



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Diagnostics of non-tuberculous mycobacteria

Bruijnesteijn van Coppenraet, L.E.S.

Citation

Bruijnesteijn van Coppenraet, L. E. S. (2009, March 5). *Diagnostics of non-tuberculous mycobacteria*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13665>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/13665>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting: Diagnostiek van niet-tuberculeuze mycobacteriën.

Het genus *Mycobacterium* bestond in november 2007 uit 127 species waarvan 121 species behoren tot de niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM). Van 1990 tot 2000 werden 28 nieuwe species geïdentificeerd, van 2000 tot september 2007 kwamen er 41 bij. De ontdekking en identificatie van nieuwe species heeft nog steeds een continu voortgaande snelheid. Ongeveer tweederde van het aantal NTM species is initieel gevonden als infectieus agens bij mensen en al deze, met uitzondering van *Mycobacterium leprae* en *M. ulcerans*, worden beschouwd als opportunistisch pathogeen.

Klinisch kunnen deze NTM verantwoordelijk zijn voor ondermeer huidinfecties, longinfecties, gedissemineerde infecties, lymphadenitis, osteoperose en keratitis. NTM infecties worden voornamelijk aangetoond in immuun gecompromitteerde patiënten, maar zijn ook niet zelden gevonden in immuun competente patiënten. Vooral lymphadenitis is een veel voorkomende klinische NTM manifestatie bij “gezonde” kinderen.

De grote aantallen species en de grote verscheidenheid in klinisch beeld maken van de mycobacteriële diagnostiek een ingewikkeld stukje microbiologie.

Conventionele mycobacteriologie bestaat voornamelijk uit langdurige kweek, microscopische kleuringen en resistentiebepalingen in een aanvullende kweekperiode, eventueel aangevuld met of vervangen door immunologische of histopathologische methoden. Vanwege veiligheidsvoorschriften is er voor de conventionele mycobacteriologische diagnostiek een gespecialiseerd laboratorium vereist dat voldoet aan de normen voor bio-safety-level 3. De afwezigheid van een specialistisch laboratorium, alsmede de aspecificiteit van kleuringen en de langdurige kweekperiode, resulteren in een groeiende behoefte aan moleculaire detectie- en identificatiemethoden.

Moleculaire technieken worden inmiddels als gouden standaard beschouwd bij de identificatie van positieve kweken, maar worden voor de detectie van NTM in klinische materialen nog maar mondjesmaat toegepast. Meestal bestaan deze methoden dan uit conventionele PCR, soms multiplex- of nested-, met additionele analysestappen, welke niet als optimaal gelden voor het hedendaagse microbiologische laboratorium. Vanwege de verschillende stappen zijn ze vaak contaminatiegevoelig, vereisen een variatie aan apparatuur en over het algemeen missen ze een hoge sensitiviteit. Real-time PCR is in theorie hiervoor een goede vervanging, maar vooralsnog was een genus-specifieke test moeilijk te realiseren wegens de grote variatie binnen de NTM groep.

Hoofdstuk 3 beschrijft het ontwerp van een genus-specifieke real-time PCR, die bij toepassing op lymfeklier-biopsies, een NTM infectie kon aantonen binnen slechts 2 dagen. Bij vergelijking van de real-time PCR met conventionele diagnostische methoden, bereikte de PCR een sensitiviteit van 72% vergeleken met 42% voor de kweek. Door de toevoeging van een *M. avium*-specifieke probe werd de aanwezigheid van deze species direct herkend bij 38

van de 67 NTM positieve lymphadenitis-patiënten. De toepassing van deze diagnostische test resulteerde in de mogelijkheid binnen enkele dagen een gerichte behandeling te starten zonder de kweekresultaten af te wachten.

In Hoofdstuk 4 is dezelfde real-time PCR uitgebreid met een *M. haemophilum*-specifieke probe. Deze species werd bij diverse patiënten aangetoond na sequencing van PCR producten met enkel een positief signaal in de genus-specifieke real-time PCR zoals beschreven in hoofdstuk 3. De toevoeging van de *M. haemophilum*-specifieke probe resulteerde in de ontdekking van 16 *M. haemophilum*-positieve lymphadenitis-patiënten. Omdat initieel niet aan de specifieke kweekvoorwaarden voor deze species werd voldaan, waren deze diagnoses niet gesteld zonder de toepassing van de real-time PCR. Hieruit volgde de vraag hoeveel mogelijke NTM infecties in het verleden gemist zouden zijn (!)

Hoofdstuk 5 beschrijft daarom de toepassing van de genus- en species-specifieke real-time PCR detectie in paraffine-ingebedde huidbiopties. Van de 30 biopties, verzameld tussen 1982 en 2004, bleken 13 materialen positief voor mycobacteriën. In 7 materialen werd *M. haemophilum* geïdentificeerd. Ten tijde van de afname van de klinische materialen waren maar in 5 van de 13 NTM-positieve biopties mycobacteriën aangetoond.

Hoofdstuk 6 omvat de genotypering van een collectie *M. haemophilum* stammen. Van de in totaal 32 *M. haemophilum* stammen, die aangetoond werden bij kinderen met lymphadenitis, bleken er 30 uit de regio Amsterdam afkomstig te zijn. Om hiervan aan te tonen dat deze stammen aan elkaar verwant waren, is een genotypering uitgevoerd. Slechts twee keer eerder waren genotyperings-studies uitgevoerd, beide op een kleine collectie stammen. 128 stammen werden verzameld vanuit verschillende continenten en klinische manifestaties om te vergelijken in AFLP. De methode had een goed onderscheidend vermogen en was in staat grote variabiliteit in genotypen te herkennen. Niet alleen de stammen uit Amsterdam bleken identieke patronen te vormen (en bewezen daarmee verwant te zijn), maar infecties met de species kwamen vaker geclusterd voor. Twee clusters uit Australië en een cluster uit New-York werden aangetoond. De identieke patronen bleven langdurig stabiel; ze bleven tot 18 jaar lang onveranderd.

In hoofdstuk 7 is de genotypering van *M. avium* stammen beschreven. Lymphadenitis bij kinderen wordt vaak “vogeltjes-tbc” genoemd, naar de species *M. avium*. Tegenwoordig is een typeringstechniek beschikbaar die het onderscheid kan maken tussen het vogel-type *M. avium*, en humane typen. Deze methode is in hoofdstuk 7 toegepast om aan te tonen welke subspecies *M. avium* lymphadenitis veroorzaakt en hoe groot de genetische variabiliteit tussen stammen is. In tegenstelling tot de clustering van *M. haemophilum* stammen in hoofdstuk 6, werd tussen de *M. avium* stammen een grote variatie aangetoond. Geen enkele stam was van het “vogel-type” maar ze behoorden allen tot de sub-species *M. avium hominissuis*.

In hoofdstuk 8 van dit proefschrift worden zes gen-targets vergeleken voor de identificatie van zes verschillende NTM species. De meest gebruikte identificatiemethode voor NTM species is direct sequencing van gen-targets na een positieve kweek. Er zijn verschillende sequentie targets bekend die geschikt zouden zijn voor dit doel, maar een vergelijking van de functionaliteit is nauwelijks uitgevoerd. Een geschikte target dient voldoende variabel te zijn, maar evengoed geconserveerd voor de toepassing van genus-specifieke primers. In de vergelijking beschreven in hoofdstuk 8 bleek dat de verschillende gen-targets een verschillend niveau van differentiatie bieden. De bekendste, het 16S rRNA-gen, biedt enkel differentiatie tot op het niveau van speciesgroepen, maar is zeer betrouwbaar. Daarentegen zijn de ITS, en het *rpoB*- en het *hsp65*-gen in staat tot op sub-species niveau te differentiëren. Het nadeel van deze drie genoemde targets is dat de variatie zo groot kan zijn, dat de genus-specifieke amplificatie niet gegarandeerd kan worden. De nieuwste targets: *sodA* en *secA1* lijken een gemiddeld differentiatieniveau te bieden. Helaas zijn van beide genen te weinig sequenties bekend om alle species te herkennen. Waarschijnlijk is de beste wijze van identificatie het gebruik van twee gentargets tegelijk, zoals bijvoorbeeld de combinatie van 16S en ITS sequenties.

Doordat het genus *Mycobacterium* zeer gevarieerd is en er onvoldoende kennis bestaat over de genetische opbouw van dit genus, is het tot nu toe niet geheel gelukt een moleculaire assay te ontwikkelen die zonder beperkingen toegepast kan worden ter vervanging van de huidige kweekmethoden. De algemene aanwezigheid van vervuilend mycobacterieel DNA in reagentia en het ontbreken van een “Multi-copy” target voor detectie, bemoeilijken het gebruik van real-time PCR in de directe detectie van NTM. Mogelijk kunnen RNA-detectiemethoden hier een oplossing vormen.

In toekomstig onderzoek naar de verbetering van de NTM diagnostiek zou de verdere ontwikkeling van een sensitieve en specifieke moleculaire test voor de detectie van NTM in klinische materialen centraal moeten staan. Voor meer kennis over de epidemiologische eigenschappen en klinische relevantie van NTM infecties, zal het gebruik van identificatie- en typeringstechnieken een belangrijke rol kunnen spelen en zouden toepassingen hiervan, zoals bijvoorbeeld van de MALDI-TOF techniek, onderzocht moeten worden.

