Conclusie klinische relevantie NTM uit respiratoire stalen in GZA

Gedurende periode 2015-2018 werden er in GZA 202 NTM geïsoleerd uit respiratoire stalen van 147 patiënten. Slechts 23 van deze patiënten voldeden aan de ATS/IDSA criteria voor NTM longziekte, wat neer komt op een totale klinische relevantie van 16%. Als we onze patiënten met vermoedelijke NTM longziekte hierbij rekenen, komen we op een vermoedelijke totale klinische relevantie van 24%. *Mycobacterium xenopii* was het meest virulente species (50% klinisch relevant) en had tevens de slechtste prognose. De MAC species waren gezien hun groot aantal isolaten (52% van alle NTM) verantwoordelijk voor de meeste casussen van NTM longziekte in GZA. *Mycobacterium kansasii* was naast *M. xenopii* en MAC het enige andere NTM species dat aanleiding gaf tot longziekte in GZA.

Tabel 26: Overzicht van het aantal geïsoleerde niet-tuberculeuze Mycobacteriën

| Niet-tuberculeuze mycobacterie geïsoleerd in GZA periode 2015-2018           | Aantal isolaten (aantal patiënten) | ATS/IDSA criteria* (%) | + Vermoedelijke NTM longziekte |
|--|------------------------------------|------------------------|--------------------------------|
| <i>Mycobacterium avium</i> complex   | 104 (70)                           | 17/70 (24)             | 25/70 (36)                     |
| <i>M. avium</i>  | 65 (42)                            | 11/42 (26)             | 19/42 (45)                     |
| <i>M. intracellulare</i>   | 16 (13)                            | 1/13 (8)               | 1/13 (8)                       |
| <i>M. chimaera</i>   | 23 (16)                            | 5/16 (31)              | 5/16 (31)                      |
| <i>Mycobacterium kansasii</i>  | 25 (10)                            | 2/10 (20)              | 7/10 (70)                      |
| <i>Mycobacterium xenopii</i>   | 12 (8)                             | 4/8 (50)               | 4/8 (50)                       |
| <i>Mycobacterium fortuitum</i> - <i>peregrinum</i> - <i>septicum</i> complex | 7 (7)                              | 0/7                    |                                |
| <i>M. fortuitum</i>  | 5 (5)                              |                        |                                |
| <i>M. peregrinum</i>   | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium chelonae</i> - <i>abcessus</i> complex                      | 3 (3)                              | 0/3                    |                                |
| <i>Mycobacterium terrae</i> complex  | 2 (2)                              | 0/2                    |                                |
| <i>Mycobacterium arupense</i>  | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium bohemicum</i>   | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium celatum</i>   | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium fluoranthenvivorans</i>                                     | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium interjectum</i>   | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium lentiflavum</i>   | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium mucogenicum</i>   | 1 (1)                              |                        |                                |
| <i>Mycobacterium goodii</i>  | 42 (42)                            | 0/42                   |                                |
| <b>Totaal</b>  | <b>202 (147)</b>                   | <b>23/147 (16)</b>     | <b>36/147 (24)</b>             |

\* aantal patiënten op totaal aantal patiënten met NTM-longziekte volgens de ATS/IDSA 2007 criteria, patiënten waarbij de criteria niet konden worden toegepast omwille van ontbrekende gegevens (bijvoorbeeld door vroegtijdig overlijden), werden geklasseerd als ATS/IDSA 2007 negatief, hierdoor is er mogelijk een onderschatting van de klinische relevantie.



## 4 Bronvermelding

### Guidelines:

- 1) CLSI. Laboratory Detection and Identification of Mycobacteria. 2nd ed. CLSI guideline M48. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- 2) European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on tuberculosis laboratory diagnostic methods in the European Union – Updated 2018. Stockholm: ECDC; 2018.
- 3) Forbes BA et al. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. Clin Microbiol Rev 2018;31(2):1-66.
- 4) Global Laboratory Initiative: a Working Group of the Stop TB Partnership. Mycobacteriology Laboratory Manual: advancing TB diagnosis – First Edition, April 2014.
- 5) 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;175:367-416.
- 6) Haworth CS, Banks J, Captstick T et al. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). Thorax. 2017;72:ii1-ii64.
- 7) Medische laboratoria - Bijzondere eisen voor kwaliteit en competentie. ISO 15189: 2012 (Gecorrigeerde versie 2014-08-15).

### Reviews:

- 8) Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. Clin Microbiol Infect. 2009;15:906-910.
- 9) Wu UI and Holland SM. Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. Lancet Infect Dis. 2015;15:968-80.
- 10) Zheng C and Fanta CH. Non-tuberculous mycobacterial pulmonary infection in the immunocompetent host.

### Original articles, scientific reports, research articles:

- 11) Bakula Z, Kosciuch J, Safianowska A et al. Clinical, radiologica land molecular features of *Mycobacterium kansasii* pulmonary disease. Respiratory Medicine 2018;139:91-100.
- 12) Bodal VK, Bal MS, Bhagat S et al. K Fluorescent microscopy and Ziehl-Neelsen staining of bronchoalveolar lavage, bronchial washings, bronchoscopic brushing and post bronchoscopic sputum along with cytological examination in cases of suspected tuberculosis. Indian J Pathol Microbiol 2015;58(4):443-447.
- 13) Boyle DP, Zembower TR, Reddy S and Qi C. Comparison of clinical features, virulence, and relapse among *Mycobacterium avium* complex species. Am J Respir Crit Care Med 2015;191(11):1310-1317.
- 14) Chien JY, Lai CC, Sheng WH, Yu CJ and Hsueh PR. Pulmonary infection and colonization with nontuberculous Mycobacteria, Taiwan, 2000-2012. Emerg Infect Dis. 2014;20(8):1382-1385.
- 15) Deresinski S. In the Literature: *Mycobacterium xenopi* infection. Clin Infect Dis. 2019; 49(4):iii-iv.
- 16) Hermansen TS, Ravn P, Svensson E and Lillebaek T. Nontuberculous mycobacteria in Denmark, incidence and clinical importance during the last quarter-century. Sci Rep. 2017;7(1):6696.
- 17) Johnston JC, Chiang L and Elwood K. *Mycobacterium kansasii*. Microbiol Spectrum 5(1):TNMI7-0011-2016. doi:10.1128/microbiolspec.TNMI7-0011-2016.
- 18) Kim SJ et al. Distribution and clinical significance of *Mycobacterium avium* complex species isolated from respiratory specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2017;88:125-137.
- 19) Koh WJ et al. Clinical significance of the differentiation between *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* in *M. avium* complex lung disease. Chest 2012;142(6):1482-1488.

- 20) Kotilainen H, Valtonen V, Tukianen P, Poussa T, Eskola J and Järvinen A. Clinical findings in relation to mortality in non-tuberculous mycobacterial infections: patients with *Mycobacterium avium* complex have better survival than patients with other mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:1909-1918.
- 21) Luetkemyer AF et al. Evaluation of Xpert MTB/RIF Versus AFB Smear and Culture to Identify Pulmonary Tuberculosis in Patients With Suspected Tuberculosis From Low and Higher Prevalence Settings. *CID* 2016;62(9):1081-1088.
- 22) McCarthy KD et al. Monitoring the performance of mycobacteriology laboratories: a proposal for standardized indicators. *Int J Tuberc Lung Dis* 2008;12(9):1015-1020.
- 23) Morimoto K, Kazumi Y, Shiraishi Y et al. Clinical and microbiological features of definite *Mycobacterium gordonae* pulmonary disease: the establishment of diagnostic criteria for low-virulence mycobacteria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2015;109:589–593.
- 24) Prabaker K et al. Pseudo-outbreak of *Mycobacterium gordonae* following the opening of a newly constructed hospital at a Chicago Medical Center. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015;36(2):198-203.
- 25) Prakash P, Agarwal P, Gupta A, Gupta E, Dasgupta A. Comparison of induced sputum and Bronchoalveolar Lavage fluid examination in the diagnosis of sputum negative pulmonary tuberculosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci* 2016;58(3):173-175.
- 26) Piersimoni C, Nista D, Bornigia S and Gherardi G. Unreliable detection of *Mycobacterium xenopi* by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture System. *J Clin Microbiol* 2009;47(3):804-806.
- 27) Schiff HF, Jones S, Achaiah A, Pereira A, Stait G and Green B. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens: seven year experience in a UK hospital. *Scientific Reports* 2019;9:1730.
- 28) Scohy A et al. Comparison of the RGM medium and the mycobacterial growth indicator tube automated system for isolation of non-tuberculous mycobacteria from sputum samples of cystic fibrosis patients in Belgium. *J Clin Tuberc Other Mycobact Dis* 2018;13:1-4.
- 29) Shah NM et al. Pulmonary *Mycobacterium avium-intracellulare* is the main driver of the rise in non-tuberculous mycobacteria incidence in England, Wales and Northern Ireland, 2007-2012. *BMC Infectious Diseases* 2016;16:195.
- 30) Shen MC, Lee SJ, Huang TS and Liu YC. Clinical significance of isolation of *Mycobacterium avium* complex from respiratory specimens. *J Formos Med Assoc* 2010;109(7):517-523.
- 31) Soetaert K et al. Research: Strong increase of true and false positive mycobacterial cultures sent to the National Reference Centre in Belgium, 2007 to 2016. *Euro Surveill.* 2019;24(11):pii=1800205.
- 32) Van Ingen J, Bendien SA, de Lange WCM et al. Respiratory infection: Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax.* 2009;64:502-506.
- 33) Van Ingen J, Hoefsloot W, de Lange WCM, Magis-Escurra C, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ and van Soolingen D. Stand van zaken: Nontuberculeuze mycobacteriën: klinisch relevant. *Ned Tijdschr Geneesk.* 2010;154:A1178.
- 34) Wright PW, Wallace RJ, Wright NW, Brown BA and Griffith DE. Sensitivity of fluorochrome microscopy for detection of *Mycobacterium tuberculosis* versus nontuberculous Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1998;36(4):1046-1049.
- 35) Zlojtro M et al. *Mycobacterium gordonae* pseudo-outbreak due to hospital water contamination. *J Water Health* 2015;15(1):125-130.

Poster Presentation:

- 36) Castriciano S, Russo C, Coltella L et al. Copan ESwab allows collection and transportation of abscess fluid and pus for tubercular and non tubercular Mycobacteria investigation. *ASM 2013 Denver Poster* P2227.

## Bijlage 1: Flow mycobacteriële diagnostiek in GZA

Alle positieve MGIT's in GZA doorgestuurd worden doorgestuurd naar het Sciensano referentielaboratorium voor mycobacteriën. In Sciensano worden op elk positief MGIT flesje steeds volgende analyses uitgevoerd:

- 1) Microscopie voor zuurvaste bacillen
- 2) Enten van choco en 2 Löwensteinbodems (30°C + 37°C) welke 6 weken worden geïncubeerd
- 3) *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTC) PCR

In functie van het resultaat van de MTC PCR worden er nog bijkomende analyses uitgevoerd.

- 1) Indien MTC PCR positief:
  - a. Whole genome sequencing (WGS)
    - i. bijkomende informatie over de soortidentificatie binnen het MTC
    - ii. aan- of afwezigheid van gekende mutaties geassocieerd met resistentie tegen tuberculostatica (= eerste gevoeligheidsbepaling)
  - b. Bactec MGIT antibiogram voor isoniazide (0,1 µg/mL), rifampicine (1 µg/mL), ethambutol (5 µg/mL), pyrazinamide (100 µg/mL)
- 2) Indien MTC PCR negatief:
  - a. PCR atypische mycobacteriën met soortidentificatie (via 16S RNA)
  - b. Eventueel (op expliciete vraag clinicus): antibiogram atypische mycobacteriën

Doordat we gebruik maken van een extern laboratorium voor onze identificatie en gevoeligheidsbepaling van mycobacteriën worden deze TATs onvermijdelijk beïnvloed door bijkomende vertragende factoren zoals transporttijd en onderlinge communicatie. Er dienen op voorhand concrete afspraken gemaakt te worden met het extern laboratorium omtrent de wijze van rapporteren (via mail/post/fax) en de richt antwoordtijden. De PCR MTC en PCR NTM resultaten worden binnen de week van ontvangst van de MGIT gerapporteerd. De resultaten van de WGS volgen 1 week na het resultaat van de MTC PCR en de MTC gevoeligheidsbepaling via de MGIT methode ongeveer 2 weken daarna. Deze antwoordtijden worden vanaf januari 2019 gemonitord. Indien we 3 weken na het verzenden van de MGIT nog geen resultaat hebben ontvangen, wordt een verduidelijkingsmail gestuurd (zie tabel 27).

Tabel 27: Overzicht TAT's volgens betrokken laboratorium

| Labo            | T1                | T2  | TAT(T2-T1)                                 |
|-----------------|-------------------|---|--|
| GZA             | Staalreceptie     | Auramine kleuring   | Resultaat auramine kleuring                |
|                 |                   | MTC PCR   | Resultaat MTC PCR                          |
|                 |                   | Staalvoorbereiding (centrifugeren/concentreren en/of vervloeien en/of decontamineren) | *  |
|                 |                   | Inoculatie MGIT flesje, standaard 6 weken incubatie op BD BACTEC MGIT 960 systeem     | *  |
|                 |                   | MGIT positief gevlagd   | Gemiddelde tijd tot detectie (MTC vs. NTM) |
|                 |                   | MGIT verzonden  | 1 <sup>ste</sup> resultaat Sciensano       |
| GZA → Sciensano | MGIT verzonden    | MGIT ontvangen  | Verzendtijd*                               |
| Sciensano       | Resultaat MTC PCR | Resultaat MTC/NTM PCR   | Richtwaarde 1 week                         |
|                 |                   | Resultaat MTC WGS   | Richtwaarde 1 week                         |
|                 |                   | Resultaat MTC Bactec MGIT antibiogram   | Richtwaarde 1 week                         |

\* deze TAT's worden niet standaard gemonitord

Vanaf januari 2019 worden alle tussentijdse rapporten van Sciensano gerapporteerd, zodat de clinicus op de hoogte wordt gehouden van alle resultaten. Concreet worden dus in een eerste stap de PCR resultaten voor *Mycobacterium tuberculosis* en/of atypische mycobacteriën gerapporteerd. Nadien wordt dit resultaat dan verder aangepast naargelang het resultaat van de WGS en uiteindelijk in functie van de het resultaat van de Bactec MGIT gevoeligheidsbepaling (zie tabel 28).

Tabel 28: Positief en negatief voorbeeld van tussentijdse rapportage in GZA

| Voorbeeld | Resultaat Sciensano         | (Tussentijds) rapport GZA  |
|-----------|-----------------------------|--|
| 1         | PCR MTC én PCR NTM negatief | MGIT cultuur werd verzonden naar referentie labo Sciensano<br>PCR voor <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex en voor atypische mycobacteriën zijn negatief.<br>Twee subculturen op Löwenstein worden geïncubeerd op 30°C en op 37°C gedurende 6 extra weken. In geval van mycobacteriële groei zal het resultaat u meegedeeld worden   |
| 2         | PCR MTC positief            | MGIT cultuur werd verzonden naar referentie labo Sciensano<br>PCR voor <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex is positief op deze cultuur: gevoeligheidsbepaling volgt indien nog niet uitgevoerd op vorige cultuur   |
|           | WGS negatief                | MGIT cultuur werd verzonden naar referentie labo Sciensano<br>PCR voor <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex is positief: Whole genome sequencing detecteert geen genen die coderen voor resistentie.<br>isoniazide, rifampicine, ethambutol, pyrazinamide, fluoroquinolones, ethionamide, amikacine, kanamycine, rifabutine, p-aminosalicylzuur (PAS), capreomycine, CS, linezolide, clofazimine, bedaquiline, delamanid en streptomycine: afwezigheid van mutaties<br>Gevoeligheidsbepaling volgt  |
|           | Bactec MGIT antibiogram     | MGIT cultuur werd verzonden naar referentie labo Sciensano<br>PCR voor <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex is positief: Whole genome sequencing detecteert geen genen die coderen voor resistentie.<br>isoniazide, rifampicine, ethambutol, pyrazinamide, fluoroquinolones, ethionamide, amikacine, kanamycine, rifabutine, p-aminosalicylzuur (PAS), capreomycine, CS, linezolide, clofazimine, bedaquiline, delamanid en streptomycine: afwezigheid van mutaties<br>Klassieke gevoeligheidsbepaling afgewerkt.<br>isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide: S |

Bijlage 2: Gemiddelde tijd tot positief worden van de MGIT voor NTM species in respiratoire stalen

| Species   | Aantal stalen | Minimum (dagen) | Maximum (dagen) | Gemiddelde (dagen) |
|---|---------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| <i>M. avium</i>                                     | 65            | 5               | 35              | 13                 |
| <i>M. chimaera</i>                                  | 23            | 5               | 34              | 14                 |
| <i>M. intracellulare</i>                            | 16            | 2               | 42              | 16                 |
| <i>M. kansasii</i>                                  | 25            | 7               | 35              | 18                 |
| <i>M. xenopii</i>                                   | 12            | 14              | 39              | 24                 |
| <i>M. gordonae</i>                                  | 42            | 16              | 40              | 27                 |
| <i>M. chelonae-abcessus</i> complex                 | 3             | 4               | 10              | 7                  |
| <i>M. fortuitum - peregrinum - septicum</i> complex | 7             | 5               | 25              | 12                 |
| <i>M. terrae</i> complex                            | 2             | 17              | 20              | 19                 |
| <i>M. arupense</i>                                  | 1             | 23              | 23              | 23                 |
| <i>M. bohemicum</i>                                 | 1             | 22              | 22              | 22                 |
| <i>M. celatum</i>                                   | 1             | 35              | 35              | 35                 |
| <i>M. fluoranthenorans</i>                          | 1             | 14              | 14              | 14                 |
| <i>M. interjectum</i>                               | 1             | 32              | 32              | 32                 |
| <i>M. lentiflavum</i>                               | 1             | 24              | 24              | 24                 |
| <i>M. mucogenicum</i>                               | 1             | 6               | 6               | 6                  |

### Bijlage 3: Stalen met negatieve kweek en positieve PCR

In de tabel hieronder staan de stalen met discordant kweek versus PCR resultaat opgesomd. Per staal wordt een mogelijke verklaring geboden waarom dit niet met klassieke mycobacteriële kweek werd gedetecteerd. Voor elk staal wordt ook het klinisch beeld bij de patiënt beschreven om duidelijk te maken dat het hier niet om vals positieve PCR resultaten gaat maar om vals negatieve kweken.

| Staaltype               | Klinisch beeld   | Verklaring   |
|-------------------------|--|--|
| BAL-vocht               | Vermoeidheid, nachtzweeten, algemene malaise, op beeldvorming tuberculeuze lymfangitis | Follow-up staal van patiënt onder therapie (10 dagen na start 4-ledige therapie)   |
| Sputum                  | Vermoeidheid, vermagering, TBC contact   | Follow-up staal van patiënt onder therapie   |
| Klierpunctie            | Lymfadenitis supraclaviculair met centrale necrose en positieve auramine               | Laattijdig geïnoculeerd in MGIT (>18u na staalafname) + zeer muceus staal (niet vervloeid) + laag inoculum (slechts zeer zeldzame zuurvaste bacillen gezien bij auramine)                            |
| CSV                     | Beeld van neurotuberculose waarvoor transfer naar UZA voor start intensieve therapie   | Kweek/PCR mycobacteriën pas 2 dagen na staalafname bijaangevraagd op advies neurologie, staal in tussentijd gekoeld bewaard + te weinig staal voor optimale kweek o.w.v. jonge leeftijd patiënt (4j) |
| Lymfeklier              | Unilaterale lymfadenitis, op APO ook zuurvaste staven en granulomateuze lymfadenitis   | Lymfeklier werd pas laattijdig vermaald en geïnoculeerd in MGIT (>18u na staalafname)  |
| Maagvocht               | Cervicale lymfadenitis, sterk positieve Mantoux test                                   | Laattijdig geïnoculeerd in MGIT, niet tijdig geneutraliseerd!  |
| Pleuravocht (via drain) | Tuberculaire pleuritis met multiële adenopathieën, op APO granulomen                   | Sterk verdund staal: afname via drain waarbij 1500mL vocht werd gecollecteerd, hierdoor geen optimale concentratie mogelijk  |

Bijlage 4: BILULU

Figuur 12: Vragenlijst BILULU laboratoria

|   |  |
|---|--|
| <b>1) Welke methode</b> gebruiken jullie voor mycobacteriële kweek?   |  |
| a) Gebruik van vloeibare bodems (MGIT, andere..)? Zo ja, welke?   |  |
| b) Gebruik van vaste bodems? Zo ja, welke?  |  |
| <b>2) KPI's volgens CLSI M48:</b><br>Worden onderstaande parameters systematisch opgevolgd?   |  |
| a) aantal geanalyseerde mycobacteriële stalen?  |  |
| b) aantal/percentage positieve auramines op totaal aantal stalen?   |  |
| c) aantal/percentage positieve kweken?  |  |
|   | 1) met positieve auramine                                  |
|   | 2) behorende tot <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex |
|   | 3) behorende tot de niet-tuberculeuze mycobacteriën        |
|   | 4) bijkomende monitoring <i>M. gordonae</i> ?              |
| d) bacteriële contaminatiegraad?<br>(definitie CLSI: contaminatiegraad = aantal gecontamineerde kweken/totaal aantal geïnoculeerde gedecontamineerde kweken * 100)                    |  |
| 1) hoe wordt deze berekend?<br>bvb. GZA contaminatiegraad = aantal valspositieve MGITs/totaal aantal MGITs ingezet van niet-steriele stalen (decontaminatieprocedure ondergaan) * 100 | contaminatiegraad =  |
| 2) Welke decontaminatieprocedure?<br>(+percentages indien gebruik NALC + NaOH)  |  |
| <b>3) Gebruik van standaard commentaren</b> bij rapportage:   |  |
| a) <i>M. gordonae</i> ? Zo ja, welke?   |  |
| b) andere niet-tuberculeuze mycobacteriën? Zo ja, welke?  |  |

Tabel 29: Mycobacteriële diagnostiek in BILULU laboratoria

|                                   | LABO 1                        | LABO 2              | LABO 3         | LABO 4                        | LABO 5         |
|-----------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
| 1) Methode mycobacteriële kweek:  |                               |                     |                |                               |                |
| a) Vloeibare bodems?              | Ja, MGIT (BD)                 | Ja, MB (BioMérieux) | Ja, MGIT (BD)  | Ja, MGIT (BD)                 | Ja, MGIT (BD)  |
| b) vaste bodems?                  | Ja, LJ                        | Ja, LJ              | Ja, LJ         | Ja, LJ                        | Ja, LJ         |
| c) Contaminatieprocedure?         | Mycoprep kit (NALC – NaOH 2%) | NALC %?             | NALC – NaOH 2% | Mycoprep kit (NALC – NaOH ?%) | NALC – NaOH 2% |
| 2) KPI's systematisch opgevolgd?  | Neen                          | Neen                | Ja             | Ja                            | Ja             |
| 3) Gebruik standaard commentaren: |                               |                     |                |                               |                |
| a) bij <i>M. gordonae</i> ?       | Neen                          | Ja                  | Neen           | Ja                            | Ja             |
| b) bij andere NTM?                | Neen                          | Ja                  | Neen           | Ja                            | Ja             |

LJ = Löwenstein-Jensen

De 5 BILULU laboratoria die deelnamen aan de vragenlijst omtrent mycobacteriële diagnostiek, maakten allen gebruik van een combinatie van vaste en vloeibare kweekmedia. Slechts 3/5 laboratoria volgde zelfs reeds systematisch de belangrijkste mycobacteriële KPI's op. Alle laboratoria maakten gebruik van de NALC-NaOH methode bij de staalvoorbereiding. De resultaten van de belangrijkste mycobacteriële KPI's van 2018 en gedurende de periode 2015-2018 van de BILULU laboratoria staan weergegeven in tabel 30 en 31.

Tabel 30: Mycobacteriële KPI's BILULU laboratoria 2018

| KPI's (2018)   | LABO 1    | LABO 2 | LABO 3                                   | LABO 4    | LABO 5                            |
|--|-----------|--------|--|-----------|-----------------------------------|
| Aantal mycobacteriële stalen                         | 1086      | ?      | 552                                      | 1086      | 3636                              |
| Aantal en % positieve auramine kleuringen            | 22 (2,0%) | ?      | 8 (1,5%)                                 | ?         | 132 (3,6%)                        |
| Aantal en % positieve mycobacteriële kweken          | 46 (4,2%) | ?      | 16 (2,9%)                                | 47 (4,3%) | 214 (5,9%)                        |
| Aantal en % positieve kweken met positieve auramine  | 12 (26,1) | ?      | 2 (12,5%)                                | ?         | 132 (61,7%)                       |
| Aantal en % positieve MTC kweken                     | 37 (3,4%) | ?      | 9 (1,6%)                                 | 17 (1,6%) | 171 (4,7%)                        |
| Aantal en % positieve NTM kweken                     | 9 (0,8%)  | ?      | 7 (1,3%)                                 | 30 (2,8%) | 43 (1,2%)                         |
| Bacteriële contaminatiegraad                         | 0,9%      | ?      | 4,5% (MGIT)<br>6,2% (LJ)<br>Totaal 10,7% | 2,5%      | 2,2%<br>(MGIT+LJ<br>zelfde staal) |
| Aantal <i>M. gordonae</i> isolaten en % NTM isolaten | 0         | ?      | 1 (14,3%)                                | 5 (16,7%) | 1 (2,3%)                          |

? onvoldoende gegevens voor berekening

Tabel 31: Mycobacteriële KPI's BILULU laboratoria 2015-2018.

| KPI's (2015-2018)                                    | LABO 1     | LABO 2    | LABO 3                                  | LABO 4     | LABO 5 |
|--|------------|-----------|---|------------|--------|
| Aantal mycobacteriële stalen                         | 3826       | 3112      | 2068                                    | 5249       | ?      |
| Aantal en % positieve auramine kleuringen            | 90 (2,4%)  | 78 (3,5%) | 95 (4,6%)                               | ?          | ?      |
| Aantal en % positieve mycobacteriële kweken          | 163 (4,3%) | ?         | 160 (7,7%)                              | 222 (4,2%) | ?      |
| Aantal en % positieve kweken met positieve auramine  | 56 (34,4%) | ?         | 69 (43,1%)                              | ?          | ?      |
| Aantal en % positieve MTC kweken                     | 104 (2,7%) | ?         | 103 (5,0%)                              | 132 (2,5%) | ?      |
| Aantal en % positieve NTM kweken                     | 59 (1,5%)  | ?         | 57 (2,8%)                               | 91 (1,7%)  | ?      |
| Bacteriële contaminatiegraad                         | 1,4%       | ?         | 4,4% (MGIT)<br>4,5% (LJ)<br>Totaal 8,9% | 2,4%       | ?      |
| Aantal <i>M. gordonae</i> isolaten en % NTM isolaten | 1 (2%)     | 16 (??%)  | 14 (25%)                                | 22 (24%)   | ?      |

? onvoldoende gegevens voor berekening