

CAT: Atypische mycobacteriën in de setting van mucoviscidose

Author	Mieke Develter
Supervisor	Prof. Dr. J. Verhaegen
Search verified by	Dr. J. Frans
Date	27- 04 - 2004
Expiry date	27- 04 - 2006

Clinical bottom line

1. Volgens recente literatuurgegevens is de prevalentie van atypische mycobacteriën in de luchtwegen bij volwassen mucoviscidose patiënten niet verwaarloosbaar (Olivier et al., 2003). Het klinisch belang hiervan is nog niet opgehelderd. De huidige case reports zijn niet altijd even concordant. Toch wordt regelmatige microbiologische screening naar mycobacteriën aangeraden.
2. De gouden standaard voor het microbiologisch opsporen van mycobacteriën – in afwachting van het op punt stellen van moleculaire diagnostiek - is nog altijd de cultuur (Leitritz et al., 2001). Deze cultuur gebeurt bij voorkeur op een sputumstaal, 's ochtends afgenomen. Het staal dient voldoende snel naar het labo gebracht en gekoeld op 4°C indien de cultuur niet binnen het half uur wordt ingezet. (Manual of clinical microbiology, 2003, ASM-press)
Om overgroei door ander bacteriën te voorkomen, dienen niet steriele stalen gedecontamineerd te worden, alvorens ze in cultuur gebracht worden. De decontaminatie die het meest frequent wordt gebruikt (N-Acetyl-L-Cysteïne met Natriumhydroxide (NALC-NaOH)) is niet optimaal bij respiratoire stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten. Bij 80% van de mucoviscidosepatiënten is namelijk pseudomonas aanwezig in de luchtwegen. Deze bacterie is relatief weerstandig aan deze decontaminatiemethode en kan dus aanleiding geven tot vals positieve resultaten. Daarom wordt een bijkomende decontaminatie met oxaalzuur aangeraden (Whittier et al., 1993). Deze meer toxische methode doodt ook meer mycobacteriën (Whittier et al., 1997). Daarom kan ook worden afgewacht en alleen in geval van contaminatie verder met oxaalzuur gedecontamineerd worden, zodat niet alleen het aantal vals positieve, maar ook het aantal vals negatieve resultaten zoveel mogelijk gereduceerd wordt. (Bange et al., 2002).
Wat de cultuur zelf betreft, raadt de CDC de combinatie van zowel een vast als een vloeibaar medium aan, dit om zowel snellere als meer accurate resultaten te kunnen afleveren (Tenover et al., 1993).
3. In dit verband is er in het UZ Gasthuisberg gestart met een studie naar de prevalentie van atypische mycobacteriën bij mucoviscidosepatiënten. De respiratoire stalen worden in de koelkast (5°C) bewaard in afwachting van het in cultuur brengen, meestal gebeurt dit binnen 24u, stalen op donderdagavond of vrijdag afgenomen blijven meestal gedurende het weekend in de koelkast. Voor de decontaminatie wordt gewerkt volgens de alternatieve decontaminatiemethode van Bange et al. Tot hertoe (30-tal stalen), moet ongeveer 1/3 opnieuw gedecontamineerd worden. Voor de alternatieve decontaminatie moet men rekening houden met ongeveer een verdubbeling van de kostprijs. Voor de cultuur wordt enkel gebruik gemaakt van de vloeibare media, de vaste media zijn reeds eerder na een kosten-baten analyse afgeschaft. Hierdoor wordt wel wat aan sensitiviteit ingeboet..

Clinical/Diagnostic scenario

Huidige richtlijnen stellen dat regelmatige screening naar de aanwezigheid van atypische mycobacteriën in de luchtwegen van mucoviscidosepatiënten wenselijk is (Ebert et al., 2002). Recente literatuurgegevens tonen immers aan dat deze potentieel pathogenen niet onfrequent voorkomen in de luchtwegen van mucoviscidosepatiënten (Olivier et al., 2003). Daarom werd in het UZ Gasthuisberg geopteerd om te starten met een prospectieve screening naar de prevalentie van de atypische mycobacteriën in de luchtwegen bij de volwassen Mucoviscidosepatiënten.

Pseudomonas, dat bij de meeste mucoviscidosepatiënten aanwezig is in de luchtwegen, is relatief weerstandig aan de huidig gebruikte decontaminatiemethode met N-Acetyl-L-Cysteïne en Natriumhydroxide (NALC-NaOH). Uitgaande van recente literatuurgegevens over alternatieve decontaminatiemethodes voor stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten, is gekozen voor de 2-stapsdecontaminatie beschreven volgens Bange et al.

Questions

Patient: volwassen mucoviscidosepatiënt

Intervention: cultuur van mycobacteriën

Comparison: huidige decontaminatiemethode (NALC-NaOH) met 2-stapsdecontaminatiemethode volgens Bange

Outcome: heeft het isoleren van atypische mycobacteriën bij mucoviscidosepatiënten een toegevoegde waarde in de kliniek van mucoviscidose (impact van atypische mycobacteriën en behandeling ervan) ?

Search terms

Zoektermen: ‘cystic fibrosis’ [MESH], ‘mycobacteria, atypical’ [MESH], ‘culture media’ [MESH], culture, decontamination, nontuberculous mycobacteria.

Medline

Sumsearch

National Guideline Clearinghouse

Cochrane library

Professionele organisaties

- American Thoracic Society (ATS): <http://www.thoracic.org>

Boeken

- Manual of Clinical Microbiology 8th edition, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC (edit) ASM-press 2003.

Relevant Article(s)/References

REVIEW: Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(8): 918-951.

REVIEW: L. Saiman, J. Siegel, Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control*. 2003; 31 (3 suppl): S1-S62.

REVIEW: Griffith DE. Emergence of nontuberculous mycobacteria as pathogens in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(6): 810-812.

REVIEW: Ebert DL, Olivier KN. Nontuberculous mycobacteria in the setting of cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2002; 23(3): 655-663.

ORIGINAL: Forslow U, Geborek A, Hjelte L, Petrini Bn Heurlin N. Early chemotherapy for non-tuberculous mycobacterial infections in patients with cystic fibrosis. *Acta Paediatr* 2003; 92(8): 910-915.

ORIGINAL: Olivier KN, Weber DJ, Lee JH, Handler A, Tudor G, Molina PL, Tomashefski J, Knowles Mr. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis study group. Nontuberculous mycobacteria. II: nested-cohort study of impact on cystic fibrosis lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(6): 835-840.

ORIGINAL: Olivier KN, Weber DJ, Wallace FJ, Faiz AR, Lee JH, Zajang Y, Brown-Elliott BA, Handler A, Wiolson RW, Scjeczter %S, Edwards LJ, Chakraborti S, Knowles MR. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis study group. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167(6): 828-834.

ORIGINAL: Cullen AR, Cannon CL, Mark EJ, Colin AA. Mycobacterium abscessus infection in cystic fibrosis. Colonization or infection ? *Am J Respir Crit Care Med* 200; 161:641-645.

ORIGINAL: Oeramann CM, Starke JR, Seilheimer DK. Pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii* in a patient with cystic fibrosis. *Pediatr. Infect. Dis J.* 1997; 16(2): 257-259.

ORIGINAL: Pinto-Powell R, Olivier KN, Marsh BJ, Donaldson S, Parker HW, Boyle W, Knowles M, Magnusson M, von Reyn CF. Skin testing with *Mycobacterium avium* sensitiin to identify infection with *M. avium* complex in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 1996; 22(3): 560-562.

ORIGINAL: Aitken ML, Burke W, McDonald G, Wallis C, Ramsey B, Nolan C. Nontuberculous mycobacterial disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest* 1993; 103(4): 1096-1099.

ORIGINAL: Kilby JM, Gilligan PH, Yankaskas JR, Highsmith WE, Edwards LJ, Knowles MR. Nontuberculous mycobacteria in adult patients with cystic fibrosis. *Chest* 1993; 102(1): 70-75.

ORIGINAL: Oliver A, Maiz L, Canton R, Escobar H, BAquero F, Gomez-Mampaso E. Nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* 2001; 32(9):1298-1303.

ORIGINAL: Torrens JK, Dawkins P, Conway SP, Moya E. Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Thorax* 1998; 53(3): 182-185.

ORIGINAL: Tomashefski JF, Stern RC, Demko CA, Doeshuk CF. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. An autopsy study. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154: 523-528.

ORIGINAL: Mulherin D, Coffey MJ, Halloran DO, Deogan MT, Fitzgerald MX. Skin reactivity to atypical mycobacteria in cystic fibrosis. *Respir Med* 1990; 84(4): 273-276.

ORIGINAL: Smith MJ, Efthimiou J, Hodson ME, Batten JC. Mycobacterial isolations in young adults with cystic fibrosis. *Thorax* 1984; 39(5): 369-375.

ORIGINAL: HJELTE L, PETRINI B, KALLENIS G, STRANDVIK B. PROSPECTIVE STUDY OF MYCOBACTERIAL INFECTIONS IN PATIENTS WITH CYSTIC FIBROSIS. THORAX 1990; 45(5): 397-400.

ORIGINAL: Whittier S, Hopfer RL, Knowles MR, Gilligan PH. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1993; 31(4): 861-864.

ORIGINAL: Whittier S, Olivier K, Gilligan P, Knowles M, Della-Latta P. Proficiency testing of clinical microbiology laboratories using modified decontamination procedures for detection of nontuberculous mycobacteria in sputum samples from cystic fibrosis patients. The Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis Study Group. J Clin Microbiol 1997; 35(10): 2706-2708.

ORIGINAL: Bange FC, Kirschner P, Böttger EC. Recovery of mycobacteria from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 1999; 37(11): 3761-3763.

ORIGINAL: Bange FC, Böttger EC. Improved decontamination method for recovering mycobacteria from patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21: 546-548.

Critical Appraisal

1 Analytische performantie

1.1 Preanalytische factoren

Geëxpectoreerd sputum is een accurate indicator van de aanwezige microben in de lage luchtweg en de geprefereerde bron van luchtwegsecreties voor de opvolging en behandeling van mucoviscidose longaandoeningen. Bij jongere kinderen en patiënten met een mildere vorm van de aandoening, kan sputum soms moeilijk te verkrijgen zijn. Hiervoor zijn twee alternatieven: keelcultuur en broncho-alveolair lavage vocht (BAL-vocht). De keelcultuur scoort goed in het voorspellen van *P. aeruginosa* in de lagere luchtwegen wat betreft specificiteit (95%; 90-99%), maar slecht wat betreft sensitiviteit (44%; 14-79%). Cultuur van BAL-vocht wordt aanzien als een meer sensitieve test, maar de procedure is meer invasief en vereist sedatie, dus de risico's en de kosten verhogend. Bovendien wordt BAL vaak enkel in één lob uitgevoerd, zodat mogelijk regionale ziekte kan gemist worden. Hiervoor doen de meeste clinici een beroep op keelculturen initieel en reserveren BAL voor patiënten die niet beantwoorden aan therapie of patiënten met een progressieve aandoening. Hypertonisch zout geïnduceerd sputum werd recentelijk gerapporteerd als zijnde een goed surrogaat voor stalen van de lagere luchtweg, zowel bij pediatrie als volwassen mucoviscidosepatiënten. (Gibson et al., 2003)

Stalen moeten afgenomen en getransporteerd worden in een steriel, lekvrij, wegwerprecipiënt. Over het algemeen zijn geen transportmedia of preservatieven nodig voor de robuuste mycobacteriën. Als transport naar het laboratorium langer dan 1 uur op zich laat wachten, is koeling op 4°C aangewezen. Bij aankomst op het laboratorium dienen de stalen eveneens gekoeld te worden totdat ze ingezet worden. Bij voorkeur worden de stalen binnen de 24u ingezet voor cultuur.

1.2 Analytische factoren

- Meetbereik

Cultuur van mycobacteriën resulteert in een positief resultaat vanaf het moment dat er 10-100 zuur-vaste bacillen (acid-fast bacilli, AFB) per mL staal aanwezig zijn. Ter bevestiging wordt een zuur-vaste kleuring gemaakt die zelf een sensitiviteit heeft die gevoelig lager ligt (10^6 AFB/mL geeft altijd, 10^4 AFB slechts in 60% van de gevallen een positief resultaat).

- Turn around time (TAT)

De turn around time bedraagt 6 weken indien de cultuur negatief is.

1.1 Diagnostische performantie

Detectiemethodes

Er zijn verschillende methodes ontwikkeld om (infectie met) mycobacteriën aan te tonen: huidtests, PCR, cultuur, zuur-vaste kleuring.

Huidtests

Huidtests worden praktisch niet voor diagnose van infectie met atypische mycobacteriën bij mucoviscidosepatiënten gebruikt. Bij patiënten die onder corticosteroiden staan, is er namelijk vaak anergie. Bovendien zijn veel antigenen gemeenschappelijk bij de atypische mycobacteriën van de in het verleden gebruikte tests en worden er veel kruisreacties opgemerkt met het purified protein derivative (PPD).

Moleculaire diagnostiek

Voor wat betreft de moleculaire diagnostiek rechtstreeks vanaf het sputumstaal van *M. tuberculosis* en *Mycobacterium avium intracellulare* (MAC-complex), zijn er reeds kits op de markt die een goede sensitiviteit en specificiteit vertonen (Mitarai et al., 2001), althans zeker wat betreft stalen met positieve uitstrijkjes (Whittier et al., 1997). Voor de andere atypische mycobacteriën zijn die in ontwikkeling. De turn around time zal hiermee zeker fel verkort worden (van 6 weken naar 6u).

In het UZ Gasthuisberg werkt men aan een test voor de detectie van *M. tuberculosis* en atypische mycobacteriën rechtstreeks vanuit de stalen en als alles vlot verloopt, zou die beschikbaar kunnen zijn vanaf volgend jaar (lente 2005).

Cultuur

Voor de detectie van mycobacteriën is cultuur nog steeds de gouden standaard (Leitritz et al., 2001). De CDC raadt hiervoor het gebruik van zowel een vast als een vloeibaar medium aan (Tenover et al., 1993). Wat betreft de vaste media heeft men de keuze tussen ei-gebaseerde media en agar-gebaseerde media.

Ei-gebaseerde media bevatten onder andere hele eieren of dooier, bewaren verschillende maanden in de koelkast en steunen goed de groei van mycobacteriën, bovendien worden stoffen toxisch voor mycobacteriën eventueel aanwezig in het inoculum of medium geneutraliseerd. Als nadelen hebben deze media dat er batch variaties mogelijk zijn (kwaliteit van de eieren), moeilijkheid om groei van debris te onderscheiden, vervloeien van het medium bij contaminatie. Van de ei-gebaseerde media wordt de Löwenstein-Jensen bodem het meest gebruikt. Over het algemeen zorgt dit medium voor een goede isolatie van *M. tuberculosis*, maar is niet zo betrouwbaar voor de isolatie van andere speciës.

Agar-gebaseerde media zijn doorzichtig en leveren op deze manier een meer gemakkelijke manier om snel groei te detecteren en van debris te differentiëren. Bovendien groeien contaminanten niet gemakkelijk op deze bodem. Helaas is dit medium duur in productie en heeft het slechts een beperkte houdbaarheid (1 maand in de koelkast). Daarenboven moet men voorzichtig zijn bij de productie en bewaring van het medium, want excessieve hitte of licht expositie kan resulteren in deterioratie en vrijzetting van formaldehyde, wat toxisch is voor mycobacteriën.

Aangezien mycobacteriën sneller groeien in een vloeibaar medium, worden deze geprefereerd. Het radiometrische semi-automatische BACTEC 460TB systeem samen met een vast medium was de standaard voor snelheid en sensitiviteit van detectie door middel van cultuur. Het maakt gebruik van [¹⁴C]palmitinezuur als koolstofbron, dit wordt door de aanwezige micro-organismen in het medium omgezet naar ¹⁴CO₂, wat door het instrument gemonitord wordt. De hoeveelheid ¹⁴CO₂ en de snelheid waarmee het gas geproduceerd wordt, is recht evenredig met de groeisnelheid van de micro-organismen in het medium. Dit systeem is echter ook gekend voor verschillende beperkingen: gebruik van radioactief materiaal, manueel laden en ontladen, potentieel risico voor prikaccidenten en kruiscontaminatie, gebrek aan gecomputeriseerd data management, stopzetting van productie zodat het systeem waarschijnlijk niet meer verkrijgbaar zal zijn in de toekomst. Het wordt wel als de “gouden standaard” aanzien waarmee andere toestellen vergeleken dienen te worden. Het BACTEC MGIT 960 systeem maakt gebruik van een niet-radiometrische methode voor de detectie van mycobacteriën. Het systeem bevat een gemodificeerde Middlebrook 7H9 broth samen met een fluorescerend element. De grote hoeveelheid zuurstof intieel aanwezig onderdrukt de fluorescentie van de sensor. Groei van mycobacteriën en andere micro-organismen in het medium verbruikt de zuurstof en de indicator fluoresceert fel bij verlichting met UV-licht van 362 nm. Het is een volautomatisch, niet-radiometrisch, niet-invasief instrument met continue monitoring (om het uur). Over het algemeen is de sensitiviteit en tijd voor groeidetectie (time to detection TTD) vergelijkbaar met het BACTEC 460 TB systeem en superieur ten opzichte van vaste media. Daarentegen is de graad van contaminatie hoger bij het MGIT systeem dan bij het BACTEC systeem, waarschijnlijk ten gevolge van de aanrijking van het medium, die naast de groei van mycobacteriën ook de groei van andere organismen bevordert. Dit wordt ook in meerdere studies bevestigd (zie addendum 1 en addendum 2).

Het is algemeen aanvaard dat de combinatie van een vast en een vloeibaar medium essentieel is voor goede laboratoriumpraktijk voor de isolatie van mycobacteriën. Toevoeging van een vast medium heeft zijn waarde voor de detectie van stammen die soms niet in vloeibare media groeien, helpt in de detectie van gemengde mycobacteriële infecties en kan als reserve dienen wanneer de vloeibare media besmet zijn. Alle positieve culturen moeten gesubcultiveerd worden op vaste media, dit om gemengde culturen te detecteren en kolonie morfologie te correleren met identificatie, zelfs als deze culturen direct geïdentificeerd worden vanuit het vloeibaar medium. Noch het radiometrisch BACTEC 460TB, noch het BACTEC MGIT 960 systeem volstaan op zich omwille van de hierboven aangehaalde argumenten.

In het UZ Leuven werken we enkel met het BACTEC MGIT systeem, het vast medium, voordien Löwenstein-Jensen wordt niet meer gebruikt, na een vroegere kosten-baten analyse. Hierdoor boeten we wel wat in aan sensitiviteit (addendum 3).

Zuur-vaste kleuringen

Microscopie van uitstrijkjes vormt nog steeds één van de snelste en goedkoopste manieren om de aanwezigheid van mycobacteriën te diagnosticeren. De normale Gram kleuring kan niet toegepast worden voor mycobacteriën. Deze bacteriën kunnen gram-onzichtbaar zijn of

verschijnen als “geesten” of kunnen als gekorrelde gram-positieve staven te zien zijn. Speciale zuur-vaste kleuringen zijn noodzakelijk om de opname van kleurstoffen te bevorderen. Alhoewel het exacte mechanisme van de zuur-vaste kleuringsreactie niet volledig begrepen is, laat fenol penetratie van de kleurstoffen toe, bevorderd door hogere temperaturen zoals toegepast bij de Ziehl-Neelsen kleuring. Mycobacteriën zijn ook in staat om stabiele complexen te vormen met verschillende arylmethaan kleurstoffen zoals fuchsine en auramine O. De mycolinezuur residues in de celwand houden de primaire kleurstof vast, zelfs na blootstelling aan zure alcohol of sterke minerale zuren. Deze weerstand tegen ontkleuring is noodzakelijk voor een organisme om zuur-vast genoemd te worden. Cellen van snel groeiende mycobacteriën kunnen minder dan 10% zuur-vast zijn en niet kleuren met de fluorochroomkleuring. Bij vermoeden van een snel groeiende mycobacterium kan het daarom aangewezen zijn om bij een negatieve auraminekleuring nog bijkomend een carbol fuchsine kleuring toe te passen. Men moet zich wel bewust zijn dat er niet-mycobacteriële micro-organismen zijn met verschillende graden van zuur vastheid, zoals *Rhodococcus* speciës, *Nocardia* speciës, *Legionella micdadei*, de oöcysten van *Cryptosporidium*, *Isospora* en *Cyclospora*. Ook positieve auramine uitstrijkjes worden idealiter bevestigd met een uitstrijkje gekleurd met carbol-fuchsine (vb Ziehl-Neelsen).

Bij elk nieuw lot kleurstoffen dient een positief (*M. tuberculosis* of atypische mycobacteriën) en een negatief (gram-positief organisme, bij voorkeur *Nocardia*) uitstrijkje gemaakt te worden voor interne kwaliteitscontrole.

Elk uitstrijkje dient zorgvuldig onderzocht op de aanwezigheid van zuur vaste bacillen (acid-fast bacilli AFB). Bij het lezen van een met carbol fuchsine gekleurd uitstrijkje moeten minimum 300 velden worden bekeken (vergroting x1000) eer negatief kan geantwoord worden. Bij het lezen van een met auramine gekleurd uitstrijkje dienen minimum 30 velden bekeken (vergroting x250), wat in een kortere tijdspanne kan gebeuren (1,5 minuut ten opzicht van 15 minuten). Dit gemak van detectie van AFB met de fluorochroomkleuring maakt het de geprefereerde kleuringsmethode voor klinische stalen. Het is trouwens ook de meest sensitieve methode (sensitiever dan carbol-fuchsine). De sensitiviteit van uitstrijkjes in het algemeen is afhankelijk van de ervaring van de laborant en zeker van het aantal AFB aanwezig in het staal. Waar 10^6 AFB/ml gewoonlijk resulteren in een positief uitstrijkje, is dit maar zo in 60% van de gevallen wanneer slechts 10^4 AFB/ml aanwezig zijn. De gevoeligheid van uitstrijkjes algemeen gaat van 22 tot 80%. Men kan de sensitiviteit beïnvloeden door voldoende staal af te nemen. De sensitiviteit verhoogt gevoelig wanneer een geconcentreerd uitstrijkje wordt gemaakt van minimum 5 ml sputum (in vergelijking met een uitstrijkje van om het even welk volume staal). Respiratoire stalen hebben de grootste graad van positieve uitstrijkjes. De specificiteit van het uitstrijkje voor de detectie van mycobacteriën is zeer hoog. Kruis-contaminatie van uitstrijkjes, het gebruik van water gecontamineerd met NTM tijdens het kleuringsproces en transfer van AFB in de immersie-olie kan aanleiding geven tot vals positieve resultaten. Informatie ivm de kwantiteit van AFB in het uitstrijkje dient doorgegeven te worden. De aangeraden interpretatie en rapportering van resultaten van uitstrijkjes is weergegeven in addendum 4.

In het UZ Leuven maken we gebruik van auraminekleuring (aangeraden kleuring met hoogste sensitiviteit).

decontaminatiemethodes

N-Acetyl-L-Cysteïne – Natriumhydroxide methode (NALC-NaOH)

Dit is de meest gebruikte sputum decontaminatiemethode. NALC is mucolytisch en kan aan concentraties van 0,5 tot 2% snel zelfs taaie sputa van mucoviscidosepatiënten verteren. Decontaminatie wordt bereikt door toevoeging van NaOH. Het voordeel van deze methode is dat de concentratie van NaOH kan beperkt worden (finale concentratie van 1%) in vergelijking met decontaminatiemethode met alleen NaOH (finale concentratie van 2%). NaOH is immers niet alleen toxisch voor aanwezige contaminanten, maar ook voor mycobacteriën. Sowieso doodt zelfs de NALC-NaOH methode 28 tot 33% van de mycobacteriën aanwezig in een klinisch specimen. Bij mucoviscidosepatiënten echter komt bij 80% *P. aeruginosa* voor. Deze bacterie is in staat om routine sputum decontaminatie met NALC-NaOH te overleven. Whittier et al zijn dit retrospectief na gaan kijken: van de 121 stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten waren 89 (74%) Löwenstein-Jensen buizen en 43 (36%) van de BacTec flesjes gecontamineerd. De bacteriële contaminanten waren *P. aeruginosa* (85/89) en *B. cepacia* complex (4/85). Daarom zijn alternatieve decontaminatiemethodes nodig voor het voorbehandelen van respiratoire stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten. Whittier et al. hebben daarom een experiment opgezet: 30 sputumstalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten gekend negatief voor AFB, werden geïnoculeerd met *M. avium*. Van een 1 McFarland gemaakte oplossing met *M. avium* werd 0,1 ml toegevoegd aan elke ml staal. Op die manier werd elk staal voorzien van een gestandaardiseerd aantal organismen voldoende om consistente isolatie te verzekeren. Elk staal werd daarop in 3 verdeeld en gedecontamineerd op de 3 volgende methodes: NALC-NaOH, oxaalzuur en NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur. Oxaalzuur is immers gekend om zijn capaciteit om *P. aeruginosa* te elimineren als contaminant in sputum stalen. De behandeling met NALC-NaOH, oxaalzuur en NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur resulteerde in de contaminatie van respectievelijk 21/30 (74%), 16/30 (53%) en 4/30 (13%) van de LJ buizen en 14/30 (47%), 15/30 (50%) en 3/30 (10%) van de BacTec flesjes. De combinatie van NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur leidde dus duidelijk tot een verminderde contaminatie. (addendum 5)

NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur

Whittier et al zijn een prospectieve studie gestart naar de decontaminatiecapaciteiten van NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur aan de hand van 441 respiratoire stalen. Hiervan waren slechts 20 (5%) van de LJ-buizen en 13 (3%) van de BacTec flesjes gecontamineerd met *P. aeruginosa*. Er werden geen andere contaminanten vastgesteld. Alle stalen positief voor AFB op uitstrijkje leverden isolatie van mycobacteriën op. Dit zette hen ertoe aan om deze decontaminatiemethode aan te raden voor isolatie van zuur-vaste organismen van respiratoire stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten. Aan de hand van een multi-center onderzoek hebben ze dan ook deze nieuwe decontaminatiemethode getest. Vijf gesimuleerde stalen werden naar 20 laboratoria die met deze decontaminatiemethode werken, toegezonden. Alle stalen werden geïnoculeerd met een niet-mucoïde *P. aeruginosa* stam van een mucoviscidosepatiënt tot een concentratie van 10^3 organismen/ml. Drie van de vijf stalen werden ook geïnoculeerd met een atypisch mycobacterium: *M. chelonae*, *M. avium* complex (MAC) of *M. fortuitum*. Een suspensie van 2 McFarland mycobacteriën werd bereid, dit werd daarna 1/5 of 1/20 verdund om zodoende positieve uitstrijkjes te bekomen van respectievelijk 3+ à 4+ en 1+ à 2+. De stalen werden binnen de 24u behandeld. Voor wat betreft de stalen met uitstrijkjes van 3+ à 4+ was er geen probleem, voor de stalen met uitstrijkjes van 1+ à 2+, waren de resultaten slechts in ongeveer de helft van de gevallen in orde (zie addendum 6). Waarschijnlijk is dit te wijten aan het feit dat nabehandeling met oxaalzuur resulteert in een verhoogde doding van de mycobacteriën dan al het geval was met alleen NALC-NaOH. Volgens de auteurs geeft dit geen problemen bij de stalen waarvan de uitstrijkjes positief zijn

omdat er voldoende mycobacteriën aanwezig zijn. Het isoleren van mycobacteriën afkomstig van stalen met negatieve uitstrijkjes is natuurlijk wel moeilijk te evalueren. De auteurs veronderstellen dan ook dat versterkte decontaminatie leidt tot verminderd isoleren van stalen met weinig mycobacteriën in aanwezig. Dit vinden zij nog altijd te verkiezen boven het niet versterkt decontamineren met als resultaat veel bacteriële overgroei.

Uitgaande van deze resultaten, zetten Bange et al een prospectieve studie op waarbij ze elk staal op twee manieren decontamineerden: NALC-NaOH op zich en NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur. In totaal werden zo 414 stalen behandeld (afkomstig van 148 CF-patiënten). Er was wel een hoge graad van contaminatie: met NALC-NaOH waren 57% van de stalen gecontamineerd, met NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur nog steeds 26%. Van deze 414 stalen werden er 11 positief bevonden voor mycobacteriën. Elke decontaminatiemethode op zich leidde slechts tot 8 positieve resultaten, waarvan 5 gemeenschappelijk. Bij de NALC-NaOH methodewaren de 3 stalen positief bevonden met NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur methode, gecontamineerd. De 3 stalen positief bevonden na decontaminatie NALC-NaOH, waren negatief na decontaminatie met NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur. Van deze 3 stalen was het uitstrijkje ook negatief. Hieruit concludeerden de auteurs dat oxaalzuur vals negatieve resultaten kan geven, zeker bij de stalen met een lage titer aan mycobacteriën. (addendum 7)

Twee-staps decontaminatie

Daarom stelden Bange et al. een twee-staps decontaminatie voor: eerst gewoon decontamineren met NALC-NaOH en indien toch contaminatie optreedt, dan vanaf de gegroeide cultuur opnieuw decontamineren met NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur. Zo hebben zij 920 stalen afkomstig van 239 patiënten behandeld. Na de eerste stap werd bij 31 stalen groei van mycobacteriën vastgesteld, echter 415 stalen (45%) bleef gecontamineerd. Daarop werd dan de 2^o stap van de decontaminatie toegepast, wat resulteerde in een bijkomende isolatie van mycobacteriën uit 10 stalen en slechts een uiteindelijke contaminatie van 67 stalen (7,3%). (addendum 8) Vanuit hun resultaten suggereren ze dat deze twee-staps decontaminatie het isoleren van mycobacteriën kan verbeteren bij fel gecontamineerde stalen, zoals respiratoire stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten.

Prevalentie

literatuur

Smith et al. (UK, 1984) hebben over een periode van 6 jaar hun mucoviscidosepatiënten periodisch gescreend naar de aanwezigheid van mycobacteriën. Het ging hier om 223 patiënten met een gemiddelde leeftijd van 22 jaar (11-50 jaar). Bij 7 van hen werden zuur-vaste bacillen gezien, bij 3 ging het om *M. tuberculosis*, bij 3 andere atypische mycobacteriën (*M. fortuitum*, *M. chelonae* en 1 niet te classeren) en van 1 patiënt konden de mycobacteriën niet geïsoleerd worden omwille van contaminatie van het medium.

Hjelte et al (Zweden 1990) bestudeerden prospectief 54 patiënten met mucoviscidose, met een gemiddelde leeftijd van 18 jaar (3-67 jaar). Ten minste 3 uitstrijkjes en 3 culturen voor mycobacteriën werden gemaakt per patiënt, behalve bij 8 patiënten die moeilijk sputum konden ophoesten. Bij 6 patiënten werden mycobacteriën geïsoleerd. De culturen toonden *M. tuberculosis* (1 patiënt), MAC (3 patiënten), *M. kansasii* (1 patiënt) en 1 niet te classeren mycobacterie (1 patiënt).

Kilby et al (US 1992) bestudeerden een populatie van 87 mucoviscidosepatiënten met een gemiddelde leeftijd van 28 jaar (18-64 jaar) over een periode van 11 jaar. Bij het aanmelden in het centrum en bij onverklaarde verslechtering van de toestand werd sputum afgenomen voor zuur-vaste kleuring en cultuur van mycobacteriën. Dit bracht het aantal stalen op 297. De stalen werden gedecontamineerd met 0,25% NALC-1% NaOH. Van elk staal werden 2 LJ geënt en van een deel van de stalen werd ook een BacTec (7H12B) flesje geïnoculeerd. Ongeveer een kwart van alle stalen (67/297) waren niet interpreteerbaar ten gevolge van bacteriële overgroei. Bij 6 patiënten waren alle stalen overgroeid. Bij 17 (20%) patiënten was er ten minste één cultuur positief voor mycobacteriën. Het betrof hier 11 patiënten met MAC, 3 met *M. chelonae*, 2 met een combinatie van beide en één patiënt met *M. fortuitum*.

Aitken et al (US 1993) screenden 64 mucoviscidosepatiënten op de aanwezigheid van mycobacteriën over verloop van 1 jaar. Bij elke patiënt werd één staal afgenomen en indien positief voor AFB of gecontamineerd werd nog een tweede afgenomen. De stalen werden gecontamineerd met de NALC-NaOH methode. Van elk staal werden 1 LJ, 1 Middlebrook en 1 BacTec flesje (7H12B) geënt. Op 77 culturen moesten er 13 onderbroken worden wegens contaminatie. Bij 8 van de 64 patiënten waren de sputumculturen positief voor atypische mycobacteriën (7 patiënten met MAC en 1 patiënt met *M. fortuitum*). Bij 3 van deze 8 waren de culturen meermaals positief. Twee patiënten hadden positieve uitstrijkjes.

Hjelt et al (Denemarken, 1994) screenden 185 patiënten met een gemiddelde leeftijd van 15 jaar (2-38 jaar) aan de hand van drie stalen verkregen per patiënt over een periode van 3 maand. De sputumstalen werden verkregen via ophoesten of via laryngeale suctie. Uitstrijkjes werden gekleurd met auramine. De decontaminatie gebeurde met een mengsel van 4% oxaalzuur en 5% NALC. De stalen werden ingezet op LJ-buizen. Bij 6 patiënten werden mycobacteriën eenmalig in het sputum geïsoleerd (4 met *M. gordonae* en telkens 1 patiënt met *M. fortuitum* en MAC), bij 3 patiënten meermalig (2 *M. abscessus* en 1 MAC). In de vier volgende jaren van follow-up werden bijkomend nog bij vier patiënten meermalig positieve culturen vastgesteld (*M. abscessus*).

Oliver et al (Spanje 2001) onderzochten de prevalentie van atypische mycobacteriën bij 37 mucoviscidosepatiënten met een gemiddelde leeftijd van 21 jaar (4-48 jaar). Van elke patiënt werden twee sputumstalen binnen de week afgenomen. Indien het uitstrijkje positief was, werden bijkomende sputumstalen afgenomen 1/week gedurende minstens 3 maand. De zuur-vaste kleuring werd uitgevoerd met auramine. Twee decontaminatiemethodes werden vergeleken na digestie met NALC: oxaalzuur of NaOH. Van elk staal werd een Coletsos medium en een LJ-buis geënt en een ESP-medium (vloeibaar) na decontaminatie met oxaalzuur. Bij 6 (16%) patiënten was de cultuur positief voor zuur-vaste bacillen (3 *M. chelonae*, 2 MAC en 1 *M. scrofulaceum*). Bij 3 patiënten was er minstens één positief uitstrijkje en persisterende positieve culturen.

Olivier et al (US 2003) onderzochten bij zo'n 10% (986) van de mucoviscidosepatiënten in de US van 10 jaar of ouder, de respiratoire stalen op de aanwezigheid van mycobacteriën. Gedurende 3 consecutieve consultaties in een tijdspanne van ongeveer 1 jaar werden sputumstalen afgenomen. De uitstrijkjes werden gekleurd met auramine of carbol-fuchsine. Er werd gedecontamineerd met NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur. De stalen werden ingezet op LJ en in BacTec 7H12B flesjes. Van de 2958 stalen hadden 3% onvoldoende volume en waren 4% overgroeid met *P. aeruginosa*. De prevalentie van atypische mycobacteriën bedroeg 13%. De prevalentie varieerde wel volgens de regio en ging van 7 tot 24%. De cumulatieve frequentie van isolatie van mycobacteriën van drie seriële sputumstalen was 7, 10 en 13%. Van 128 patiënten werden in totaal 140 mycobacteriële stammen geïsoleerd: 116 hadden één speciës en 12 hadden twee speciës. De meest voorkomende speciës waren MAC (72%) en *M. abscessus* (16%). Van deze 128 patiënten hadden 90 (70%) één op drie, 21 (16%) twee op drie en 17 (13%) alle drie de sputumstalen positief voor cultuur. Uitstrijkjes

waren positief bij 33 (25%) van de patiënten met een positieve cultuur. Vijfentwintig patiënten (20% van cultuur-positieve patiënten, 3% van totaal aantal patiënten) voldeden aan de ATS criteria voor longziekte met NTM.

Voor overzicht: zie addendum 9.

Andere Belgische referentiecentra voor mucoviscidose

AZ VUB

Sedert een 2-tal jaar worden de patiënten gescreend en dit één maal per jaar en bij klinische achteruitgang. Ze maken gebruik van de 2-stapsdecontaminatie volgens Bange et al., 2002. Ze hebben reeds 3 patiënten met M. abscessus geïsoleerd. Dit heeft zeker zijn belang, aangezien geen longtransplantaties worden uitgevoerd als M. abscessus geïsoleerd wordt, nochtans is dit volgens de ATS geen contra-indicatie.

Centre Muco Erasme

Hier worden 150 volwassen patiënten gevolgd die sedert 2 à 3 jaar 1/jaar gescreend worden. Voor de decontaminatie maakt men gebruik van de NALC-NaOH methode en indien het staal blijvend gecontamineerd is, herhaalt men deze methode nog eens. Men heeft ondertussen 2 à 3 maal mycobacteriën kunnen isoleren.

Mucocentrum Antwerpen – St. Vincentiusziekenhuis (volwassen patiënten)

De cultuur voor mycobacteriën wordt hier regelmatig aangevraagd, men decontamineert met NALC-NaOH, er werden reeds atypische mycobacteriën geïsoleerd, doch men kon geen statistieken geven.

Universitair Ziekenhuis Antwerpen (kinderen)

Screening gebeurt hier niet systematisch, wel indien een bronchoscopie is uitgevoerd en op indicatie. Er wordt gedecontamineerd met een in-huis methode ontwikkeld door professor Pattyn, deze methode is niet specifiek voor stalen afkomstig van mucoviscidosepatiënten. Men heeft hier nog geen positieve resultaten.

UZ Gent

De mucoviscidosepatiënten worden hier sedert 3 à 4 jaar gescreend 1/jaar. Men gebruikt de NALC-NaOH methode om te decontamineren en men heeft nog geen positieve resultaten.

CHR Citadelle

De 80 mucoviscidosepatiënten (35-tal volwassenen) worden sedert 4 jaar gescreend 1/jaar en bij klinische achteruitgang. Er wordt met NaOH gedecontamineerd. Reeds 2 atypische mycobacteriën werden geïsoleerd bij tieners.

Cliniques St. Luc

Hier worden een 130-tal patiënten (38% volwassenen) opgevolgd en sedert 10 jaar gescreend voor atypische mycobacteriën. Deze screening gebeurt niet systematisch, maar wel bij klinische achteruitgang, hospitalisatie en toename van de sputumproductie. Men gebruikt NALC-NaOH om te decontamineren en bij contaminatie past men oxaalzuur toe. Reeds 1 M. chelonae werd geïsoleerd.

Studie nog lopend in UZ Leuven

Van 80 volwassen mucoviscidosepatiënten wordt prospectief de prevalentie van (atypische) mycobacteriën onderzocht. De sputumstalen worden gekleurd met de auraminekleuring en

gedecontamineerd met de 2-stapsdecontaminatie volgens Bange et al. Tot nu toe zijn een 30 tal stalen op het labo toegekomen waarvan ondertussen een 10-tal de 2^o stap van de decontaminatieprocedure ondergaan hebben. Voorlopig zijn nog geen mycobacteriën geïsoleerd.

1.3 Klinische impact

1.3.1 Diagnostisch

-Kunnen andere (evt. niet-labo) testen vermeden/vervallen worden?

-Levert de test supplementaire en/of meer adequate informatie, niet verkrijgbaar door andere onderzoeken?

Voor de diagnose van longziekte met atypische mycobacteriën heeft de American Thoracic Society (ATS) criteria opgesteld. Het betreft hier zowel klinische als radiologische als microbiologische criteria (zie addendum 10). Wat betreft de meest frequente speciës in verband met specifieke pathologie, zie addendum 11. Om de diagnose effectief te stellen dienen alle drie de criteria positief beantwoord te zijn. Bovendien vormen patiënten met mucoviscidose een groep vol uitdagingen wat betreft de diagnose van longziekte met atypische mycobacteriën omdat de kliniek van beide aandoeningen elkaar overlapt. Immers, mucoviscidose is een chronische longziekte die gekenmerkt wordt door progressief verslechteren van klinische toestand, de radiologische verandering typisch voor atypische mycobacteriën zijn moeilijk te differentiëren van radiologische verandering van mucoviscidose, zodat cultuur essentieel is in de diagnose. Algemeen wordt daarom regelmatige screening aangeraden, regelmatig wordt meestal niet gespecificeerd, sommige spreken over 3-maandelijks (Saiman et al., 2003), andere slechts 1/jaar (UpToDate), meestal wordt die screening dan ook breder gezien, in de context van inventaris opmaken van alle aanwezige (potentiële) pathogenen.

1.3.2 Therapeutisch

- Kan een behandeling sneller gestart of juist vermeden worden door deze test?

Bij een positieve cultuur voor atypische mycobacteriën wordt voorlopig aangeraden om onderhoudstherapie met macroliden uit te stellen, dit om geen resistentie-inductie te verkrijgen bij de atypische mycobacteriën.

In sommige centra is de aanwezigheid van atypische mycobacteriën een contra-indicatie voor longtransplantatie, alhoewel dit geen strikte contra-indicatie is volgens ATS.

Indien de cultuur positief is voor atypische mycobacteriën en infectie meer waarschijnlijk is dan kolonisatie, lijkt behandeling gerechtvaardigd. Voor die behandeling met anti-mycobacteriële middelen, dient men sequentieel drugs toe te voegen over 1 à 2 weken aan een schema bestaande uit verschillende middelen. Voor specifieke drugs actief tegen atypische mycobacteriën bij mucoviscidosepatiënten zie addendum 12 en algemene anti-mycobacteriële therapie zie addendum 13. Drug monitoring kan nuttig zijn omwille van ander metabolisme bij CF-patiënten. In vitro testing van voor mycobacteriën niet behorend tot het MAC complex is aangewezen en daarnaast ook wanneer patiënten na 6 maand nog niet beantwoorden aan therapie.

Bovendien kan eventueel vermeden worden dat overbodige therapieën tegen routine pathogenen bij mucoviscidosepatiënten gestart worden.

Oliver et al vermeldden dat na therapie voor atypische mycobacteriën de patiënt van de wachtlijst voor longtransplantatie kon geannuleerd worden, zodat een meer invasieve behandeling kon vermeden worden.

- Kan een behandeling optimaler worden toegediend?

Niet van toepassing

- Kan een toxisch effect van de behandeling vermeden worden?

Niet van toepassing

1.3.3 Outcome**literatuur**

Smith et al. (UK, 1984) hebben over een periode van 6 jaar bij 7 patiënten mycobacteriën geïsoleerd, waaronder 3 atypische mycobacteriën. Deze bevinding was onverwacht, want bij geen enkele patiënt werd op klinische gronden de aanwezigheid van mycobacteriën vermoed, alhoewel bij alle drie een toename was in hoesten en sputum productie en één patiënt last had van nachtzweeten. Bij 2/3 patiënten waren abnormaliteiten in het radiologisch beeld bij de isolatie van mycobacteriën, bij de patiënt met de niet te klasseren atypische mycobacterie waren geen voorafgaande radiologische opnames. De patiënt met de niet te klasseren atypische mycobacterie, had slechts een eenmalige positieve cultuur. Klinisch presenteerde de patiënt zich met een toename van hoesten en sputumproductie op het moment van isolatie. In de twee jaren volgend op de isolatie werden geen mycobacteriën meer geïsoleerd, nochtans was er toename van de abnormaliteiten op radiologisch vlak. De patiënt werd niet behandeld. De patiënten met *M. chelonae* en *M. fortuitum* werden wel behandeld, helaas beantwoordde de patiënt met *M. fortuitum* niet aan therapie en overleed 5 maand later, met bevestiging van mycobacteriële infectie bij autopsie. De patiënt waarbij *M. chelonae* werd geïsoleerd beantwoordde wel aan therapie en ging klinisch beter na 3 maand en ook op radiologisch vlak zag men verbetering.

Hjelte et al (Zweden 1990) vonden bij 6/54 mucoviscidosepatiënten mycobacteriën, waaronder 5 atypische mycobacteriën (3 MAC, 1 *M. kansasii* en 1 niet te klasseren). Bij diagnose waren alle 5 achteruitgegaan, klinisch met gewichtsverlies, radiologisch met toename abnormaliteiten op longfoto's en tevens werd een verslechtering van longfunctie vastgesteld. Ze kloegen bovendien van intermitterende koorts en één patiënt had last van nachtzweeten. Alle patiënten werden behandeld en alle patiënten gingen klinisch beter na therapie.

Kilby et al (US 1992) bestudeerden een populatie van 87 mucoviscidosepatiënten, bij 17 (20%) patiënten was er ten minste één cultuur positief voor mycobacteriën. Het betrof hier 11 patiënten met MAC, 3 met *M. chelonae*, 2 met een combinatie van beide en één patiënt met *M. fortuitum*. Bij vergelijking van klinische gegevens van mucoviscidosepatiënten met/zonder isolatie van mycobacteriën konden geen significante verschillen worden vastgesteld, behalve dat mucoviscidosepatiënten met atypische mycobacteriën ouder waren. Wel beschrijven ze één vrouw bij wie op 20-jarige leeftijd mucoviscidose werd vastgesteld, aanvankelijk waren uitstrijkje en cultuur van sputum negatief voor mycobacteriën. Ongeveer 4 jaar later, kreeg ze last van inspanningsdyspnoe, toegenomen hoest, anorexie en gewichtsverlies. Het uitstrijkje was positief voor AFB en de cultuur isoleerde MAC. Daarnaast werden *S. aureus* en *P. aeruginosa* geïsoleerd. Patiënte werd behandeld met parenterale antibiotica en verbeterde klinisch. Verschillende maanden later, ontwikkelde patiënte terug verslechtering van longfunctie en van longfoto naast gewichtsverlies. De sputumculturen toonden *S. aureus*, *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* aan, naast de blijvende aanwezigheid van MAC. Antibacteriële therapie zorgde terug voor klinische verbetering. Na even genegativeerd voor AFB, waren uitstrijkje en cultuur terug positief voor MAC enkele maanden later. Ongeveer één jaar later werden radiologische abnormaliteiten vastgesteld, daarnaast was er terug gewichtsverlies. Er

was geen sprake van nachtzweeten of koorts. Anti-mycobacteriële therapie werd opgestart, wat resulteerde in verbeterde inspanningscapaciteit, gewichtstoename en opklaring van de abnormaliteiten te zien op longfoto's. Na anderhalf jaar therapie waren alle uitstrijkjes negatief voor AFB, enkel twee (van de tien) culturen waren nog positief voor AFB. De longfunctie bleef stabiel na initiatie van de therapie.

Aitken et al (US 1993) screenen 64 mucoviscidosepatiënten, bij 8 van de 64 patiënten waren de sputumculturen positief voor atypische mycobacteriën (7 patiënten met MAC en 1 patiënt met *M. fortuitum*). Bij 3 van deze 8 waren de culturen meermaals positief. Twee patiënten hadden positieve uitstrijkjes. Bij één van beide bleef men herhaaldelijk MAC isoleren zonder klinische achteruitgang. Bij de andere patiënt met herhaaldelijke AFB kende wel een slechte klinische achteruitgang met gewichtsverlies. Anti-mycobacteriële therapie werd gestart. Twee maand later werd die gestopt omwille van nevenwerkingen en werd met een meer agressieve therapie ten opzichte van *P. aeruginosa* gestart. Hierop ging patiënt klinisch beter.

Over het algemeen vonden de auteurs wel een tendens bij patiënten waarbij wel atypische mycobacteriën geïsoleerd werden tot hogere leeftijd en lagere klinische scores, doch niet significant.

Hjelt et al (Denemarken, 1994) screenen 185 patiënten en vonden bij 7 patiënten meermalig atypische mycobacteriën (5 *M. abscessus* en 2 MAC). Bij 5 werd therapie opgestart (4 *M. abscessus* en 1 MAC). Bij 2 patiënten leek de atypische mycobacterie spontaan te verdwijnen (1 *M. abscessus* onder therapie en 1 MAC zonder therapie). Bij de andere vier kon de mycobacterie niet geïradiceerd worden. Bij 3 patiënten met klinisch stabiele toestand, werd toch therapie opgestart, bij één patiënt leek de mycobacterie schijnbaar spontaan te verdwijnen. Twee patiënten leken beter te gaan onder anti-mycobacteriële therapie alhoewel ze gelijktijdig ook voor andere pathogenen behandeld werden: *P. aeruginosa* en respectievelijk *A. fumigatus* en *S. aureus*.

Oliver et al (Spanje 2001) onderzochten 37 mucoviscidosepatiënten, bij 3 patiënten was er minstens één positief uitstrijkje en persisterende positieve culturen (2 *M. chelonae*, 1 MAC). Deze 3 patiënten ondervonden klinische achteruitgang voor en tijdens de studie, zodat 2 behandeld werden. Eén patiënt stond op de wachtlijst voor een longtransplantatie omwille van ernstige en progressieve longdeterioratie. Voorafgaand aan de studie had de patiënt last van koorts, anorexie, gewichtsverlies en dyspnoe. Ondanks verschillende kuren met iv antibiotica verslechterden de hoest en longstatus. Herhaaldelijk werd *M. chelonae* geïsoleerd, terwijl de cultuur voor typische CF-pathogenen negatief bleef. Therapie werd opgestart met verbetering van inspanningstolerantie en gewichtstoename, vier maand na het starten verbeterde de longfunctie naar het oorspronkelijk niveau. De uitstrijkjes en culturen voor AFB zijn sedert therapie negatief en de patiënt staat niet langer op de wachtlijst voor een longtransplantatie. Een andere patiënt had last van persisterende productieve hoest, hemoptoë, dyspnoe en zwakke respons op antibiotica sedert ongeveer een jaar voor isolatie van mycobacteriën. De culturen isoleerden MAC en *S. aureus*, anti-mycobacteriële therapie werd opgestart wat zijn pulmonaire status verbeterde. Zes maand na starten van therapie was de patiënt in goeden doen en vereiste geen andere antibiotica. Sputumstalen verkregen 2 en 4 maand na initiëren van therapie bleven negatief voor AFB. Een derde patiënt had herhaaldelijk culturen met *M. chelonae*, maar met een stabiele longfunctie zodat geen therapie gestart werd. De auteurs besluiten dat alleen die patiënten met herhaaldelijk positieve uitstrijkjes eerder geïnfecteerd dan gekoloniseerd zijn. (In tegenstelling tot patiënten met positieve culturen en negatieve uitstrijkjes die eerder gekoloniseerd dan geïnfecteerd zijn.) Olivier et al (US 2003) onderzochten bij zo'n 10% (986) van de mucoviscidosepatiënten in de US van 10 jaar of ouder, de respiratoire stalen op de aanwezigheid van mycobacteriën. De prevalentie bedroeg 13% (128 patiënten). Vijfentwintig patiënten (20% van cultuur-positieve patiënten, 3% van totaal aantal patiënten) voldeden aan de ATS criteria voor longziekte met

NTM. In vergelijking met patiënten negatief voor cultuur verschilden de patiënten positief voor cultuur op de volgende vlakken: leeftijd (cultuur-positieve patiënten gemiddeld 4 jaar ouder), longfunctie (beter), hogere frequentie van *S. aureus*, minder frequentie *P. aeruginosa* en een lagere body mass index (BMI). Patiënten die voldeden aan de microbiologische criteria van ATS waren ouder, maar met een ongeveer gelijke longfunctie in vergelijking met patiënten met een lagere belasting met mycobacteriën. Hun longfunctie leek sneller achteruit te gaan dan bij de patiënten die niet voldeden aan de microbiologische criteria van ATS voor longziekte met NTM, maar dit was niet significant over verloop van 15 maand. Hun high resolution computer tomography (HRCT) beelden daarentegen vertoonden wel significant meer achteruitgang in vergelijking met patiënten negatief voor ATS criteria, alhoewel slechts bij een klein aantal personen werd uitgevoerd (11 in totaal).

1.4 Organisatorische impact

Voorlopig is het afwachten wat de prevalentie van atypische mycobacteriën bedraagt bij mucoviscidosepatiënten in het UZ Leuven.

Daarna kan de 2-stapsdecontaminatie aangeleerd worden aan de laboranten, enkel de 2° stap vanzelfsprekend, met de eerste stap zijn ze zeer vertrouwd.

Eventueel kan ook de aanvraagbon 3030 aangepast worden, zodat cultuur voor mycobacteriën direct aanvraagbaar is bij mucoviscidosepatiënten.

1.5 Financiële impact

De terugbetaling voor de cultuur van mycobacteriën bedraagt 11,04€ de kostprijs bedraagt ongeveer 8,99€, indien secundair gedecontamineerd moet worden, kan de kostprijs op ongeveer het dubbele geraamd worden

1.6 Impact/Decision Making

To do

1. resultaten van prospectieve studie afwachten
2. opleiding laboranten 2° stap
3. aanpassingen aan aanvraagbon 3030

cultuur ↓	respiratoir specimen	fungi ↓
<input type="checkbox"/>	sputum	45 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	bronchus of endotrach.aspiraat	46 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	bronchuslavage/BAL	47 <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	monster van mucoviscidosepatiënt	49 <input type="checkbox"/>
	atypische mycobacteriën, enkel voor mucoviscidosepatiënt	<input type="checkbox"/>

Addendum 1: sensitiviteit van BACTEC 960 MGIT in vergelijking met vast medium (Löwenstein-Jensen) en BACTEC 460TB. (indien significant verschillend vermeld in de studie, aangeduid in kleur (systeem dat significant beter werkt in groen tov systeem dat minder werkt in rood))

Studie met aantal isolaten	Sensitiviteit (in %)								
	Totaal (alle mycobacteriën)			MTB (mycobacterium tuberculosis)			NTM (atypische mycobacteriën)		
	MGIT	LJ	460TB	MGIT	LJ	460TB	MGIT	LJ	460TB
Hanna et al. (362)	80	69	75	77	80	90	81	63	66
Leitritz et al. (127)	78	61	91	90	79	93	69	47	90
Tortoli et al (236)	80	71	85	88	74	92	61	64	72
Kanchana et al (104)	77	59	90	92	82	97	58	24	82
Scarparo et al. (122)	59	58	82	92	77	96	39	47	73

Addendum 2: Specificiteit van BACTEC MGIT 960 in vergelijking met vast medium (Löwenstein-Jensen) en BACTEC 460TB.

Studie en aantal stalen – isolaten	Specificiteit (in %)		
	MGIT	LJ	460
Hanna et al. (3330-362)	92	81	95
Leitritz et al. (2624-127)	92	94	95
Tortoli et al. (2567-104)	90	84	96
Kanchana et al. (1742-122)	94	89	97
Scaraparo et al. (1093-43)	90	96	95

Addendum 3: Sensitiviteit van BACTEC MGIT 960 indien het toestel alleen wordt gebruikt in vergelijking met combinatie van het toestel met een vast medium.

Studies	Sensitiviteit (in %)					
	totaal		MTB		NTM	
	MGIT	MGIT+vast	MGIT	MGIT+vast	MGIT	MGIT+vast
Hanna et al.	80	93	77	92	81	93
Leitritz et al.	78	81	89	94	69	70
Tortoli et al.	80	90	88	94	61	81
Kanchana et al.	77	77	92	92	58	58
Scarparo et al.	59	80	92	98	39	68

Addendum 4: zuur-vaste kleuring: evaluatie en rapportering

Aantal AFB gezien via kleuringsmethode en vergroting			
Rapportering	Fuchsine kleuring	fluorochroomkleuring	
	X1000	X250	X450
Geen AFB gezien	0	0	0
Twijfelachtig, herhaling aangewezen	1-2/300 velden	1-2/30 velden	1-2/70 velden
1+	1-9/100 velden	1-9/10 velden	2-18/50 velden
2+	1-9/10 velden	1-9/veld	4-36/10 velden
3+	1-9/veld	10-90/veld	4-36/veld
4+	>9/veld	>90/veld	>36/veld

Addendum 5: decontaminatie van 30 stalen op 3[≠] manieren (Whittier et al., 1993)

Graad van contaminatie na decontaminatie			
	NALC-NaOH	Oxaalzuur	NALC-NaOH gevolgd door oxaalzuur
LJ buis	21 (70%)	16 (53%)	4 (13%)
BacTec flesje	14 (47%)	15 (50/)	3 (10%)

Addendum 6: 5 gesimuleerde sputumstalen, besmet met *P. aeruginosa* en atypische mycobacteriën (3/5) werden opgestuurd naar 20 laboratoria, ter controle van NALC-NaOH-oxaalzuur decontaminatiemethode.

Verwachte resultaten		Bekomen resultaten	
Uitstrijkje	Cultuur	Uitstrijkje	Cultuur
3+/4+	NTM	20/20	19/20
Negatief	Negatief	18/20	19/20
1+/2+	NTM	10/20	11/20
Negatief	Negatief	20/20	20/20
3+/4+	NTM	18/20	20/20

Addendum 7: prospectieve screening van 414 stalen op 2[≠] manieren gedecontamineerd, geïnoculeerd in MGIT tubes

	NALC-NaOH	NALC-NaOH met oxaalzuur
Vals + (contaminatie)	237/414 (57%)	106/414 (26%)
Vals – (geen groei)	0	3
Echt +: atypische mycobacteriën	8/11 (5+3)	8/11 (5+3)

Addendum 8: performantie van 2-stapsdecontaminatie (Bange et al., 2002)

	1° NALC-NaOH	2° NALC-NaOH met oxaalzuur
Vals + (contaminatie)	415/920 (45%)	67/920 (7,3%)
Echt +: atypische mycobacteriën	30/920 (3%°)	(9 + 30)/920 (4%)

**Addendum 9: prevalentie van atypische mycobacteriën bij
mucoviscidosepatiënten**

Prevalentie								
Studie	Land	Aantal	Leeftijd	Screen	Decontaminatie	Media	Prevalentie	Opm
Smith et al. 1984	UK	233	11-50	Reg/6j			7/233 (3%)	3 MTB
Hjelte et al. 1990	Zweden	54	3-67	3:3j			6/54 (11%)	1 MTB
Kilby et al. 1992	US	87	18-64	?/11j	NALC-NaOH	LJ + 460TB	17/87 (19%)	
Aitken et al. 1993	US	64	17-50	1/j	NALC-NaOH	LJ+ 7H11 + 460TB+	8/64 (12%)	
Hjelt et al. 1994	Denemarken	185	2-38		NALC+oxaalzuur	LJ	9/185 (5%)	
Oliver et al. 2001	Spanje	37			NALC+oxaalzuur	LJ+ ESP	6/37 (16%)	
Olivier et al. 2003	US	986	>10j	3/j	NALC-NaOH + oxaalzuur	LJ+ 460TB	128/986 (13%)	Variatie volgens ligging 7-24%

Addendum 10: diagnostische criteria voor longziekte door atypische mycobacteriën volgens American Thoracic Society (ATS 1997)

TABLE 1
CRITERIA FOR DIAGNOSIS OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA PULMONARY DISEASE

Presumed or Confirmed HIV Seronegative Potential Risk Factors		Presumed or Confirmed HIV Seropositive Potential Risk Factors
I. Local immune suppression	II. General severe immune suppression	
Alcoholism (<i>M. avium</i> complex)	Leukemia	CD4 count < 200
Bronchiectasis	Lymphoma	
Cyanotic heart disease	Organ transplantation	
Cystic fibrosis	Other immunosuppressive therapy	
Prior mycobacterial disease		
Pulmonary fibrosis		
Smoking/chronic obstructive lung disease		
None		
1. Clinical criteria	a. Same	a. Same
a. Compatible signs/symptoms (cough, fatigue most common; fever, weight loss, hemoptysis, dyspnea may be present, particularly in advanced disease) with documented deterioration in clinical status if an underlying condition is present and		
b. Reasonable exclusion of other disease (e.g., tuberculosis, cancer, histoplasmosis) to explain condition, or adequate treatment of other condition with increasing signs/symptoms	b. Same	b. Same
2. Radiographic criteria	a. Same	a. Same
a. Any of the following chest X-ray abnormalities; if baseline films are more than 1 yr old, should be evidence of progression		
• Infiltrates with or without nodules (persistent \geq 2 mo or progressive)		
• Cavitation		
• Nodules alone (multiple)		
b. Any of these HRCT abnormalities	b. Same	b. Same
• Multiple small nodules		
• Multifocal bronchiectasis with or without small lung nodules		
3. Bacteriologic criteria	a. Same	a. Same
a. At least three available sputum/bronchial wash samples within 1 yr		
• Three positive cultures with negative AFB smears		
or		
• Two positive cultures and one positive AFB smear		
or		
b. Single available bronchial wash and inability to obtain sputum samples	b. Same except	b. Same except
• Positive culture with 2+, 3+, or 4+ growth	• Culture positive with 1+	• Culture positive with 1+
or	or greater growth	or greater growth
• Positive culture with a 2+, 3+, or 4+ AFB smear		(excludes <i>M. avium</i> complex)
or		
c. Tissue biopsy	c. Same	c. Same
• Any growth bronchopulmonary tissue biopsy		
• Granuloma and/or AFB on lung biopsy with one or more positive cultures from sputum/bronchial wash		
• Any growth from usually sterile extrapulmonary site		

For a diagnosis of pulmonary disease, all three criteria—(1) clinical, (2) radiographic, and (3) bacteriologic— must be satisfied.

Addendum 11: Classificatie van atypische mycobacteriën bij mensen geïsoleerd volgens American Thoracic Society (ATS 1997)

TABLE 2
CLASSIFICATION OF THE NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA RECOVERED FROM HUMANS

Clinical Disease	Common Etiologic Species	Features of the Common Species		Unusual Etiologic Species
		Geography	Morphologic Features*	
Pulmonary disease	1. <i>M. avium</i> complex	Worldwide	Usually not pigmented; slow growth (> 7 d)	1. <i>M. simiae</i> 2. <i>M. szulgai</i>
	2. <i>M. kansasii</i>	USA, coal mining regions, Europe	Pigmented; often large and beaded on acid-fast stain	3. <i>M. fortuitum</i> 4. <i>M. celatum</i>
	3. <i>M. abscessus</i>	Worldwide but mostly USA	Rapid growth (< 7 d); not pigmented	5. <i>M. asiaticum</i> 6. <i>M. shimodii</i>
	4. <i>M. xenopi</i>	Europe, Canada	Slow growth; pigmented	7. <i>M. haemophilum</i>
	5. <i>M. malmoense</i>	UK, northern Europe	Slow growth, not pigmented	8. <i>M. smegmatis</i>
Lymphadenitis	1. <i>M. avium</i> complex	Worldwide	Usually not pigmented	1. <i>M. fortuitum</i>
	2. <i>M. scrofulaceum</i>	Worldwide	Pigmented	2. <i>M. chelonae</i>
	3. <i>M. malmoense</i>	UK, northern Europe (especially Scandinavia)	Slow growth	3. <i>M. abscessus</i> 4. <i>M. kansasii</i> 5. <i>M. haemophilum</i>
Cutaneous disease	1. <i>M. marinum</i>	Worldwide	Photochromogen; requires low temperatures (28–30° C) for isolation	1. <i>M. avium</i> complex 2. <i>M. kansasii</i> 3. <i>M. nonchromogenicum</i>
	2. <i>M. fortuitum</i>	Worldwide, mostly USA	Rapid growth; not pigmented	4. <i>M. smegmatis</i>
	3. <i>M. chelonae</i>			5. <i>M. haemophilum</i>
	4. <i>M. abscessus</i>	Australia, tropics, Africa, SE Asia	Grows slowly, pigmented	
	5. <i>M. ulcerans</i>			
Disseminated disease	1. <i>M. avium</i> complex	Worldwide	Isolates from patients with AIDS usually pigmented (80%)	1. <i>M. abscessus</i> 2. <i>M. xenopi</i> 3. <i>M. malmoense</i>
	2. <i>M. kansasii</i>	USA	Photochromogen	4. <i>M. genavense</i>
	3. <i>M. chelonae</i>	USA	Not pigmented	5. <i>M. simiae</i>
	4. <i>M. haemophilum</i>	USA, Australia	Not pigmented; requires hemin, often low temperatures, and CO ₂ to grow	6. <i>M. conspicuum</i> 7. <i>M. marinum</i> 8. <i>M. fortuitum</i>

* Photochromogen: isolate is buff-colored in the dark but turns yellow with brief exposure to light.

Addendum 12: behandelingsschema voor atypische mycobacteriën bij mucoviscidosepatiënten (Gibson et al., 2003)

State of the Art

935

TABLE 6. THERAPY OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA

Organism	Agents	Dosing (Route)	Monitoring
<i>Mycobacterium avium intracellulare</i> complex	Clarithromycin	15–30 mg/kg/d orally divided twice a day, max 1 g	Levels decreased by rifampin/rifabutin
	Rifampin	10–20 mg/kg/d orally, max 600 mg	Monitor CBC
	Rifabutin	5–10 mg/kg/d orally, max 300 mg	Monitor CBC
	Ethambutol	25 mg/kg/d orally	Monitor color vision and acuity
CONSIDER:	Streptomycin	500–750 mg two to three times/wk intravenously for first 8 weeks if severe	Monitor renal function, audiometry
<i>Mycobacterium abscessus</i>	Cefoxitin	200 mg/kg/d intravenously divided every 8 h, max 12 g	Monitor CBC
	Amikacin	10–15 mg/kg/d intravenously divided every 12 h	Monitor serum levels, renal function, audiogram
	Clarithromycin	15–30 mg/kg/d orally divided twice a day, max 1 g	Levels decreased by rifampin/rifabutin
CONSIDER:	Surgical debridement if infection is localized		

Definition of abbreviation: CBC = complete blood count (with differential).

Most doses are expressed as milligrams per kilogram of body weight.

Addendum 12: behandelingschema voor atypische mycobacteriën (ATS 1997)

TABLE 3
ANTIMYCOBACTERIAL AGENTS TO CONSIDER FOR SUSCEPTIBILITY TESTING
OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA

Mycobacterium Species or Group	Proven Utility Clinically Relevant	Uncertain Relevance	Susceptibility Testing Results of No Benefit
Slowly growing NTM			
<i>M. avium</i> complex	Clarithromycin*	Amikacin Ciprofloxacin Ethambutol Ethionamide Rifabutin Rifampin Streptomycin	Isoniazid Pyrazinamide
<i>M. kansasii</i>	Rifampin	Amikacin Ciprofloxacin Clarithromycin* Ethambutol Isoniazid Rifabutin Streptomycin Sulfonamide	Pyrazinamide
<i>M. marinum</i>	Doxycycline or Minocycline Ethambutol Rifampin Sulfonamide	Amikacin Ciprofloxacin Clarithromycin* Rifabutin	Isoniazid Pyrazinamide
Other slowly growing NTM			
<i>M. haemophilum</i>	Clarithromycin* [†]	Amikacin	Pyrazinamide
<i>M. malmoense</i>	Ethambutol [†]	Ciprofloxacin	
<i>M. simiae</i>	Rifampin [†]	Isoniazid	
<i>M. szulgai</i>		Rifabutin	
<i>M. xenopi</i>		Streptomycin	
Rapidly growing NTM			
<i>M. abscessus</i>	Amikacin	Cefmetazole	Clofazimine
<i>M. chelonae</i>	Cefoxitin	Imipenem	Ethambutol [†]
<i>M. fortuitum</i>	Ciprofloxacin	Ofloxacin	Isoniazid
<i>M. mucogenicum</i>	Clarithromycin*	Tobramycin (<i>M.</i> <i>chelonae</i> only)	Pyrazinamide
<i>M. smegmatis</i>	Doxycycline or Minocycline Sulfonamides		Rifampin Streptomycin

* Class drug for macrolides (clarithromycin, azithromycin, roxithromycin).

[†] Ethambutol is clinically useful for *M. smegmatis*.

[‡] Proven utility/clinically relevant for some but not all species.