

Malditof identificatie van atypische mycobacteriën

Author: Matthias Weemaes

Supervisor: Deborah Steensels, Els Oris

Date: 22/05/2018

Clinical bottom line

Snelle mycobacteriële diagnostiek is van essentieel belang voor de patiënt. Niet alleen *M. tuberculosis* maar ook non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) zijn van klinisch belang. Momenteel zijn er meer dan 150 verschillende species NTM gekend. Elke mycobacterie verschilt op vlak van intrinsiek pathogeen vermogen, antibioticagevoeligheid, biochemische eigenschappen en nog tal van andere eigenschappen van andere mycobacteriën. Waar vroeger voornamelijk gebruik gemaakt werd van biochemische en fenotypische testen om mycobacteriën te identificeren, kan men nu door optimalisatie van bestaande technieken (vloeibare groeimedia, MALDI-TOF MS, moleculaire technieken, HPLC, ...) de turn-around-time tot mycobacteriële identificatie sterk inkorten. Literatuur rond identificatie van mycobacteriën door middel van MALDI-TOF is schaars en de waarde van MALDI-TOF MS binnen de mycobacteriële diagnostiek is niet volledig duidelijk. Vooral MALDI-TOF MS analyse rechtstreeks op Mycobacteria Growth Indicator Tubes (MGIT) na extractie wordt geplaagd door 'failure of detection/identification' ten opzichte van MALDI-TOF MS analyse van mycobacteriële groei op vaste groeimedia. In deze CAT zouden we graag de klinische relevantie van mycobacteriën aanhalen, de literatuur rond MALDI-TOF MS op MGIT onderzoeken en de plaats van MALDI-TOF MS binnen de mycobacteriële diagnostiek in een labo microbiologie schetsen. Hoewel MALDI-TOF MS analyse rechtstreeks op MGIT een duidelijke meerwaarde heeft op vlak van identificatie en TAT, dient MALDI-TOF MS voorlopig gezien te worden als complementair aan andere technieken zoals bijvoorbeeld moleculaire technieken. Naarmate extractieprotocollen voor MALDI-TOF MS analyse op MGIT geoptimaliseerd worden, kan in de toekomst de MALDI-TOF MS een prominentere plek innemen in de mycobacteriële diagnostiek.

Clinical/Diagnostic scenario

Tot op heden werden in het labo microbiologie van het ZOL alle positieve MGIT's opgestuurd naar externe laboratoria ter identificatie en, indien nodig, ter uitvoering van gevoeligheidsbepalingen. Gezien de aanwezigheid van een volledig functioneel L3-labo en de nood tot kortere turn-around-time (TAT) in de mycobacteriële diagnostiek samen met een gezonde vleug wetenschappelijke interesse,

was de vraag naar het uitbouwen van dit L3-labo met meer 'in-house' uitgevoerde technieken zoals MALDI-TOF MS en sequencing aan de orde.

Momenteel wordt er van elk patiëntenstaal met een aanvraag voor mycobacteriële diagnostiek een Ziehl-kleuring gemaakt en wordt er telkens een MGIT geïnoculeerd met het patiëntenstaal. Deze MGIT wordt geïncubeerd in de BD BACTEC MGIT 960. Wanneer deze MGIT als positief gesignaliseerd wordt door het incubatietoestel, wordt deze opgestuurd naar een extern labo. Dit labo gaat door middel van PCR na of het de tuberculosebaci dan wel atypische mycobacteriën betreft. Voor *M. tuberculosis* complex wordt sowieso een antibiogram gedaan. Bij aanwezigheid van atypische mycobacteriën wordt de behandelende arts verwittigd. Indien de clinicus aangeeft dat het waarschijnlijk gaat om een klinisch relevante NTM, dan zal een extern labo voor ons de verdere identificatie doen tot op species of complex niveau. Aangezien het opsturen en het extern analyseren van stalen op aanwezigheid van mycobacteriën vaak lang duurt en een operationeel L3-labo beschikbaar is in het ZOL, werd het idee aangebracht om de MALDI-TOF MS te valideren voor het identificeren van mycobacteriën. Vanuit wetenschappelijke interesse en de nood tot het verbeteren van de huidige TAT's binnen de mycobacteriële diagnostiek, werd dit project dan ook aangevat. Kunnen we MALDI-TOF MS rechtstreeks toepassen op MGIT-stalen na extractie om mycobacteriën veel sneller te identificeren?

Question(s)

- 1) **Wat is het klinisch diagnostisch belang van mycobacteriën en hun identificatie?**
- 2) **Wat is de performantie van MALDI-TOF MS ter identificatie van atypische mycobacteriën, zowel in de literatuur als in het kader van validatie die lopende is in het labo microbiologie in het ZOL?**
- 3) **Wat is de plaats van MALDI-TOF MS voor identificatie van NTM?**

Relevant evidence/References

- (1) Falkinham JO 3rd. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J Appl Microbiol.* 2009 Aug;107(2):356-67.
- (2) Wali SO et al. The presence of atypical mycobacteria in the mouthwashes of normal subjects: role of tap water and oral hygiene. *Ann Thorac Med.* 2008 Jan;3(1):5-8.
- (3) Johnson MM, Odell JA. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *J Thorac Dis.* 2014 Mar;6(3):210-20.
- (4) Strollo SE et al. The Burden of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease in the United States. *Ann Am Thorac Soc.* 2015 Oct;12(10):1458-64.
- (5) Koh WJ. Nontuberculous Mycobacteria-Overview. *Microbiol Spectr.* 2017 Jan;5(1).
- (6) Van Ingen et al. Nontuberculeuze mycobacteriën: klinische relevant. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010;154:A1178

- (7) C.L. Daley. Nontuberculous mycobacterial infections. Eur Respir Mon 2011. 52, 115-129
- (8) Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. Clin Microbiol Rev. 2003 Apr;16(2):319-54.
- (9) Tortoli E. The new mycobacteria: an update. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006 Nov;48(2):159-78.
- (10) Vanessa Mathys. Tuberculose & Mycobactéries, rapport annuel 2016. Sciensano (WIV-ISP)
- (11) Hoefsloot W. et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 2013 Dec;42(6):1604-13.
- (12) Van Ingen J. De klinische relevantie en diagnostiek van non-tuberculeuze mycobacteriën. Tijdschrift voor infectieziekten. 2014; vol 9, nr.5.
- (13) Griffith DE et al. American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med. 2007 Feb 15;175(4):367-416.
- (14) Tanaka E et al. Yield of computed tomography and bronchoscopy for the diagnosis of *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Jun;155(6):2041-6.
- (15) Hoefsloot W et al. Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in The Netherlands. Eur Respir J. 2009 Oct;34(4):926-31.
- (16) Koh WJ et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. Chest. 2006 Feb;129(2):341-8.
- (17) Buchholz UT et al. *Mycobacterium malmoense* infections in the United States, January 1993 through June 1995. Clin Infect Dis. 1998 Sep;27(3):551-8.
- (18) van Ingen J. Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. Clin Chest Med. 2015 Mar;36(1):43-54.
- (19) Idigoras P et al. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletsos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000 May;19(5):350-4.
- (20) Piersimoni C et al. Unreliable detection of *Mycobacterium xenopi* by the nonradiometric Bactec MGIT 960 culture system. J Clin Microbiol. 2009 Mar;47(3):804-6.
- (21) Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. Med Clin North Am. 1959 Jan;43(1):273-90.

- (22) Buchan BW et al. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of *Mycobacterium* species in cultures using solid medium and broth. *Am J Clin Pathol*. 2014 Jan;141(1):25-34.
- (23) Lotz A et al. Rapid identification of mycobacterial whole cells in solid and liquid culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010 Dec;48(12):4481-6.
- (24) Mediavilla-Gradolph MC et al. Use of MALDI-TOF MS for Identification of Nontuberculous *Mycobacterium* Species Isolated from Clinical Specimens. *Biomed Res Int*. 2015;2015:854078.
- (25) Rodríguez-Sánchez Bet al. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Nontuberculous Mycobacteria from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol*. 2015 Aug;53(8):2737-40.
- (26) Leyer C. et al. Comparison of Saramis 4.12 and IVD 3.0 Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Mycobacteria from Solid and Liquid Culture Media. *J Clin Microbiol*. 2017 Jul;55(7):2045-2054.
- (27)Huang TS et al. Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. *PLoS One*. 2018 Feb 2;13(2):e0192291.
- (28) Singhal N et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015 Aug 5;6:791.
- (29)Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin Chem*. 2015 Jan;61(1):100-11.
- (30)Brown L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol*. 2015 Oct;13(10):620-30.
- (31) van Eck et al. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Fails To Identify Nontuberculous Mycobacteria from Primary Cultures of Respiratory Samples. *J Clin Microbiol*. 2016 Jul;54(7):1915-1917.
- (32)Chien JY, Yu CJ, Hsueh PR. Identification of nontuberculous mycobacteria in MGIT by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Future Microbiol*. 2016 Aug;11:1025-33.
- (33)Balada-Llasat JM, Kamboj K, Pancholi P. Identification of mycobacteria from solid and liquid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2013 Sep;51(9):2875-9.
- (34)Pranada AB et al. Accurate differentiation of *Mycobacterium chimaera* from *Mycobacterium intracellulare* by MALDI-TOF MS analysis. *J Med Microbiol*. 2017 May;66(5):670-677.
- (35)Jungblut Peter R., Hecker Michael. Proteomics of microbial pathogens. *Proteomics* 2004

1) Atypische mycobacteriën

- a. Inleiding
- b. Klinische beelden
- c. Taxonomie
- d. Prevalentie-incidentie
- e. Geografische distributie
- f. Klinische relevantie
- g. Kweken van mycobacteriën
- h. Identificatietechnieken voor identificeren van mycobacteriën

2) MALDI-TOF MS

- a. Principe (zie bijlage)
- b. Performantie MALDI-TOF MS: literatuuronderzoek
 - A) Protocolverschillen
 - B) Effect van het aantal spots op een MALDI targetplaatje
 - C) Effect van ouderdom van de stalen
 - D) Invloed van vast en vloeibaar medium
 - E) Effect database
 - F) Training in uitvoering extractie (leercurve)
 - G) Mogelijke interferenties of problemen met MALDI-TOF MS rechtstreeks op MGIT
- c. Praktisch luik
- d. Kosten analyse
- e. Plaats MALDI-TOF MS in labo microbiologie (zie vraag 3 van CAT vragen)

1) Atypische mycobacteriën

a. Inleiding

Atypische mycobacteriën zijn alomtegenwoordig. Men vindt ze terug in water (natuurwater, leidingwater, zwembaden, sauna's), in de grond (tuinieren, landbouw) en op het oppervlak van tal van toestellen (airco's, heater-cooler units).¹ Ze kunnen transiënt aanwezig zijn in de mond of zelfs deel uitmaken van de oropharyngeale flora.² Hun dikke, lipiden-rijke, hydrofobe celwand maakt dat deze bacteriën een sterke neiging hebben tot aërosolisatie, adherentie aan solide oppervlakken, het vormen van biofilm en het resistent zijn aan veel antibiotica en diverse desinfecterende middelen.

Niet alleen mensen met mucoviscidose of mensen die anti-TNF medicatie innemen lopen het risico op het ontwikkelen van een klinisch belangrijke infectie met mycobacteriën, ook gezonde mensen kunnen een mycobacteriële infectie ontwikkelen.³

Ondanks het feit dat de klinische relevantie van bepaalde mycobacteriële species nog altijd onduidelijk is en conclusieve literatuur soms nog ontbreekt, is het wel duidelijk dat identificatie van mycobacteriën in klinische stalen van primordiaal belang is in het diagnostisch en therapeutisch beleid van de patiënt. De behandeling van mycobacteriële infecties is vaak complex en brengt veel risico's met zich mee. De behandeling duurt vaak zeer lang en ernstige intoleranties of neveneffecten t.o.v. antimycobacteriële middelen worden niet zelden gezien. Een Amerikaanse studie berekende dat de kost van een patiënt met een klinische non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) infectie gelijklopend is met de kosten verbonden aan COPD-patiënten.⁴ Dit duidt op het belang van snelle en goede mycobacteriële diagnostiek.

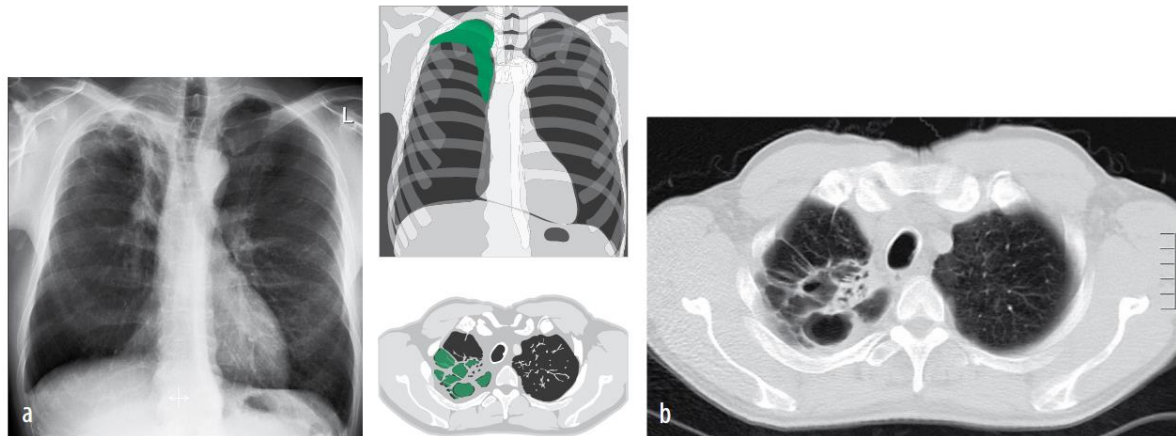
b. Klinische beelden

Pulmonaire infecties vertegenwoordigen de grootste groep binnen de klinische infecties met NTM. Minder frequent zijn de extrapulmonaire infecties met NTM zoals cervicale lymfadenitis bij kinderen, huid- en weke delen infecties na inoculatie en gedissemineerde infecties bij immuungecompromitteerde patiënten.^{3,5,6}

Risicofactoren die aanleiding geven tot NTM-ziekte zijn beschreven in de literatuur en moeten binnen het hele klinische plaatje, van mogelijke diagnose tot behandeling van NTM-infecties, mee in rekening gebracht worden. Risicofactoren voor het ontwikkelen van NTM pulmonaire infecties zijn: structureel longlijden (COPD, mucoviscidose, pneumoconiose, enz.) en immuunsuppressie (anti-TNF-alpha).³

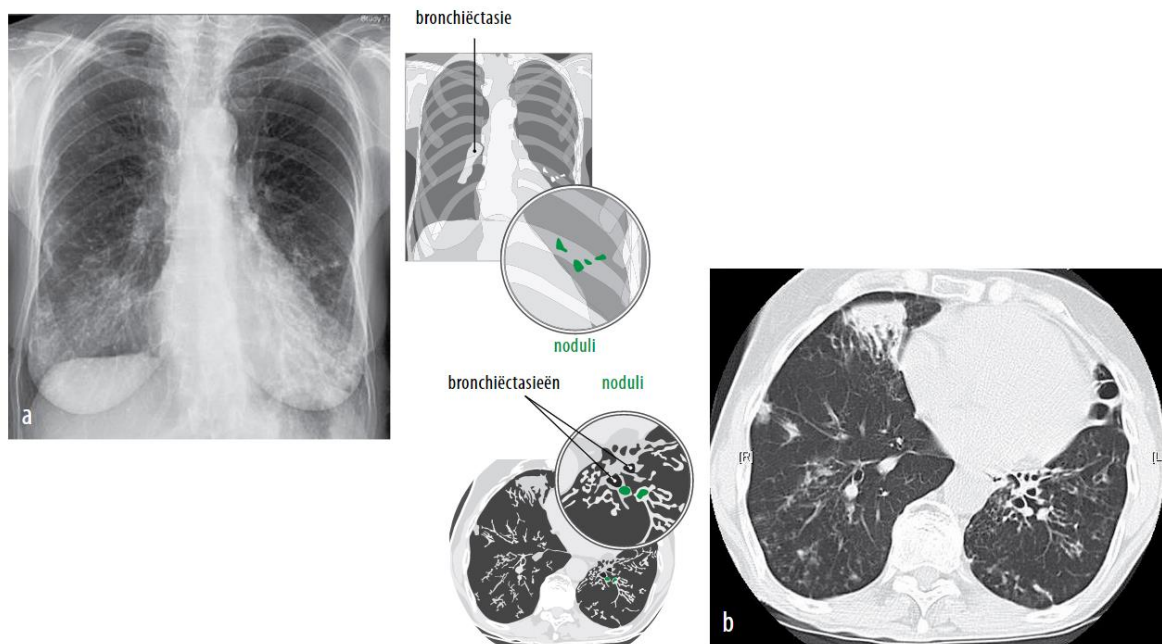
Binnen de pulmonaire NTM-infecties onderscheid men drie afzonderlijke ziektebeelden: i) holtevormende pneumonie, ii) nodulair-bronchiëctatische pneumonie en iii)

overgevoeligheidspneumonitis. De (klassieke) holtevormende pneumonie laat zich kenmerken door cavitatie die typisch plaatsvindt in de bovenkwabben, waarbij het klinisch-radiologisch onderscheid met longtuberculose zeer moeilijk tot onmogelijk is. Zoals bij longtuberculose kan er sprake zijn van langdurige hoest, moeheid en op langere termijn ook gewichtsverlies, koorts, nachtzweeten, dyspnoe, hemoptoë en anorexie. Echter, meestal is er sprake van minder snelle progressie dan bij longtuberculose. Een radiografisch representatie is te zien in figuur 1.⁶



Figuur 1 (Klassieke holtevormende pneumonie)

Ook bij de nodulair-bronchiëctatische pneumonie kan men een langdurige, weinig-productieve hoest, moeheid en gewichtsverlies documenteren bij de patiënt. Radiologische onderzoeken tonen typisch bronchiëctasiën en nodulaire afwijkingen in de lingula (linker long) en de rechter middenkwab zoals figuur 2 illustreert. Dit ziektebeeld treft een specifieke vrouwelijke populatie met een aantal typische kenmerken: postmenopauzaal, bovengemiddelde lengte, scoliose, pectus excavatum, mitralisklepprolaps en/of lage BMI. Deze patiënten zouden vaak mutaties hebben in het 'cystic fibrosis transmembrane conductance regulator'-gen (CFTR-gen).⁶ Soms spreekt men van het 'Lady Windermere syndrome', naar de gelijknamige personage (met een lichamelijke voorkomen zoals hierboven beschreven) uit een toneelstuk van Oscar Wilde.



Figuur 2 (Nodulair-bronchiëctatische pneumonie)

De derde klinische entiteit, een overgevoeligheidspneumonitis komt veel minder voor. Patiënten met dit klinisch beeld hebben vaak last van hoest, subacute dyspnoe en koorts. Belangrijk hierbij te vermelden is het feit dat deze pneumonitis veroorzaakt wordt door enerzijds infectie en bijhorende inflammatie door NTM en anderzijds ook een mycobacteriële overgevoeligheidsreactie naar analogie met de entiteit 'duivenmelkerslong', een zogenaamde chronische allergisch/inflammatoire reactie. Veelal wordt het gezien bij patiënten na bezoek aan wellness-centra ('hot tub pneumonitis') waarbij aerosolen met mycobacteriën terecht komen in de alveolen. Het radiologisch beeld wordt gekenmerkt door infiltraten en noduli in alle longvelden waarbij op hoge-resolutie CT (HRCT) matglasverdichtingen gezien kunnen worden.⁶

De meest frequente extrapulmonaire NTM-infectie is cervicale lymfadenitis, dewelke voornamelijk kinderen jonger dan zes jaar treft. Frequent worden in microbiologische stalen van de gezwellen cervicale of submandibulaire lymfeklier *M. avium*, *M. malmoeense* en de moeilijk kweekbare *M. haemophilum* gevonden.⁶

Huidinfecties met *M. marinum* worden ook niet zelden gediagnosticeerd. Deze worden veroorzaakt door inoculatie van een wondje, typisch t.h.v. extensorzijde van de hand(en), tijdens het reinigen van (tropisch) aquaria. Dermatologisch kan men een of enkele nodulaire afwijkingen observeren met eventueel ulceratieve letsels.⁶

Oorinfecties met voornamelijk *M. abscessus* komen sporadisch voor, voornamelijk bij kinderen met trommelvliesbuisjes die langdurig topische antibiotica of steroïden kregen.⁶

c.Taxonomie

Het genus *mycobacteriaceae* bestaat uit een diverse groep opportunistisch pathogenen met tot op heden meer dan 150 beschreven species. Tortoli et al. publiceerden in 2003 een review met de toen

tot dusver bekende mycobacteriële species. Drie jaar later publiceerde de groep opnieuw een review over mycobacteriën en beschreven ze reeds 30 nieuwe species.^{8,9}

Deze zeer diverse groep micro-organismen verschillen niet alleen op biochemisch vlak maar ook op vlak van klinische relevantie, antibiotica- en desinfectantia gevoeligheid, geografisch voorkomen en pathogeniciteit. (cf. infra)

Mycobacteriën zijn in vergelijking met andere non-mycobacteriële bacteriën trage groeiers, voornamelijk ten gevolge van de complexe, dikke en hydrofobe celwand. Ze worden opgedeeld in de MTC groep (*M. tuberculosis complex*), *M. leprae*/*M. lepromatosis* en de NTM (non-tuberculeuze mycobacteriën, atypische mycobacteriën). Deze laatste worden ingedeeld op basis van groeisnelheid, zodat men enerzijds de traag groeiende en anderzijds de snel groeiende mycobacteriën kan onderscheiden en op basis van pigmentaanmaak.²¹ Trage groeiers (waarneembare groei meestal pas na 7 dagen of langer) worden verder opgedeeld in type I (Runyon group I of photochromogenen d.w.z. pigmentproductie o.i.v. lichtblootstelling), type II (Runyon group II of scotochromogenen d.w.z. pigmentproductie ondanks groei in het donker) en type III (Runyon group III of non-fotochromogenen d.w.z. niet-sterk gepigmenteerd). Snel groeiende mycobacteriën vertonen meestal binnen 7 dagen waarneembare groei, traag groeiende mycobacteriën hebben meestal enkele weken nodig om te groeien. Binnen de trage groeiers zijn de meest voorkomende mycobacteriën het *M. avium complex* (MAC), *M. kansasii*, *M. xenopi* en *M. simiae*. Bij de snelle groeiers komen het *M. abscessus complex* (MABC), *M. fortuitum* en *M. chelonae* het frequenst voor.⁷ Tabel 1 geeft een overzicht van een aantal *mycobacterium species*.⁷

Traag groeiende NTM		Snel groeiende NTM	
<i>Mycobacterium arupense</i>	<i>Mycobacterium kubicae</i>	<i>Mycobacterium abscessus</i>	<i>Mycobacterium fortuitum</i>
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	<i>Mycobacterium lentiflavum</i>	<i>Mycobacterium alvei</i>	<i>Mycobacterium mageritense</i>
<i>Mycobacterium avium</i>	<i>Mycobacterium malmoense</i>	<i>Mycobacterium boenickei</i>	<i>Mycobacterium massiliense</i>
<i>Mycobacterium branderi</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	<i>Mycobacterium boletti</i>	<i>Mycobacterium mucogenicum</i>
<i>Mycobacterium celatum</i>	<i>Mycobacterium palustre</i>	<i>Mycobacterium brumae</i>	<i>Mycobacterium peregrinum</i>
<i>Mycobacterium chimaera</i>	<i>Mycobacterium saskatchewanense</i>	<i>Mycobacterium chelonae</i>	<i>Mycobacterium phocaicum</i>
<i>Mycobacterium flavescens</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium confluentis</i>	<i>Mycobacterium septicum</i>
<i>Mycobacterium florentinum</i>	<i>Mycobacterium shimodei</i>	<i>Mycobacterium elephantis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
<i>Mycobacterium gordonae</i>	<i>Mycobacterium simiae</i>	<i>Mycobacterium goodii</i>	<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>
<i>Mycobacterium heckeshornense</i>	<i>Mycobacterium szulgai</i>	<i>Mycobacterium holsaticum</i>	
<i>Mycobacterium intermedium</i>	<i>Mycobacterium triplex</i>		
<i>Mycobacterium interjectum</i>	<i>Mycobacterium terrae</i>		
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	<i>Mycobacterium ulcerans</i>		
<i>Mycobacterium kansasii</i>	<i>Mycobacterium xenopi</i>		

Tabel 1 (Overzicht enkele mycobacterium species)

d.Prevalentie – incidentie

Voor NTM is er, in tegenstelling tot tuberculose, in België geen meldingsplicht zoals in Australië wel geval is. Hierdoor kan er geen accurate rapportage gebeuren rond incidentie en prevalentie. Enerzijds ziet men een toenemend aantal stalen die naar het WIV opgestuurd worden, een weerspiegeling van de toenemende prevalentie van klinisch relevante NTM-infecties. Anderzijds kan het WIV, die jaarlijks een rapport opstellen over TBC en NTM, geen informatie geven over het percentage klinisch relevante NTM aangezien de relevante klinische informatie vaak ontbreekt bij het opgestuurde staal.¹⁰

Desalniettemin zien we dat de laatste decennia het aantal geïsoleerde NTM uit klinische stalen stijgend is. In de ontwikkelingslanden speelt tuberculose (TBC) nog altijd een grote rol in morbiditeit en mortaliteit. Echter, in de Westerse wereld, waar TBC veel minder voorkomt, kan men zelfs zeggen dat

NTM-infecties veel belangrijker geworden zijn dan TBC als men louter naar incidentie- en prevalentiecijfers kijkt. Deze stijging is enerzijds het gevolg van betere labodiagnostiek maar anderzijds ook te gevolge van een echte stijging in NTM infecties. Immers, de risicofactoren die een verhoogd risico inhouden voor patiënten voor het ontwikkelen van NTM-ziekte (COPD, anti-TNF medicatie), zijn ook stijgende.⁶

e.Geografische distributie

De distributie van mycobacteriën wereldwijd lijkt per regio en per land sterk te verschillen. Uit deze internationale studie waaraan 56 labo's (waarvan 43 Europese labo's) wereldwijd deelnamen, kan men afleiden dat het *M. avium complex* (MAC) (met hieronder ook *M. intracellulare* en *M. chimaera*) in alle landen de meest frequent geïsoleerde mycobacterie is. In België wordt ook *M. xenopi* opvallend vaak geïsoleerd in tegenstelling met heel wat andere Europese (buur)landen.¹¹

f.Klinische relevantie

De isolatie van atypische mycobacteriën uit steriele compartimenten waarbij aanwezigheid van granulomateuze ontsteking aangetoond wordt, wijzen op een relevante NTM-infectie. In andere klinische stalen moet men steeds beducht zijn op mogelijke contaminatie of kolonisatie door atypische mycobacteriën. Om contaminatie/kolonisatie uit te sluiten worden best, zoals bij tuberculose diagnostiek, opvolgstalen afgenomen. Echter, in tegenstelling tot de diagnostiek bij tuberculose waar respiratoire stalen op opeenvolgende dagen genomen worden, worden de opeenvolgende staalnames bij een patiënt verdacht voor een NTM-infectie best gespreid over enkele weken.¹² De isolatie van een NTM in een klinisch staal wilt niet noodzakelijk zeggen dat die NTM daadwerkelijk aan de basis ligt van een klinische infectie. Daarom hebben verschillende organisaties diagnostische criteria opgesteld die een leidraad kunnen zijn in het vaststellen van de klinische relevantie van atypische mycobacteriën in klinische stalen.

In de CLSI (M48-A; versie 2017) stelt men dat men als (labo-)arts rekening moet houden met het klinisch beeld, gastheerfactoren, species identificatie en het daaraan verbonden pathogeen vermogen, staalorigine en de waarschijnlijkheid van contaminatie, kwantificatie van het organisme en het aantal positieve culturen.

De American Thoracic Society (ATS) en Infectious Diseases Society of America (IDSA) hebben een aantal duidelijke criteria opgesteld om uit te maken of een NTM-isolatie uit een respiratoir staal al dan niet klinisch relevant is. Er wordt rekening gehouden met klinische, radiologische en microbiologische gegevens. Deze guideline wordt weergegeven in figuur 3.¹³

Clinical (both required)

1. Pulmonary symptoms, nodular or cavitary opacities on chest radiograph, or a high-resolution computed tomography scan that shows multifocal bronchiectasis with multiple small nodules (A, I)*

and

2. Appropriate exclusion of other diagnoses (A, I)

Microbiologic

1. Positive culture results from at least two separate expectorated sputum samples (A, II). If the results from (1) are nondiagnostic, consider repeat sputum AFB smears and cultures (C, III).

or

2. Positive culture result from at least one bronchial wash or lavage (C, III)

or

3. Transbronchial or other lung biopsy with mycobacterial histopathologic features (granulomatous inflammation or AFB) and positive culture for NTM or biopsy showing mycobacterial histopathologic features (granulomatous inflammation or AFB) and one or more sputum or bronchial washings that are culture positive for NTM (A, II)

4. Expert consultation should be obtained when NTM are recovered that are either infrequently encountered or that usually represent environmental contamination (C, III)

5. Patients who are suspected of having NTM lung disease but do not meet the diagnostic criteria should be followed until the diagnosis is firmly established or excluded (C, III)

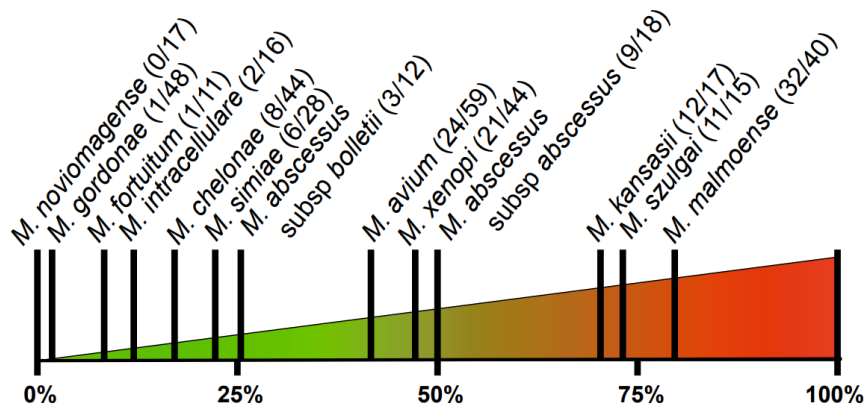
6. Making the diagnosis of NTM lung disease does not, *per se*, necessitate the institution of therapy, which is a decision based on potential risks and benefits of therapy for individual patients (C, III)

Figuur 3 (ATS/IDSA diagnostische guidelines)

Een goede, diepe staalname is zeer belangrijk in de NTM-diagnostiek. Sputa of endotreacheal aspiraten van goede kwaliteit of broncho-alveolaire lavages (BAL) zijn hiervoor geschikte stalen, speeksel niet. BAL blijkt ten opzichte van sputum ook een superieure gevoeligheid te hebben.¹⁴ Patiënten met nodulair-bronchiëctatische NTM-infecties produceren minder tot geen sputa en hebben een lagere mycobacteriële load in sputa. BAL kan hierbij een diagnostische winst betekenen.¹³

Indien de patiënt voldoet aan de criteria van een klinische relevante NTM-pulmonaire infectie, moet men niet noodzakelijk starten met een antimicrobiële behandeling. Aangezien de behandeling langdurend (18 maanden) is en er tijdens deze lange periode belangrijke neveneffecten kunnen optreden secundair aan de antimycobacteriële therapie moet het opstarten van therapie afgewogen worden binnen het 'risk/benefit'-profiel van de patiënt. Het risico op het ontwikkelen van resistentie, met name tegen macroliden antibiotica, speelt misschien niet direct mee in dit 'risk/benefit'-profiel van de patiënt maar zou steeds in het achterhoofd gehouden moeten worden. Dit bemoeilijkt bijvoorbeeld de therapie van patiënten die lijden aan mucoviscidose of primaire ciliaire dyskinesie, die langdurig macrolide antibiotica innemen omwille van de anti-inflammatoire werking van deze klasse van antibiotica.

Los van deze diagnostische criteria moet men ook rekening houden met de klinische relevantie van het geïdentificeerde species. Dit kan men inschatten of extrapoleren vanuit prevalentiecijfers. Men kan per *Mycobacterium* species oplijsten hoe vaak isolatie van dat species binnen een bepaalde patiëntenpopulatie voldoet aan de diagnostische criteria, zoals opgesteld door de IDSA. Met andere woorden: hoe vaak is een bepaald species pathogeen? Aan de hand van deze cijfers kan men dan per patiënt uitmaken of het geïsoleerde *mycobacterium* species waarschijnlijk niet, mogelijks, zeer waarschijnlijk enz. een klinische relevante infectie veroorzaakt. Bij het opvragen van deze data bij het nationaal referentiecentrum (Sciensano, het vroegere WIV-ISP) bleken deze data niet beschikbaar in België aangezien het NRC meestal geen klinische inlichtingen krijgt van labo's en omdat veel labo's in België tegenwoordig zelf de mycobacteriën uit klinische stalen identificeren en dus hun stalen niet doorsturen naar het NRC. Nederland beschikt wel over zulke (retrospectieve) data. Met deze data kan dan een grafiek opgesteld worden die de pathogeniciteit van een bepaald *mycobacterium* species visueel weergeeft, zoals weergegeven op figuur 4. Belangrijk hierbij te vermelden is dat het hier gaat om een inschatting die per land of regio verschillend is.^{15,16,17}



Figuur 4 (Mycobacteriën geordend volgens pathogeen vermogen)

g. Kweken van mycobacteriën

Positieve kweken, met identificatie en eventueel bepaling van de antibioticagevoeligheid zijn zeer belangrijk in de diagnostiek van NTM-infecties. De NTM verschillen ook sterk op basis van optimale groeiomstandigheden en aangezien de incubatietemperatuur vaak standaard staat 37°C kan dit voor sommige stalen/NTM-stammen problemen geven. Voor een aantal NTM ligt de optimale groeitemperatuur op 30°C, voornamelijk voor de NTM die huid- en weke delen infecties en lymfadenitis veroorzaken. Het *Mycobacterium avium* complex groeit beter op 37-42°C, de *M. xenopi* groeit beter bij 45°C en *M. abscessus* op zijn beurt groeit beter bij 37°C.^{12,18} *M. haemophilum* heeft op zijn beurt ijzersuppletie (bvb. hemine) nodig om te groeien. *M. ulcerans*, verwekker van het Buruli ulcer, endemisch in West-Afrika en Australië, *M. genavense* en *M. tilburgii* zijn niet of nauwelijks kweekbaar.¹² Dit illustreert het belang van moleculaire diagnostiek bij NTM-infecties.

Zowel solide als vloeibare groeibodems worden gebruikt in de mycobacteriële diagnostiek. De sensitiviteit van MGIT vloeibare bodems bedragen 63-100%, afhankelijk van de studie die geciteerd wordt.¹⁸ Indien zowel MGIT als solide media gebruikt worden stijgt de sensitiviteit tot 75-100%. Het enten van zowel vloeibare als solide media voor NTM-stalen heeft dan ook een duidelijke meerwaarde.¹⁸ Van de solide groeibodems zou Löwenstein-Jensen (LJ) de meest sensitieve.¹⁸

Hoewel de MGIT tijdswinst oplevert in time-to-detection, zijn er ook een aantal nadelen. Een belangrijk nadeel is het feit dat traag groeiende mycobacteriën met een extreem traag metabolisme zoals *M. xenopi*, vaak niet gedetecteerd worden. Tot 60% van de *M. xenopi* isolaten zou op deze manier gemist kunnen worden.¹⁹ Daarom is het belangrijk dat elke MGIT tube die door de het incubatietoestel als negatieve cultuur bestempeld wordt, visueel geïnspecteerd wordt op groei. Indien verdachte groei in de MGIT wordt opgemerkt, gekarakteriseerd door de aanwezigheid van gele granules (0.05-1 mm), wordt er op dit staal best een zuurvaste kleuring gedaan en eventueel andere technieken toegepast (moleculaire methodes of MALDI-TOF MS). Een subcultuur op vaste groeibodem kan een meerwaarde betekenen in deze situatie.¹⁸

Om *M. genavense*, veroorzaker van gedissemineerd infecties in immuungecompromitteerde patiënten, te laten groeien in MGIT kan men verschillende kunstgrepen uitproberen. Allereerst kan men de incubatietijd van 42 (standaard) of 56 dagen (verlengde incubatie) verlengen naar 12 weken, hoewel de sensitiviteit van deze verlengde incubatie nog altijd niet super is. Ten tweede kan men de pH in de MGIT trachten te verlagen door ze aan te zuren tot pH 5.5-6.0. Als alternatief kan men ook het commercieel verkrijgbaar medium voor pyrazinamide-gevoeligheidsbepaling voor tuberculose

gebruiken aangezien hierin de pH reeds verlaagd is (pH 6). Ten derde kan men een supplement van Mycobactin toevoegen.¹⁸

h. Identificatietechnieken voor identificeren van mycobacteriën

Identificatie van mycobacteriën werd vroeger uitgevoerd door middel van biochemische tests, snelheid van groei en aanmaak van pigment (cf. Runyon classificatie).²¹ Momenteel wordt deze manier van typering van NTM niet zoveel meer gebruikt. Andere identificatiemethoden zoals moleculaire assays, high-performance liquid chromatography (HPLC) en MALDI-TOF worden meer en meer uitgevoerd. Sequencing van *rpoB*, *hsp65*, 16S rRNA, *sod* of 16S-23S internal transcribed spacer kunnen toelaten, indien verschillende genloci gesequenced worden, om NTM te identificeren tot op subspeciesniveau. Indien slechts een locus, bijvoorbeeld alleen 16S rRNA gesequenced wordt, dan kan vaak slechts een identificatie bekomen worden tot op species of complex-niveau.^{18,22} Moleculaire analyses zijn vaak tijdrovend, kostelijk en vereisen uitgebreide specialistische kennis waardoor deze technieken vaak niet simpel zijn om in een routine microbiologisch labo te implementeren. Door middel van HPLC kan men de mycolzuren, die deel uitmaken van de mycobacteriële celwand, analyseren. Deze techniek is sneller dan de vroeger gebruikte fenotypische testen en laat discriminatie tot op species niveau toe. Echter, HPLC kan enkel uitgevoerd worden op NTM die gegroeid zijn op solide groeibodem zoals Löwenstein-Jensen. Deze tijdrovende stap zorgt ervoor dat de tijd tot identificatie significant toeneemt.²²

2) Identificatie van mycobacteriën door middel van Matrix-Assisted laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

a.Principe

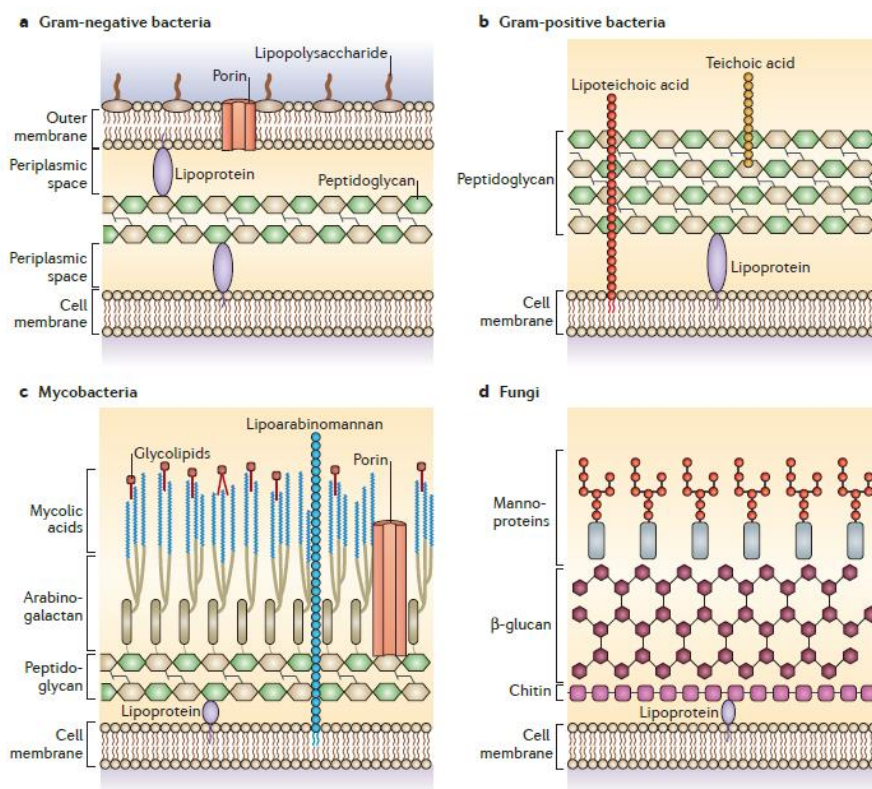
Zie bijlage 1

b.Performantie MALDI-TOF MS: literatuuronderzoek

De studies die de performantie van MALDI-TOF MS, rechtstreeks op MGIT na extractie, onderzochten, zijn schaars en soms moeilijk vergelijkbaar omwille van de vele verschillen in methodeopzet. Van de negen studies die besproken worden (cf. infra) gebruikte een studie geen extractieprotocol, de spot werd gemaakt uit een ethanol-inactivatie suspensie.²³ In Bijlage 4 vindt men een schematische vergelijking van de verschillende studies. Twee studies maakten wel gebruik van een extractieprotocol maar deze werd enkel toegepast op groei op vaste bodem en niet op vloeibare media.^{24,25} Twee studies gebruikten het VITEK MS platform en niet het Bruker MALDI-TOF MS systeem.^{26,27} Een studie maakte gebruik van de Bruker MALDI-TOF maar gebruikte dan weer zijn eigen geconstrueerde database en de Andromas-database voor analyse van de bekomen spectra.²³

A) Protocolverschillen

Mycobacteriën vereisen, omwille van hun dikke hydrofobe celwand, een pre-MALDI-TOF extractie opdat ook de intracellulaire proteïnen, voornamelijk ribosomale eiwitten, vrij zouden komen en dus ook bij kunnen dragen aan het chromatogram.^{28,29} In figuur 5 wordt de celwand van mycobacteriën weergegeven in vergelijking met andere micro-organismen.³⁰



Figuur 5 (Celwandopbouw van Gram-positieve, Gram-negatieve bacteriën, mycobacteriën en fungi)

Zowel de firma Bruker als verschillende studies beschrijven de identificatie van mycobacteriën door middel van MALDI-TOF MS. Allen hebben ze (licht) verschillende pre-MALDI extractieprotocollen. De verschillen zitten vaak in het aantal centrifugatiestappen, volumes van toegevoegde vloeistoffen en contacttijd tussen staal en bepaalde vloeistoffen. Echter, deze verschillende protocollen hebben ook heel wat zaken gemeenschappelijk. Vaak worden solventen (bvb. acetonitrile) en sterke zuren (mierenzuur) gebruikt om de hydrofobe celwand te penetreren, open te breken en zo de intracellulaire proteïnes naar buiten te laten komen. Absolute ethanol wordt gebruikt om de eiwitten te laten neerslaan in het sediment. Hitte-inactivatie (het lyseren en doden van levende mycobacteriën door hitte) is van primordiaal belang bij het verwerken mycobacteriën. Ook de hierboven genoemde solventen, sterke zuren en absolute ethanol dragen bij tot het doden van levende mycobacteriën.²⁸ De glazen beads dragen ook bij tot fragmenteren van bacteriële eiwitten en uiteenslaan van gevormde aggregaten en dus tot betere performantie van de MALDI-TOF MS. Een oplijsting en relatieve vergelijking is beschikbaar als bijlage. Hierin werd voor de besproken studies telkens het protocol opgelijst en de relatieve overeenkomst met het protocol dat in het ZOL en ZNA gebruikt wordt, visueel weergegeven. (zie bijlage 2)

Het effect van een bepaald protocol op de identificatie ratio ('ID rate') kan moeilijk bepaald worden. Er zijn protocollen die beduidend langer duren en protocollen die eerder relatief kort zijn. Er zijn veel, soms eerder kleine, verschillen tussen de protocollen waarvan moeilijk bepaald kan worden wat het effect is op de identificatie ratio. De studies met kortere protocollen (met minder centrifugatiestappen, minder eiwitprecipitatiestappen enz.) zoals die van Van Eck et al., Leyer et al., Buchan et al. en Huang et al. rapporteren, afhankelijk van de geciteerde studie, goede en slechte ID rates.^{22,26,27,31} De studies die een langer extractieprotocol (zoals in het ZOL en in het ZNA) waaronder Chien et al., Mediavilla et al., Rodriguez et al. en Balada et al., rapporteren ook niet noodzakelijk hogere identificatie ratio's.^{24,25,32,33}

B) Effect van het aantal spots op een MALDI targetplaatje

Het aantal spots die gemaakt worden op het MALDI targetplaatje verschillen ook naargelang de geciteerde studie. Sommigen gebruiken van het supernatans na extractie slechts 1ml voor 1 spot (Balada et al., Van Eck et al., Chien et al. en Huang et al.), anderen spotten 2 spots (Buchan et al. en Leyer et al.), 3 spots (Mediavilla et al. en Rodriguez et al.) en 5 spots (Lotz et al.).^{22,24,25,26,27,31,32,33} In het protocol dat het ZOL en ZNA gebruiken, worden er telkens 4 spots per staal aangebracht op de MALDI-targetplaatje waarvan op de eerste 2 spots telkens 2 µL supernatans.

Men zou verwachten dat meerdere spots per staal een grotere kans geeft op het daadwerkelijk vinden van een identificatie van een *Mycobacterium* in een staal. Over de verschillende studies heen is dit moeilijk aantoonbaar gezien de studies op heel veel vlakken sterk verschillen, zelfs als men ze stratificeert volgens bibliotheek, gebruikt medium enz. Een studie rapporteert wel een duidelijk voordelig effect van meerdere spots per staal. Naarmate het aantal spots per staal toeneemt, neemt de kans op goede spectra ook toe. Dit effect geldt zowel voor de snel groeiende als de traag groeiende mycobacteriën maar het effect is meer uitgesproken voor de traag groeiende mycobacteriën.²³ Deze zijn vaak omwille van andere redenen moeilijker te extraheren en identificeren rechtstreeks uit MGIT. (cf. infra.)

C) Effect van ouderdom stalen

In twee studies vond men dat toenemende ouderdom van het te analyseren staal de spectrale acquisitie negatief beïnvloedde, dat wil zeggen, de kwaliteit van de spectra nam inderdaad af naarmate het staal langer op kamertemperatuur stond. Anderzijds halen beide studies ook aan dat, ondanks de afname van de spectrale kwaliteit en dus ook de MALDI-TOF MS scores, de referentiepieken bewaard bleven en dat de identificatie van de mycobacteriën nog altijd kon bekomen worden.^{23,34,27}

Soms is het zelfs voordelig om een staal na positief worden langere tijd op kamertemperatuur te laten staan, voornamelijk voor de traag groeiende mycobacteriën. Deze zijn, bij het positief worden van de MGIT, vaker in een lagere mycobacteriële load aanwezig in de MGIT dan de snel groeiende. (cf. infra) Deze lagere mycobacteriële load beïnvloedt ook de performantie van de MALDI-TOF MS in negatieve zin. Hun mening hieromtrent is, indien een MGIT na positief worden geen identificatie oplevert door middel van MALDI-TOF MS, om ofwel een groter aliquot te nemen (3ml i.p.v. 1ml) of om de MGIT buis verder op kamertemperatuur te laten staan. Beide leveren, in geval van, aanwezigheid van een traag groeiende mycobacterie, een hogere mycobacteriële load op en dus meer kans om goede spectra en identificatie te bekomen.²⁷

D) Invloed vast en vloeibaar medium

Uit literatuur blijkt eenduidig dat identificatie van mycobacteriën vanop een vaste bodem een hogere kans op identificatie geeft ten opzichte van MALDI-TOF MS analyse van vloeibare media. Op solide media kan je bij duidelijke groei steeds voldoende bacterieel materiaal meenemen voor extractie. Het grote probleem met vloeibare media, ondanks het feit dat ze voor heel wat mycobacteriën de tijd tot identificatie drastisch verkorten, is de soms of vaak (te) lage mycobacteriële load. Hierdoor is voor MALDI-TOF MS, na extractie, vaak niet mogelijk om (goede) spectra te bekomen. Voornamelijk traag groeiende mycobacteriën zijn vaak (nog) niet in voldoende grote aantallen gegroeid wanneer de MGIT positief wordt. Het aliquot, genomen uit de MGIT voor extractie, vergroten of de MGIT verder incuberen kunnen soms dit probleem verhelpen.^{23,27,31}

E) Effect database

Een goede, uitgebreide database is van primordiaal belang voor (juiste) identificatie van mycobacteriën. Hoe meer species en hoe meer spectra per species geïnccludeerd worden in een database, hoe meer kans er bestaat dat de MALDI-TOF MS een match vindt op basis van een bekomen chromatogram. Over de jaren heen heeft de firma Bruker de MALDI-TOF MS database voor mycobacteriën verder uitgebreid met nieuwe spectra, weergegeven in tabel 2. Met de oudere database konden vaak de meest frequente mycobacteriën reeds geïdentificeerd worden, nu kan men meer en meer ook de zeldzamere mycobacteriën correct identificeren. Uit literatuur blijkt het effect van een meer uitgebreide bibliotheek minder ingrijpend te zijn. Dit kan wellicht verklaard worden door het feit dat slechts een beperkt aantal mycobacteriën van de reeds gekende >150 species bij de mens klinische infecties veroorzaken en dat de spectra van deze mycobacteriën (*M. avium*, *M. chimaera/intracellulare complex*, *M. abscessus*, *M. kansasii* enz.) vaak al aanwezig waren in eerdere MALDI-TOF MS databases.

Een uitgebreidere referentiebibliotheek zorgt ervoor dat non-identificaties ondanks acquisitie van goede spectra, minder voorkomt en dus voor een betere performantie van MALDI-TOF MS.^{25,31}

Bibliotheek	Aantal spectra	Aantal species
Bruker Biotyper v3.1	79	42
Bruker Mycobacteria v1.0	173	94
Bruker Mycobacteria v2.0	313	127
Bruker Mycobacteria v5.0/IVD 3.0	912	164
Biomerieux SARAMIS v4.12	1286	45
Biomerieux Vitek IVD 3.0	?	49

Tabel 2 (Vergelijking verschillende referentiebibliotheken voor MALDI-TOF MS identificatie van mycobacteriën)

F) Training in uitvoering extractie (leercurve)

Een studie vond een duidelijk leercurve-effect. Laboranten die reeds meer ervaring hadden opgedaan met de extractieprocedure hadden over het algemeen ook hogere scores op MALDI-TOF MS.³¹

G) Mogelijke interferenties of problemen met MALDI-TOF MS rechtstreeks op MGIT

Naast bovenstaande zaken die de performantie van MALDI-TOF MS beïnvloeden zijn er ook nog andere effecten die kunnen spelen. Spectrale interferentie door de aan MGIT toegevoegde supplementen (PANTA en OADC) kan een rol spelen in de slechtere performantie van MALDI-TOF MS rechtstreeks op MGIT. Ook de (herhaaldelijke) decontaminatieprocedure kan mogelijks de spectra negatief beïnvloeden. Decontaminatie (om de contaminerende overgroei van andere on-mycobacteriën te vermijden) van een MGIT heeft onvermijdelijk ook een negatief effect op de mycobacteriën (lees: mycobacteriële load daalt) en doet dus de kans op identificatie dalen.^{23,31} Niet alleen de supplementen toegevoegd aan een groeimedium kunnen negatieve gevolgen hebben op de MALDI-TOF MS analyse, ook het groeimedium zelf kan problemen geven voor het verkrijgen van een goed chromatogram. Löwenstein-jensen agar bevat, aangezien dit een bodem op basis van ei is, veel lecithine. Dit kan niet alleen interfereren met het chromatogram maar verstoort ook de fluorescentiemeting van de BACTEC 960 MGIT.¹⁸ Dit is van belang voor studies die niet rechtstreeks met klinische MGIT's (d.w.z. MGIT met daarin een patiëntenstaal) werken maar deze klinische MGIT's nabootsen door deze te inoculeren met mycobacteriële isolaten die bijvoorbeeld gegroeid zijn op löwenstein-jensen.

Staalname bij patiënten (voornamelijk een probleem bij sputa) gaat soms onvermijdelijk gepaard met het co-collecteren van niet alleen mycobacteriën maar ook met collecteren van contaminerende oropharyngeale flora en humane eiwitten. Deze eiwitten van humane of oropharyngeale oorsprong kunnen interfereren met het mycobacterieel chromatogram en leiden tot een slechte of non-identificatie.³¹

In eerder zeldzame gevallen kan een positieve MGIT twee of meerdere verschillende mycobacteriën bevatten. Deze kunnen nooit beide door de MALDI-TOF MS geïdentificeerd worden. Vaak zal een van de twee predominant aanwezig zijn in de MGIT en zal deze dus door MALDI-TOF MS geïdentificeerd kunnen worden, zij het met een slechtere score. Anderzijds kan de aanwezigheid van verschillende mycobacteriën in een MGIT ook leiden tot non-identificatie doordat de eiwitspectra van de verschillende mycobacteriën overlappen met elkaar en er voor de MALDI-TOF MS geen herkenbaar patroon is in het verkregen chromatogram.²⁷

c. Praktisch luik

In het microbiologisch labo van het Ziekenhuis Oost-Limburg (ZOL) te Genk zijn we bezig aan een technische en klinische validatie van de identificatie van mycobacteriën door middel van MALDI-TOF MS. Hiervoor beschikten we over 10 retrospectief en prospectief bijgehouden klinische stalen in Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) en 9 microbank-isolaten. Deze stalen werden verzameld in een periode van mei 2016 tot maart 2018.

Alle klinische stalen (MGIT's) en microbankisolaten werden uitgeënt op Löwenstein-Jensen agar. Na uitenting op löwenstein-jensen (LJ) werden alle MGIT's geëxtraheerd voor analyse op MALDI-TOF MS. Indien de löwenstein-jensen agar groei vertoonde werd deze ook geëxtraheerd voor MALDI-TOF MS analyse.

Het gebruikte extractieprotocol voor MALDI-TOF MS vanaf MGIT of vaste bodem is weergegeven in bijlage 3. Wij gebruikten de Microflex Bruker MALDI-TOF MS en de bibliotheek werd geupgrade naar de Mycobacteria Library v5.0. Ten opzichte van de vorige bibliotheek werden 32 nieuwe referentiespectra toegevoegd. De bibliotheek bevat nu in totaal 912 referentiespectra voor 164 verschillende species. (Release Note Bruker Mycobacteria Library v5.0)

Met deze bibliotheek kan men geen subspecies identificeren (zoals *M. abscessus complex*) of *M. chimaera/intracellulare complex* onderscheiden. Literatuur heeft aangetoond dat *M. chimaera* en *M. intracellulare* door middel van MALDI-TOF MS uit elkaar gehaald kunnen worden. Bruker heeft hiervoor een aparte IVD module ter beschikking. Deze hadden wij op het moment van de validatie niet ter beschikking.³⁴

Tot op heden zijn er geen spectra aanwezig in de Bruker referentiebibliotheek voor *M. ulcerans*. Dit kan zorgen voor fout negatieve identificatie met *M. marinum*. Deze laatste kan als fotochromogene stam onderscheiden worden van *M. ulcerans* dewelke non-fotochromogeen is. (Release Note Bruker Mycobacteria Library v5.0)

I. Stammen uitgeënt op löwenstein-jensen bodem

Van de 19 stammen uitgeënt op löwenstein-Jensen bodem waren 17 stammen gegroeid. Een stam, *M. marinum/ulcerans* groeide niet op 37°C en werd opnieuw uitgeënt op LJ en geïncubeerd op 30°C. Een andere stam, een *M. chimaera/intracellulare complex* bleek onvoldoende gegroeid. Voor de overige 17 stammen, gegroeid op LJ, werd een MALDI-TOF MS identificatie bekomen (cf. infra en tabel). Voor alle gegroeide stammen op löwenstein-jensen werd een identificatie gevonden.

Van de acht klinische stammen (afkomstig uit MGIT, gegroeid op LJ) hadden 6/8 een MALDI-TOF MS score >2.000, de overige 2/8 hadden een score tussen 1.700 en 2.000. Deze met een lagere score hadden ook significant minder groei op löwenstein-jensen.

Van de negen microbankstammen, die groei vertoonden op löwenstein-jensen, hadden 7/9 een score van >2.000 en de overige 2/9 een score tussen 1.700 en 2.000. Voor alle 4 de spots van de *M. immunogenum* werd *M. chelonae* als tweede match gevonden. Bij herhaling van de MALDI-TOF MS identificatie van *M. peregrinum* werden afwisseld *M. peregrinum* en *M. septicum* gevonden.

II. Klinische stammen (MGIT)

De klinische stammen werden, naast uiting op löwenstein-jensen bodem, ook rechtstreeks geïdentificeerd met MALDI-TOF MS. Van 7/10 klinische MGIT's werd een identificatie bekomen door middel van MALDI-TOF MS.

Van deze zeven MGIT-stammen hadden 3/7 een score >2.000 en 4/7 een score tussen 1.700 en 2.000. De drie ongeïdentificeerde MGIT's betroffen een *M. chimaera/intracellulare complex* (wel MALDI-TOF identificatie op LJ), een *M. avium* (wel MALDI-TOF identificatie op LJ) en een *M. marinum/ulcerans* (opnieuw geïncubeerd op 30°C op LJ).

Stammen gegroeid op löwenstein-jensen agar					
Stam	Aantal (17)	Score			% ID
		<1.7	1.7-2.0	>2.0	
<i>M. celatum</i>	1			1	100%
<i>M. avium</i>	6		2	4	100%
<i>M. chimaera/intracellulare</i>	6		1	5	100%
<i>M. immunogenum</i>	1			1	100%
<i>M. gordonae</i>	1			1	100%
<i>M. peregrinum</i>	1		1		100%
<i>M. kansasii</i>	1			1	100%
Totaal Identificatie %					100%

Klinische stammen (MGIT)					
Stam	Aantal (10)	<1.7	1.7-2.0	>2.0	% ID
<i>M. celatum</i>	1			1	100%
<i>M. avium</i>	3	1	1	1	66%
<i>M. chimaera/intracellulare</i>	4	1	3		75%
<i>M. marinum/ulcerans</i>	1	1			0%
<i>M. kansasii</i>	1			1	100%
Totaal Identificatie %					70%

Tabel 3 (MALDI-TOF MS resultaten van klinische validatie in het ZOL)

Ondanks het feit dat we slechts een klein aantal klinische stalen hebben kunnen analyseren met MALDI-TOF MS kunnen we in deze data al trends zien die overeenkomen met andere studies. Identificatie van mycobacteriën door middel van MALDI-TOF MS is performant op mycobacteriële groei op vaste groeibodem zoals löwenstein-jensen. Rechtstreekse identificatie uit MGIT's lijkt initieel minder goed te lukken in vergelijking met groei op LJ.

Dit kan te wijten zijn aan verschillende zaken zoals aangehaald in de literatuurstudie (cf. supra). In geval van het *M. avium* isolaat waarvoor geen identificatie gevonden werd na extractie rechtstreeks op MGIT kan de non-identificatie te wijten zijn aan het feit dat dit een 1.5 jaar oude MGIT betrof. Mogelijks was de *M. avium* reeds voor een groot deel afgestorven in MGIT waardoor een onvoldoende hoge mycobacteriële ribosomale load aanwezig was voor MALDI-TOF MS identificatie. Deze load was dan weer wel voldoende om groei en MALDI-TOF MS identificatie te bekomen via LJ.

Wat betreft de twee andere stalen, een *M. chimaera/intracellulare complex* en *M. marinum/ulcerans*, is het voorlopig gissen naar de oorzaak van de non-identificatie via MALDI-TOF MS. Mogelijks speelt ook hier viabele mycobacteriële load een rol. Anderzijds, in het geval van de *M. chimaera/intracellulare complex* (afkomstig uit een respiratoir staal), kunnen eiwitten afkomstig van contaminerende commensale flora en van humane oorsprong tijdens afname van het staal interfereren bij de goede spectrale acquisitie.

III. Besluit

MALDI-TOF MS lijkt, althans op Löwenstein-jensen, een performante techniek om identificatie van mycobacteriën te bekomen. Hoewel de rechtstreekse MALDI-TOF MS identificatie op MGIT geplaagd lijkt te worden door allerhande interferenten of bijvoorbeeld problemen met mycobacteriële load, lijkt identificatie van mycobacteriën vanuit MGIT medium door middel van MALDI-TOF MS een veelbelovende techniek. Verdere validatie en toenemende literatuur hieromtrent zullen in de toekomst hopelijk leiden tot optimalisatie en een verbeterde performantie van MALDI-TOF inzake mycobacteriële diagnostiek.

Gezien het klein aantal stalen dat voorlopig geïncubeerd werd in deze validatie, dienen deze data, om de klinische validatie te vervolmaken, aangevuld te worden met prospectief verzamelde klinische stalen (MGIT's) en referentiestammen afkomstig van het Sciensano (vroeger WIV-ISP).

d.Kosten analyse

De aankoop van een MALDI-TOF MS systeem brengt een grote investering met zich mee voor een microbiologie labo. Maar gezien het groot aantal micro-organismen die geïdentificeerd worden op, de minimale afvalproductie door en lange levensduur (mits onderhoud) van MALDI-TOF MS blijkt dit, in vergelijking met moleculaire technieken, traditionele biochemische en fenotypische microbiologische testen een kostenefficiënte investering voor vele microbiologie labo's wereldwijd.

Wat betreft de diagnostiek van mycobacteriën zijn moleculaire technieken, biochemische en fenotypische testen en MALDI-TOF MS complementair aan elkaar. Echter, het kan kostenefficiënt zijn om ook in de mycobacteriële diagnostiek MALDI-TOF MS te integreren. Dit kan bijvoorbeeld door MALDI-TOF MS zo in te plannen in het mycobacterieel diagnostisch protocol in een microbiologisch labo dat de bulk van de stalen op het MALDI-TOF MS systeem passeren alvorens terug te vallen op moleculaire technieken en/of biochemisch en fenotypische technieken. Zo kan er bij discordanties of bij non-identificatie (indien het spectrum niet of onvoldoende aanwezig is in de MALDI database) een beroep gedaan worden op deze laatste technieken.

Een Nederlands artikel uit 2015 heeft alle technieken die gebruikt kunnen worden in de mycobacteriële diagnostiek opgelijst en telkens aangegeven wat het onderscheidend vermogen is in de identificatie van mycobacteriën maar anderzijds wordt ook weergegeven wat de relatieve kost is van elke techniek, weergegeven in figuur 6.¹⁸

In het labo microbiologie van het Ziekenhuis Oost-Limburg hebben we een kosten berekening gedaan voor de implementatie van MALDI-TOF MS in de mycobacteriële diagnostiek. We kunnen stellen dat een MALDI-TOF MS extractie en run van 4 spots voor een enkel staal neerkomt op ongeveer 6 euro per staal. Let wel, deze berekening houdt enkel rekening met gebruikte reagentia en klein verbruiksmateriaal (pipettips, pasteurpipetten, microtube enz.). Aangezien er voor verwerking van stalen met mogelijks aanwezigheid van mycobacterieel materiaal onder L3-omstandigheden gewerkt moet worden, moet men ook een vortex, hitteblok en ultracentrifuge apart aankopen voor het L3-

labo. Ook de hands-on-time en bioveiligheidsvoorzieningen (schort, handschoenen enz.) kunnen mee genomen worden in de kosten-berekening. Andere studies rapporteren dat de kost voor MALDI-TOF MS in dezelfde grootteorde ligt.^{25,27}

De turn-around-time vanaf het positief zijn van een MGIT tot het rapporteren van een identificatie door gebruik te maken van MALDI-TOF MS wordt drastisch verkort. De tijd nodig om het extractieprotocol te doorlopen bedraagt ongeveer 2 uur, waarvan 1 uur en 10 min echte hands-on-time is. Deze hands-on-time lijkt overeen met die van andere studies.^{25,27}

Omwille van de nood aan snellere identificatie van mycobacteriën en de honger naar nieuwe wetenschappelijke inzichten werd beslist dat MALDI-TOF MS na validatie geïncorporeerd zal worden in de mycobacteriële diagnostiek van het ZOL.

Identification methods for nontuberculous mycobacteria		
Identification Assay	Discriminatory Power	Relative Cost
HPLC	+	\$
Line probe assays	++	\$\$\$\$
16S rDNA gene sequencing	+++	\$\$\$
Single-gene sequencing (other than 16S rDNA)	++++	\$\$\$
Multigene sequencing	+++++	\$\$\$\$
MALDI-TOF	+++	\$

Figuur 6 (Relatieve kost van verschillende methodes, gebruikt in de mycobacteriële diagnostiek)

Conclusies op de drie CAT-vragen:

1) Wat is het klinisch diagnostisch belang van mycobacteriën en hun identificatie?

Tot op heden zijn >150 species mycobacteriën bekend. Deze verschillen onder andere op vlak van klinische relevantie, intrinsiek pathogeen vermogen en antibioticagevoeligheid. Afhankelijk van de klinisch-radiologische bevindingen maar ook aan de hand van de identificatie van het *mycobacterium* species kan men voor een patiënt nagaan of het een klinisch relevante NTM-infectie betreft. De identificatie van mycobacteriën moet dus steeds gebeuren en mag niet louter afhangen van de klinisch-radiologische bevindingen.

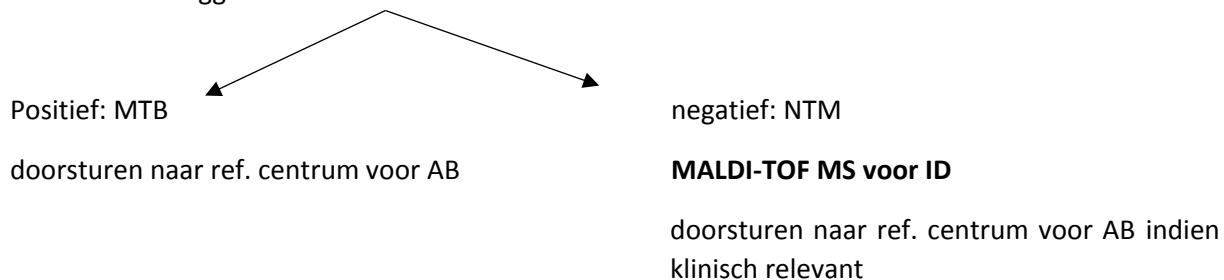
2) Wat is de performantie van MALDI-TOF MS ter identificatie van atypische mycobacteriën, zowel in de literatuur als in het kader van validatie die lopende is in het labo microbiologie in het ZOL?

Hoewel de performantie van MALDI-TOF MS voor de identificatie van mycobacteriën rechtstreeks op MGIT in de literatuur nog over gediscussieerd wordt, lijkt MALDI-TOF MS een veelbelovende techniek om mycobacteriën te identificeren in MGIT. De technische en klinische validiteit zal verder nagegaan worden door prospectief klinische stalen te onderzoeken.

3) Wat is de plaats van MALDI-TOF MS voor identificatie van NTM?

De MALDI-TOF MS zal, na validatie, geïntegreerd worden in de diagnostiek van mycobacteriën. De vermoedelijke flow van staalverwerking in het microbiologie labo van het ZOL zal waarschijnlijk de volgende zijn:

- Indien Ziehl + op staal => rechtstreekse PCR op staal (GeneXpert)
- Indien MGIT + : macroscopisch bekijken (vlokjes, troebel):
 - Niet suggestief: Ziehl op MGIT (+ eventueel gram) => indien negatief: buis opnieuw decontamineren
 - Suggestief: sneltest TB



To Do/Actions

- 1) Verdere validatie van MALDI-TOF MS op MGIT door ook prospectief MGIT klinische stalen en WIV stammen te analyseren.
- 2) Indien validatie afgewerkt: nog eens samenzitten met clinici rond mycobacteriële diagnostiek en hen op de hoogte stellen van mogelijks kortere TAT's door implementeren van MALDI-TOF MS in de mycobacteriële diagnostiek.

BIJLAGE 1

Principe MALDI-TOF

De proteïnen die vervat zitten in een cel zijn voor een groot stuk kenmerkend voor die welbepaalde cel en worden bepaald door het genoom en genexpressie van die cel. Zo schat men dat voor micro-organismen die 600-7000 gekende genen bevatten, het hieruit afgeleide proteoom of eiwit-profiel als dusdanig voor een belangrijk stuk kenmerkend is voor de identificatie van dat micro-organisme.^{28,35}

Dit concept (een bepaald proteoom typeert een bepaalde cel) staat centraal bij MALDI-TOF MS (Matrix-assisted Laser-Desorption Time-of-Flight Mass Spectrometry). Door middel van MALDI-TOF MS kunnen heel wat micro-organismen geïdentificeerd worden op basis van hun 'peptide mass fingerprint', een representatie van het eiwitspectrum verkregen door MALDI-TOF MS.²⁸

De voorbereiding van een staal voor analyse door een MALDI-TOF MS systeem bestaat uit het 'spotten' of aanbrengen van bijvoorbeeld bacterieel materiaal. Dit spotten kan rechtstreeks gebeuren vanuit de groei van bacteriekolonies op een solide agarbodem of na een extractieprocedure op vloeibare media. Op dit bacterieel gespot materiaal wordt matrix aangebracht. Terwijl deze matrix droogt, co-kristalliseert deze met het bacterieel 'sample' en wordt het bacterieel materiaal als het ware ingebed in de gekristalliseerde matrix. Het aanbrengen van matrix helpt zo dus bij het homogeen verdelen van het bacterieel sample. Wanneer deze spot vervolgens door een laser beschoten wordt (typisch een N₂-laser, binnen UV-spectrum) zal deze matrix samen met het daarin ingebedde bacterieel materiaal loskomen, overgaan van solide fase naar gasfase en tegelijk geïoniseerd worden door de aanwezigheid van een elektrisch veld met een constant potentiaal. De matrix vervult in dat opzicht zijn tweede belangrijke functie als energie-absorberende en energie-overdragende stof namelijk het overdragen van de door het potentiaalverschil verkregen lading op het bacterieel materiaal. De resulterende geïoniseerde moleculen worden vervolgens in een vacuum in aanwezigheid van een aangebracht potentiaal versneld in de richting van de detectorplaat. De tijd die een geïoniseerd molecuul erover doet om de detectorplaat te bereiken hangt af van zijn massa-over-lading ratio oftewel m/z ratio. Sterker geladen en lichtere deeltjes zullen dus sneller de detectorplaat bereiken. Aangezien moleculen in het MALDI-TOF MS systeem meestal maar een enkelvoudige lading krijgen tijdens het ionisatieproces, hangt hun Time-of-Flight volledig af van hun massa. Wanneer dit hele proces doorlopen wordt en zowel alle 'zware' deeltjes als alle 'lichte' deeltjes de detectorplaat hebben bereikt en dit allemaal binnen een tijdspanne van nanoseconden, krijgt men een chromatogram. Dit chromatogram, kan dan door de software gematched worden aan een chromatogram in de referentiebibliotheek. Een match wilt zeggen dat de identificatie van het micro-organisme geslaagd is. De software van de MALDI-TOF MS Biotyper van Bruker geeft aan elke match ook een soort van waarschijnlijkheidsscore mee die weergeeft hoe goed de match is. Deze waarschijnlijkheidsscore ligt voor het systeem van Bruker tussen 0 en 3.000. Over het algemeen stellen we dat een score >1.700 de identificatie toelaat tot op genus-niveau en een score >1.900 een identificatie tot op species niveau.²⁸

Overeenkomst met 'ZOL en ZNA'	
Geen overeenkomst met 'ZOL en ZNA'	

BIJLAGE 3

Bijlage 3: tabel met overzichtelijke weergave van het extractieprotocol dat momenteel in het ZOL gebruikt wordt.

Voorbereiding vanuit LJ en 7H10	Voorbereiding MGIT	Extractie (deel 1)	Extractie (deel 2)	MALDI-TOF
1. Breng een markerstreepje aan op een Microtube en identificeer met een (staal)nummer 2. Breng 300µl ultrapore water in de Microtube 3. Breng met behulp van een blauwe (10µl) entilus enkele kolonies in suspensie in de Microtube (vermijd het overbrengen van voedingsbodem)	1. Breng een markerstreepje aan op een Microtube en identificeer met een (staal)nummer 2. Meng MGIT op met pasteurpipet 3. Breng 1 à 1.5 ml over in de Microtube met pasteurpipet 4. Centrifugeer 2 min bij 13000rpm →houd rekening met markering! 5. Pipetteer het supernatans af →Pipetteer 'weefselbrol' eraf indien aanwezig 6. Voeg 300µl ultrapore water bij het sediment	1. Voeg 900 µl absolute ethanol toe aan de suspensie 2. Vortex 5 seconden 3. Incubeer 10 minuten bij kamertemp. 4. Centrifugeer 2 minuten bij 13000 rpm 5. Pipetteer het supernatans af en laat wat vocht achter 6. Voeg 500µL ultrapore water toe en suspendeer 7. Centrifugeer 2 minuten bij 13000 rpm 8. Pipetteer het supernatans af 9. Voeg 50µL ultrapore water toe en suspendeer (water over sediment laten lopen, opzuigen en terug over laten lopen) 10. Verwarm gedurende 30 min. op 100°C. →condens = centrifugeer kort! 11. Voeg 1200µL ijskoude absolute ethanol toe (vanuit vriezer: -20°C, opmengen met pasteurpipet!) 12. Centrifugeer 2 min. bij 13000 rpm 13. Pipetteer het supernatans af en laat wat vocht achter 14. Centrifugeer 2 min. bij 13000 rpm 15. Pipetteer het supernatans voorzichtig af 16. Laat het sediment aan de lucht drogen --> kan lang duren (30-45 min)	17. Voeg een zeer kleine hoeveelheid silica beads toe (400nm) (zie foto lepel(tje)) 18. Voeg (10µl) pure acetonitrile (AN) toe. →Bij een duidelijk sediment 20µl 19. Vortex gedurende 1 minuut op maximum snelheid 20. Voeg, eenzelfde hoeveelheid als toegevoegde AN, 70% formic acid (FA) toe 21. Vortex 5 seconden 22. Centrifugeer 2 min. bij maximum snelheid 23. Spotten op MALDI-targetplaat (per staal): = 4 spots in toto per staal - 2 spots met 2µl supernatans - 1µl => drogen - 2 spots met 1µl supernatans - 1µl => drogen 24. Laat drogen	1. Ga na het drogen onmiddellijk naar het L2-labo voor het aanbrengen van matrix 2. Spot 1µl matrix 3. Laat drogen 4. Breng targetplaat in Maldi-tof 5. Gebruik Database op MycobacteriënV3.0 (be ad method!) 6. Lees af door eventueel manueel te beschieten (indien slechte MALDI-TOF MS score: manueel herschieten)

Bijlage 4: tabel met systematische oplijsting van verschillen en overeenkomsten tussen verscheidene studies over MALDI-TOF MS identificatie van NTM

Artikel	Stalen	Beschrijving stalen		Toestel	Bibliotheek	Spots	'ID rate' MALDI-TOF MS	Referentie methode
Lotz et. al. 2010	82 MGIT 311 LJ	72 NTM 276 NTM → 31 species	Klinisch Klinisch + ref.	Bruker Microflex	Andromas database Eigen database	5 spots	LJ: 97% MGIT: 77% → SN: 99% → TR: 79%	Hsp65/ rpoB/ sod
Balada et. al. 2013	70 MGIT (klinisch) 99 7H10/7H11 9LJ	142NTM → 13 species	80% klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v1.0	1 spot	Globaal: 98,3% Solide ≈ MGIT	16SrRNA en/of hsp65
Buchan et. al. 2014	88 VersaTREK 88 7H11	53 NTM → 15 species	Klinisch	Bruker Microflex	Biotyper v3.1 en Mycobacteria v1.0	2 spots	7H11 v3.1: 50.6% v1.0: 89.8%	16SrRNA hsp65 rpoB
Mediavilla et.al. 2014	66 LJ → MALDI 66 MGIT → GenoType	66 NTM → 15 species	klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v1.0	3 spots	LJ: 98,5%	16SrRNA hsp65
Rodriguez et. al. 2015	125 LJ (klinisch+ref.)	125 NTM → 27 species	Klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v2.0	3 spots	LJ: 94,4%	16SrRNA Hsp65
Van Eck et.al. 2016	54 MGIT	54 NTM → 10 species	klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v.2.0	1 spot	Default settings 7H11: 46.3% MGIT: 22.2%	HSP65 Inno-Lipa
Chien et. al. 2016	151 MGIT	98 NTM → 9 species	klinisch	Bruker Microflex	Mycobacteria v.2.0	1 spot	MGIT: 25%	Mycold plus 16SrRNA
Leyer et.al. 2017	111 7H10 → 108 MGIT	111 NTM → 21 species	Klinisch?	Vitek MS	Saramis v4.12 RUO en IVD3.0	2 spots	7H10 Saramis: 67% IVD 3.0: 94%	Hsp65 rpoB
Huang et. al. 2018	89 MGIT	89 NTM → 10 species	klinisch	Vitek MS	IVD V3.0	1 spot	1 ml aliquot MGIT Zonder SDS: 96.4% Met SDS: 89.2%	PCR