

NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie

Het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie is het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Het doel van het tijdschrift is de lezers te informeren over ontwikkelingen betreffende het vakgebied. In het tijdschrift worden zowel fundamentele als klinische aspecten van de medische microbiologie belicht. Daarnaast biedt het plaats voor promoties e.d., nieuws over evenementen en mededelingen uit de (werkgroepen van de) vereniging.

NVMM-secretariaat

Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden
Tel. (058) 293 94 95
Fax (058) 293 92 00
E-mail: nvmm@knmg.nl
Internet: www.nvmm.nl

Hoofdredactie

Dr. G.I. Andriess, mw. dr. E. Heikens
Redactie
Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,
mw. drs. M. Jager, dr. J.A. Kaan,
dr. J.S. Kalpoe, B. Meek, dr. M. Van Rijn,
dr. H.F.L. Wertheim, R. te Witt

Redactiesecretariaat

Van Zuiden Communications B.V.
Mw. M.S. Kapteyn-Brus
Tel. (0172) 476191, e-mail:
kapteyn@vanzuidencommunications.nl

Advertentie-exploitatie

Van Zuiden Communications B.V.
Dhr. D. Mackay
Tel. (0172) 47 61 91

Oplage en frequentie

900 exemplaren, 4 x per jaar

Abonnementen

Gratis voor leden van de NVMM en leden van de VIZ.
Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 61,- per jaar
Buiten Nederland, in Europa: 85,- per jaar
Losse nummers: 12,50
Opgave abonnementen:
Tel. (0172) 47 61 91



© 2013, Van Zuiden Communications B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoerd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. Uitgever en redactie verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en redactie op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en redactie aanvaarden dan ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt met nadruk aangeraden deze informatie niet geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun professionele kennis en ervaring en de te gebruiken informatie te controleren.

Algemene voorwaarden

Op alle aanbiedingen, offertes en overeenkomsten van Van Zuiden Communications B.V. zijn van toepassing de voorwaarden die zijn gedeponneerd bij de Kamer van Koophandel te Leiden.

ISSN 0929-0176



Inhoud

Van de redactie	46
Transmissieroute	
<i>B.C. van Hees</i>	47
Thema: tuberculose	
Controversen bij de screening op tuberculose bij laboratoriumpersoneel en andere werkers in de gezondheidszorg	48
<i>R. van Hest, B. Mulder</i>	
Tuberculosebestrijding in Afrika; vernieuwingen en obstakels	52
<i>E. Bowles</i>	
Epidemiologische typering van <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	55
<i>D. van Soolingen, G. de Vries, R. van Hunen, M. Kamst, J. de Beer</i>	
Toekomstvisie op ontwikkelingen in de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose en andere mycobacteriosen	61
<i>D. van Soolingen, A. van der Zanden, J. van Ingen</i>	
Diagnostiek en behandeling van infecties door nontuberculeuze mycobacteriën	65
<i>J. van Ingen</i>	
Nieuwe richtlijn voor microbiologische diagnostiek van tuberculose	73
<i>E.J. Kuijper, S. Vainio, M. Scholing, et al.</i>	
<i>Mycobacterium bovis</i>	77
<i>O. Akkerman</i>	
Ingezonden	
Teske Schoffelen wint Dutch ECCMID Award 2014	80
<i>J.W. Mouton, E.J. Kuijper, F.H. van Tiel, A. Voss</i>	
Serologiecursus 2013 "Antistof, het verborgen goud"	81
<i>A.T.R. Tholen</i>	
"The right drug for every bug; optimizing antimicrobial therapy through professional symbiosis" - Verslag van gezamenlijk symposium van NVMM en VAZA	83
<i>L. Andrews, M. van Doorn-Schepens, L. Favie, L. Franken, I. Maat, M. McCall, I. Overdevest, L. Reubsaert</i>	
Samenvatting proefschrift	
Prevention of healthcare associated <i>Staphylococcus aureus</i> infections	86
<i>L.G.M. Bode</i>	
Agenda	87
Boekrecensie	
Handboek vaccinaties, deel B (Infectieziekten en vaccinaties)	88
<i>M. van Rijn</i>	
Promoties	89

Toelichting bij cover: centrale schilderij: Edvard Munch, moeder met ziek kind (tbc), 1886; linksboven: Robert Koch, ontdekker tbc-bacterie (*Mycobacterium tuberculosis*), 1843-1910; rechtsboven: X-ray, longen tbc-patiënt; linksonder: Christobal Rojas, La Miseria, 1886; rechtsonder: tbc-patiënt in Afrika.
Cover: Loes van Damme en Hans den Boer, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam.

De witte dood

Toen Edvard Munch rond 1900 zijn “Syke barn”, het zieke kind zoals te zien op de voorpagina, schilderde was *de witte dood* nog een bekend eufemisme voor de bedreigende ziekte tuberculose. Al eerder (2002) verschenen, verdeeld over enkele nummers van het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* (NTMM), zes artikelen over tuberculose (zie nvmm.nl). Tuberculose vormt mondiaal een aanzienlijk groter probleem dan in Nederland maar desondanks heeft het merendeel van de microbiologen in Nederland met regelmaat te maken met deze ziekte. Het leek de redactie zinvol de stand van zaken nu, na 12 jaar, breed te bekijken. Net als in 2002 was het weer niet moeilijk om auteurs van Nederlandse bodem te vinden die bereid waren een deel van hun onderzoek te beschrijven. De redactie kon samen met Bert Mulder een lijst samenstellen van degenen die zich nu in enigerlei vorm met dit onderzoeksveld bezighouden.

Ook dit keer is het aantal artikelen te groot voor één uitgave. In dit nummer (NTMM 2) komen de laatste ontwikkelingen aan de orde. De opvallendste is misschien wel de komst van de IGRA's. Van Hest en anderen beschrijven de toepassing ervan bij het screenen van laboratoriumpersoneel. De epidemiologische aspecten van tuberculose in Afrika worden beschreven in een overzichtsartikel van Edmee Bowles; in Afrika wordt meer en meer gewerkt met kant-en-klare PCR's (GeneXpert) voor diagnostiek en preliminaire resistentiemeting. Maar de goede oude klinische blik in combinatie met het microscoop en de zuurvaste kleuring is nog altijd van onschatbare waarde.

Van Soolingen en coauteurs leverden in 2002 een bijdrage en ook nu gaat het weer over de genotypering die verbeterd is, waardoor de epidemiologische inzichten kunnen worden bijgesteld. Een tweede artikel van Van Soolingen heeft het karakter van een overzicht over de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose nu en in de nabije toekomst. In dit artikel wordt de discussie geopend over de mogelijkheid van centralisatie van de laboratoria voor tuberculosedagnostiek. Daarover is zeker nog niet het laatste woord gesproken.

Het aandeel dat *M. bovis*, ondanks het pasteuriseren van melk, nog altijd heeft in ons land en de plaats van dit species in de tuberculosefamilie wordt behandeld door de Groningse longarts Akkerman.

De atypische mycobacteriën heten nu non-tuberculeuze mycobacteriën. Van Ingen, die internationaal veel publiceert, schreef hierover een verduidelijkend overzichtsartikel.

De richtlijn die in 2006 voor de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose werd geschreven was aan herziening toe. Kuijper geeft een voorschot op de richtlijn die waarschijnlijk dit jaar nog verschijnt. Zoals gezegd, binnenkort meer over dit thema.

Tuberculose blijft een boeiend onderwerp in de microbiologie. Maar met *de witte dood* (zie Google) wordt inmiddels voornamelijk gedoeld op suiker als oorzaak van vele ziekten.

J.A. Kaan, arts-microbioloog, redactie NTMM

Aanvulling op de Transmissieroute in NTMM 3, 2013

In de Transmissieroute van NTMM 3, 2013 is ten onrechte gemeld dat er zes dagen verliepen tussen het aanbieden van de stam aan het RIVM en de melding dat het om *Brucella* ging. In werkelijkheid is de melding een dag na binnenkomst bij het RIVM gebeurd. De vertraging van zes dagen was elders ontstaan als gevolg van het ontbreken van de uitgebreide databank zoals vermeld.

J.A. Kaan

Moskou

B.C. van Hees

Na een zenuwslappende paspoortcontrole word ik bedolven onder de taxichauffeurs die mij er tot vervelends aan toe van willen overtuigen dat ik echt een taxi nodig heb. Nu heb ik dat ook, maar die heeft als het goed is een bordje met mijn naam erop. Enigszins ongemakkelijk kijk ik vergeefs rond. Na een kwartier verschijnt er dan toch een Russische man met een verkreukeld A4-tje met (ongeveer) mijn naam erop. Met een chauffeur met een doodswens laveren wij door het onmogelijke verkeer van Moskou. Hij ziet mij regelmatig verstarren en als ik "Watch out!" roep bij een op een haar na botsing, lacht hij en stelt mij 'gerust' met de mededeling: "It's just Moscow traffic, no rules, no problems!" Aan het aantal ongelukken onderweg te zien, is er wel degelijk een probleem.

Blij dat ik mijn hotel bereikt heb, eet ik nog een hapje in het restaurant waar communicatie met de ober wel hele aparte vormen aanneemt. Hij blijft strak Russisch praten en wil van geen interactie weten. Uiteindelijk eet ik iets van goulash, geloof ik. De volgende ochtend met een gids het centrum in. Zij blijft maar herhalen hoe vroeger, onder het regime, alles veel beter was, want gratis. Openbaar vervoer, sport, muziekscholen, alles gratis. Daarnaast zegt ze bij ieder gebouw dat je het eigenlijk bij nacht moet zien, omdat het dan allemaal veel mooier is, door de verlichting. Ik kijk ondertussen verwonderd om me heen en geniet van deze stad. Het is opvallend schoon op straat en overigens niet druk. Wel veel politie en militair vertoon.

Vanmiddag mag ik een verhaal houden op een microbiologisch congres. Een soort Russische ECCMID stel ik me zo voor. Via het schitterende metrostelsel gaan we naar het congrescentrum dat buiten het centrum van de stad ligt. Eenmaal binnen, is het ondanks het Cyrillisch overal toch een bekend beeld. Een (veel te) grote blokkendoos met gigantische, brede hoge gangen waar mensen met badges verwaasd doorheen lopen, programmaboekje in de hand. En de bekende markt met stands van de industrie.

Gisteravond begreep ik dat niet alleen mijn dia's in het Russisch vertaald zijn, maar dat ook ik, on the spot, vertaald zou worden. Dit betekent dat het geheel een stuk langer zal gaan duren en ik gisteravond het verhaal dus grondig moest inkorten om binnen de 50 minuten te blijven. Van tevoren spreek ik met de vertaalster, een kittige tante, gynaecoloog en freelancevertaalster. Ze verzekert mij dat het allemaal zeer soepel zal verlopen en

gaat er prat op dat zij praktisch simultaan kan vertalen. Niet goed wetend wat ervan te verwachten ga ik toch met lichte spanning mijn sessie binnen. Voor mij spreekt een Fransman Engels (onverstaanbaar), vertaald door de dame in het Russisch (onverstaanbaar).

Dan is het mijn beurt. Na anderhalf woord word ik onderbroken door de vertaalster, die ook een microfoon heeft en mij vertaalt. Na een tijdje weet ik er in ieder geval een paar zinnen doorheen te krijgen voordat zij begint, we hebben dus een beetje een ritme. Soms zeg ik één zin, met een duidelijke boodschap en is zij vervolgens een tijd lang tientallen volzinnen aan het maken. Terwijl ik benieuwd ben naar haar verhaal, probeer ik de lijn van mijn verhaal vast te houden. Bij het zien van een plattegrond van mijn laboratorium, valt de hele zaal plenair van haar geloof. Alles in één ruimte? Materiaal ontvangen, platen beënten in dezelfde ruimte waar je platen afleest? Dat dat mag! Uit het verhaal van de professor na mij begrijp ik, dat in Rusland zeer strikte regels zijn voor het gebruik van ruimtes in het laboratorium. Ik vraag waar deze richtlijnen vandaan komen, wie ze heeft opgesteld en hoe er gecontroleerd wordt. Deze regels zijn al zo'n 50 jaar oud, niet gemaakt door mensen uit het veld en allerm minst evidence-based. Ik proef de frustratie van de mensen in de zaal hierover. Jaarlijks wordt hier streng op gecontroleerd. Ik denk aan Nederland, en aan de steeds groter wordende stroom van richtlijnen waar wij ons in begraven. Wij zijn echter in de gelegenheid deze richtlijnen zelf op te stellen! Laten we hier op een juiste en proactieve manier gebruik van maken en ons verantwoordelijk voelen voor een eenduidig beleid, gedragen door onze beroepsgroep.

De Transmissieroute zal worden voortgezet door mevrouw K. Waar, arts-microbioloog bij Izore, Centrum Infectieziekten Friesland in Leeuwarden.

Correspondentieadres: dr. B.C. van Hees, arts-microbioloog, Gelre ziekenhuizen Apeldoorn, e-mail: b.van.hees@gelre.nl.

Controversen bij de screening op tuberculose bij laboratoriumpersoneel en andere werkers in de gezondheidszorg

R. van Hest, B. Mulder

Trefwoorden

Screening, mantouxtest, IGRA-test

Historisch perspectief van screening

Van oudsher is het risico op tuberculose(-infectie) bij medische beroepen hoger dan onder de rest van de bevolking; rond 1900 misschien wel 35-50 maal hoger.¹ Tot 1945 werd gerapporteerd dat 80-100 procent van de verpleegkundigen een tuberculinehuidtestomslag kreeg tijdens de opleiding.² Dat een negatieve mantouxtest in deze groep positief werd, wil niet altijd zeggen dat er sprake was van een recente infectie met *Mycobacterium tuberculosis* tijdens het werk: in die tijd was tuberculose in Nederland een volksziekte en je kon op jonge leeftijd ook buiten het ziekenhuis geïnfecteerd raken. Pas na 1945, toen door het geleidelijk beschikbaar komen van (een combinatie van) effectieve tuberculostatica, tuberculose onder de bevolking in Westerse landen (sterk) ging dalen, werd tuberculose als beroepsrisico toenemend onderwerp van discussie. Rond 1985 nam tuberculose in Westerse landen weer toe, voornamelijk door immigratie van mensen uit landen waar tuberculose nog wel hoogendemisch was en in mindere mate door co-infectie met hiv. Vooral in de Verenigde Staten kwamen mini-epidemieën van tuberculose voor in ziekenhuizen, werd bij patiënten (en personeel) tuberculose-hiv-co-infectie vastgesteld en zag men een toename van meervoudig resistente (MDR) tuberculosestammen, dat wil zeggen ten minste resistent voor de twee belangrijkste tuberculostatica isoniazide en rifampicine. De ontmanteling van de tuberculosebestrijding onder president Reagan, omdat de ziekte toch bijna uitgestorven leek, speelde hierbij ook een rol. Er werden weer hoge percentages mantouxtestomslagen gerapporteerd onder gezondheidswerkers en sommigen overleden zelfs na het ontwikkelen van de ziekte. Onder de meest genoemde gezondheidswerkers met een verhoogd risico op infectie met *M. tuberculosis* horen medewerkers van tuberculoseafdelingen en sanatoria, verpleegkundigen die regelmatig werken met hiv-seropositieve

patiënten of drugsverslaafden en histopathologie- en microbiologieanalisten.¹ In de jaren 50 van de vorige eeuw werd voorgesteld om als preventiemaatregel alle nieuwe patiënten op tuberculose te screenen met een thoraxfoto. Vanaf de jaren 90, toen de Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in de Verenigde Staten begon met het publiceren van richtlijnen voor interventies om het risico op infectie van gezondheidswerkers en patiënten te beperken, kwam de nadruk meer op technische infectiepreventiemaatregelen te liggen, zoals luchtbehandeling (volumewisselingen en HEPA-filters), germicide ultraviolette lampen, betere mondmaskers (FFP2) en isolatiekamers (en laboratoria) met onderdruk, naast screening van de medewerkers.²

Hoe hoog is het risico op tuberculose bij gezondheidswerkers in lage-incidentielanden?

Internationale reviews schatten dat het relatieve risico op tuberculose bij gezondheidswerkers in Westerse landen twee- tot driemaal verhoogd is vergeleken met de rest van de bevolking.^{3,4} In Nederland werd dit relatieve risico tussen 1995 en 1999 geschat op tweemaal verhoogd, gemiddeld acht gevallen per jaar.⁵ In dit onderzoek bleek tevens dat 42 procent van de gezondheidswerkers met tuberculose was geïnfecteerd op het werk, maar de overigen in het buitenland of langer geleden in Nederland. Eén van de risicofactoren in die jaren bleek suboptimale infectiepreventie. Het aantal medewerkers dat geïnfecteerd raakt op de werkplek zonder actieve tuberculose te ontwikkelen zal mogelijk tien maal hoger zijn dan het

Dr. R. van Hest, tuberculosearts/epidemioloog, GGD Rotterdam-Rijnmond; GGD Groningen; KNCV Tuberculosefonds.
Correspondentieadres: dr. B. Mulder, arts-microbioloog,
Laboratorium voor microbiologie Twente-Achterhoek Hengelo,
e-mail: b.mulder@labmicta.nl.

aantal ziektegevallen. Laboratoriummedewerkers, vooral van tuberculoseafdelingen, staan hoog in de lijst van werkers in de gezondheidszorg met een verhoogd risico en hebben mogelijk zelfs een hoger relatief risico omdat ze daadwerkelijk met vermeerderde tuberculosekweken werken,⁶ maar dit is niet apart onderzocht.¹

Screening op tuberculose(-infectie) van gezondheidswerkers

Voor screening zijn thoraxfoto's, de mantouxtest en, meer recent, de interferon-gamma release assays (IGRA's) beschikbaar,⁷ te weten de Quantiferon[®]-test, een ELISA, en de T-spot.TB[®]-test, een ELISPOT. Met een thoraxfoto wordt naar actieve tuberculose in voornamelijk de longen gezocht, maar deze foto laat geen latente tuberculose-infectie (LTBI) zien. Een thoraxfoto kan fout-negatief zijn bij mensen met een ernstige (cellulaire) immunestoornis. Ze werden lange tijd gebruikt bij BCG-gevaccineerd personeel, omdat de mantouxtest in deze situatie onbetrouwbaar werd geacht vanwege mogelijke kruisreactie op antigenen in het vaccin. Tegenwoordig wordt in deze groep de thoraxfoto steeds vaker vervangen door de IGRA. IGRA-testen hebben het enorme voordeel boven de mantouxtest dat zij geen enkele (kruis)reactiviteit vertonen met *Mycobacterium bovis*-BCG of de meeste non-tuberculeuze mycobacteriën, omdat zij zijn gebaseerd op de specifieke antigenen ESAT-6, CFP-10 en TB7.7 van *M. tuberculosis*, met andere woorden de IGRA-test is veel specifiekere dan de mantouxtest. Vooral laboratoriumpersoneel heeft een verhoogde blootstelling aan patiëntenmateriaal en kweken van non-tuberculeuze mycobacteriën.⁸ Hierbij moet wel worden aangetekend dat de IGRA antigenen ook voorkomen in enkele non-tuberculeuze mycobacteriumsoorten, met name *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium szulgai* en *Mycobacterium flavescens*. Echter, een eerste IGRA-screening bij gezondheidswerkers, die vanwege BCG altijd met thoraxfoto zijn onderzocht, is in feite te beschouwen als een 'aanstellingskeuring'. De gevonden positieve reactie kan immers al jaren bestaan, met in die situatie een zeer geringe kans op progressie naar de ziekte. Zeker bij marginale IGRA-waarden dient dan een terugkeer naar screening met thoraxfoto's te worden overwogen.⁹

Toch kan voor screening van gezondheidswerkers, in eerste instantie, nog vaak de mantouxtest worden gebruikt. Veel jonge Nederlandse gezondheidswerkers zijn niet met BCG gevaccineerd en hebben, nu tuberculose in Nederland geen volksziekte meer is, een lage voorafkans een LTBI te hebben. Maar ook op babyleeftijd met BCG gevaccineerde allochtone gezondheidswerkers kunnen de kruisreactiviteit met de mantouxtest tien jaar later tot 99 procent hebben verloren.¹⁰ De enkele positieve mantouxreacties (bijvoorbeeld meer dan 10 mm) kunnen dan met

een IGRA worden gevalideerd. Voor een mantouxtest zijn een ervaren 'zetter' en 'lezer' nodig (en een tweede bezoek) en er kunnen meetfouten voorkomen. Voor een IGRA is slechts één bezoek voldoende en zijn menselijke leesfouten uitgesloten maar de "afnemer" dient bekend te zijn met het krachtig schudden van de Quantiferon[®] buis en dienen de testbuis en de twee controlebuizen binnen een bepaalde tijd in het laboratorium te worden verwerkt. Zowel de mantouxtest als de IGRA kan fout-negatief zijn bij mensen met T-cellulaire immunestoornissen, maar de IGRA, vooral de T-Spot.TB[®]-test, lijkt hier minder gevoelig voor te zijn, omdat de T-Spot.TB[®]-test werkt met een gestandaardiseerd aantal T-cellen in de ELISPOT 'wells'.¹¹ Bij de periodieke screening met de mantouxtest zonder duidelijke risicomomenten voor infectie met *M. tuberculosis* zijn conversies, dat wil zeggen een omslag van negatief naar positief ('boosting') en spontane reversies, dat wil zeggen een omslag van positief naar negatief beschreven. Als ex-vivotest kunnen herhaalde IGRA's elkaar niet boosten maar een mantouxtest langer dan zeven dagen voor afname van de IGRA kan dat wel.^{12,13} Leyten et al. hebben dit ook in Nederland beschreven en momenteel wordt aanbevolen om de IGRA af te nemen bij het aflezen van een (positieve) mantouxtest, omdat dit drie dagen na het 'zetten' gebeurt.¹⁴ Binnen verschillende landen worden verschillen strategieën gehanteerd voor screening van gezondheidswerkers: in de Verenigde Staten wordt alleen de IGRA geadviseerd terwijl in het Verenigd Koninkrijk, Canada en Nederland een tweetrapsstrategie wordt geadviseerd: eerst een mantouxtest en daarna een IGRA ter validatie van positieve mantouxuitslagen.

Testvariatie

Meestal worden de mantouxtest of IGRA slechts eenmaal gebruikt, bijvoorbeeld bij een contactonderzoek of een immigratiescreening. Bij periodieke screening van gezondheidswerkers worden de testen herhaaldelijk gebruikt en dat stelt extra eisen aan de test, in het bijzonder de mogelijke testvariatie. Hierbij kunnen we onderscheiden 1) de 'herhaalbaarheid', dat wil zeggen hoe stabiel is de uitslag van een tweede test op hetzelfde monster in hetzelfde laboratorium, 2) de 'reproduceerbaarheid', dat wil zeggen hoe stabiel is de uitslag als hetzelfde monster in een ander laboratorium zou worden getest, en 3) de 'persoonlijke variatie', dat wil zeggen hoe stabiel zijn de uitslagen bij één persoon op verschillende momenten zonder risico voor infectie. Bij herhalen van de Quantiferon[®]-test op hetzelfde monster in hetzelfde laboratorium werden onlangs 8 procent discordante uitslagen gevonden, dat wil zeggen van positief naar negatief of omgekeerd, voornamelijk rond het afkappunt van 0,35 interferon eenheden per milliliter (INF IE/ml).¹⁵ Whitworth et al. vonden 7,7 procent discordantie bij hertesten van hetzelfde monster in verschillende laboratoria.¹⁶

Periodieke screening met IGRA

Inmiddels is duidelijk geworden dat ook bij serieel uitvoeren van IGRA testen interpretatieproblemen kunnen optreden bij uitslagen rond de afkappwaarde. In een grote studie met acht seriële IGRA-testen in minder dan drie maanden, gecombineerd met een mantouxtest, beschreven Van Zyl-Smit et al. het fenomeen van 'wobbling around the cut-off', dat wil zeggen het optreden van 'spontane' of 'testinherente' conversies en reversies.^{12,13} Hierdoor lijkt er een grijs gebied rond het afkappunt te bestaan (de 'borderline' of 'uncertainty'-zone) waar de spontane variatie de interpretatie van de IGRA-uitslagen bemoeilijkt. Dit grijze gebied wordt vaak gedefinieerd als tussen 0,20 INF IE/ml en 0,70 INF IE/ml.^{9,17-19} De conversies en reversies lijken vaker op te treden bij de IGRA vergeleken met de mantouxtest.²⁰ Hiervoor zijn verschillende verklaringen gesuggereerd: 1) de T-'effector'-cellen van de IGRA zouden gevoeliger zijn voor variatie dan de T-'memory'-cellen van de mantouxtest, 2) variatie in laboratorium en testprocedures (bijvoorbeeld tijd tot incubatie), 3) spontane eliminatie van de LTBI of 4) cyclische expressie in tijd van antigenen door *M. tuberculosis*.²¹

Maar hoe dienen periodieke IGRA-uitslagen dan te worden geïnterpreteerd in dit grijze gebied? Om te beginnen is er de discussie wat een 'LTBI' nu eigenlijk is. Het is op zijn best een blijvende *M. tuberculosis* immunerespons en niet noodzakelijk een echte latente infectie met levende micro-organismen en het potentiële risico om de ziekte tuberculose te ontwikkelen.¹⁷ Vervolgens komt de vraag wat de definitie van een IGRA-conversie en IGRA-reversie is wanneer herhaalde IGRA-uitslagen instabiel kunnen zijn. Pai *et al.* beschrijven dat conversie van < 0,20 INF IE/ml naar meer dan 0,50 INF IE/ml het best past bij een 'echte' LTBI.²² Andere auteurs hanteren dezelfde ondergrens maar stellen dan weer dat conversie van < 0,20 INF IE/ml naar meer 0,70 INF IE/ml het best past bij een 'echte' LTBI bij gezondheidswerkers.²³ Ook de ondergrens van de fabrikant wordt beschreven in de literatuur: conversie van < 0,35 INF IE/ml naar meer dan 0,70 INF IE/ml past het best bij een 'echte' LTBI.^{9,12} Sommige auteurs stellen dat een waarde van meer dan 1,0 INF IE/ml suggestief is voor 'echte' LTBI bij gezondheidswerkers.¹⁹ Hoge IGRA-waarden zouden een betere positief voorspellende waarde hebben voor progressie van LTBI naar de ziekte tuberculose.^{24,25} Een recente studie onder 9.153 gezondheidswerkers in de Verenigde Staten liet zien dat het afkappunt van 0,35 INF IE/ml tot een overschatting van het aantal conversies leidt en significant dient te worden opgehoogd, tot wellicht 5,3 INF IE/ml om een vergelijkbare proportie omslagen te krijgen als in het verleden met de mantouxtest.²⁶ Dorman et al. vonden onder 2.263 gezondheidswerkers in de Verenigde Staten dat het verhogen van het afkappunt

van 0,35 INF IE/ml naar 1,00 INF IE/ml het aantal IGRA-conversies al sterk verlaagde (van 6,1 procent naar 1,5 procent), maar dan nog steeds hoger bleef dan mantouxtestomslagen.²⁰ Het verhogen van het afkappunt zal de sensitiviteit voor de detectie van werkelijk geïnfecteerden verlagen, maar dit moet worden gezien in de context van een kans om ziek te worden na een LTBI van ten hoogste 10 procent bij immunocompetente gezondheidswerkers. Ten slotte wordt voorgesteld om voor IGRA-uitslagen een risicostratificatie met betrekking tot het afkappunt te gebruiken, in analogie aan de mantouxtest waar voor hoog, gemiddeld en laag risico respectievelijk afkappunten van 5 mm, 10 mm en 15 mm werden gehanteerd.²⁷

Recent is een samenvatting verschenen van een meeting in Atlanta van een groep Amerikaanse experts over de variatie rond het afkappunt bij de toepassing van seriële IGRA-testen.²⁸ Er bestaat grote behoefte aan nationale richtlijnen om de onverwacht grote hoeveelheid positieve IGRA-resultaten bij serieel testen in laagrisicopopulaties goed te begeleiden en effectief te onderscheiden van recent geïnfecteerden. Onlangs is in Nederland via de KNCV een richtlijn verschenen met betrekking tot het screenen van ziekenhuismedewerkers (Commissie voor Praktische Tuberculosebestrijding / KNCV Tuberculosefonds, 2013).²⁹ Wel is duidelijk dat de interpretatie van IGRA-uitslagen bij periodieke screening van gezondheidswerkers moet worden voorbehouden aan een (beperkte) groep deskundigen met specifieke expertise met deze materie. Dit geldt overigens ook voor het gebruik van IGRA's bij contactonderzoek bij jonge kinderen (< 5 jaar oud), pre-TNF-alfablokkerende medicatiescreening of pre-organtransplantatiescreening. In deze (klinische) context dient geen 'uncertainty'-zone te worden gehanteerd en wordt 'boosting' soms juist gestimuleerd om tot een maximale sensitiviteit van het onderzoek te komen.

Conclusies

Er bestaan nog steeds controversen bij de screening op LTBI en actieve tuberculose bij laboratoriumpersoneel en andere gezondheidswerkers. Verder onderzoek naar de betekenis van conversies en reversies van de IGRA's, in het bijzonder testuitslagen rond het afkappunt, is noodzakelijk. In de tussentijd dienen laboratoria een volledige IGRA-uitslag te geven aan de aanvrager, dat wil zeggen de absolute uitslag in INF IE/ml en niet alleen 'positief' of 'negatief', waarbij ook de uitslag van de mitogene buis bijdragend is, zeker in geval van mogelijke immunestoornissen.³⁰ Periodieke uitslagen rond het afkappunt dienen kritisch te worden beoordeeld binnen de (klinische) context. Omdat bij de screening van gezondheidswerkers geen 'boosting' gewenst is, dient de IGRA bij de tweetrapsstrategie op de dag van het aflezen van de positieve mantouxreactie te worden afgenomen.

Referenties

1. Seidler A, Nienhaus A, Diel R. Review of epidemiological studies on the occupational risk of tuberculosis in low-incidence areas. *Respiration*. 2005;72:431-46.
2. Sepkowitz KA. Tuberculosis and the health care worker: A historical perspective. *Ann Int Med*. 1994;120:71-9.
3. Menzies D, Joshi R, Pai M. Risk of tuberculosis infection and disease associated with work in health care settings. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11:593-605.
4. Baussano I, Nunn P, Williams B, Pivetta E, Bugiani M, Scano F. Tuberculosis among health care workers. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:488-94.
5. De Vries G, Sebek MM, Lambregts-van Weezenbeek CS. Healthcare workers with tuberculosis infected during work. *Eur Respir J*. 2006;28:1216-21.
6. Leyten EM, Arend SM, Prins C, Cobelens FG, Ottenhoff TH, van Dissel JT. Discrepancy between *Mycobacterium tuberculosis*-specific gamma interferon release assays using short and prolonged in vitro incubation. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:880-5.
7. Pai M, Denkinger CM, Kik SV, Rangaka MX, Zwerling A, Oxlade O, et al. Gamma interferon release assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:3-20.
8. Wallace RJ, Brown BA, Griffith DE. Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria. *Annual Reviews Microbiology*. 1998;52:453-90.
9. Ringshausen F, Nienhaus A, Schablon A, Schlösser S, Schultze-Werninghaus G, Rohde G. Predictors of persistently positive *Mycobacterium tuberculosis*-specific interferon-gamma responses in the serial testing of health care workers *BMC Infect Dis*. 2010;10:220.
10. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006;10:1192-204.
11. Solovic I, Sester M, Gomez-Reino JJ, Rieder HL, Ehlers S, Milburn HJ, et al. The risk of tuberculosis related to TNF antagonist therapies: A TBNET consensus statement. *Eur Respir J*. 2010;36:1185-206.
12. van Zyl-Smit RN, Pai M, Pehrah K, Meldau R, Kieck J, Juritz J, et al. Within-subject variability and boosting of T-cell Interferon- γ responses after tuberculin skin testing *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:49-58.
13. van Zyl-Smit RN, Zwerling A, Dheda K, Pai M. Within-subject variability of Interferon- γ assay results and boosting effect of tuberculin skin testing: A systematic review. *PLOS One* 2009;4:e8517.
14. Leyten EM, Prins C, Bossink AW, Thijsen S, Ottenhoff TH, van Dissel JT, et al. Effect of tuberculin skin testing on a *Mycobacterium tuberculosis* specific interferon gamma assay. *Eur Respir J*. 2007;29:1212-6.
15. Metcalfe JZ, Cattamanchi A, McCulloch CE, Lew JD, Ha NP, Graviss EA. Test variability of the QuantiFERON-TB Gold In-Tube Assay in clinical practice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:206-11.
16. Whitworth WC, Hamilton LR, Goodwin DJ, Barrera C, West KB, Racster L, et al. Within-subject interlaboratory variability of QuantiFERON-TB gold in-tube tests. *PLoS One*. 2012;7:e43790.
17. Schablon A, Harling M, Diel R, Ringshausen FC, Torres Costa J, Nienhaus A. Serial testing with an interferon- γ release assay in German healthcare workers. *GMS Krankenhaushygiene Interdisziplinär*. 2010;5:1-8.
18. Torres Costa J, Silva R, Ringshausen FC, Nienhaus A. Screening for tuberculosis and prediction of disease in Portuguese healthcare workers. *Int Arch Occup Environ Health*. 2011;6:19.
19. Fong KS, Tomford JW, Teixeira L, Fraser TG, van Duin D, Yen-Lieberman B, et al. Challenges of interferon- γ release assay conversions in serial testing of health-care workers in a TB control program. *Chest*. 2012;142:55-62.
20. Dorman SE, Belknap R, Graviss EA, Reves R, Schluger N, Weinfurter P, et al. Interferon- γ release assays and tuberculin skin testing for diagnosis of latent tuberculosis infection in healthcare workers in the United States. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:77-87.
21. Pai M, O'Brien R. Serial testing of tuberculosis: can we make sense of T-cell assay conversions and reversions? *Plos One*. 2007;4:e208.
22. Pai M, Joshi R, Dogra S, Mendiratta DK, Narang P, Kalantri S, et al. Serial Testing of Health Care Workers for Tuberculosis Using Interferon- γ Assay". *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:349-55.
23. Torres Costa J, Silva R, Sá R, Cardoso MJ, Ribeiro C, Nienhaus A. 2010 Comparison of interferon- γ release assay and tuberculin test for screening in healthcare workers. *Rev Port Pneumol*. 2010;16:211-21.
24. Andersen P, Doherty PM, Pai M, Weldingh K. The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *Trends Mol Med*. 2007;13:175-82.
25. Diel R, Lodenkemper R, Meywald-Walter K, Niemann S, Nienhaus A. Predictive value of a whole blood IFN- γ assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 15;177:1164-70.
26. Slater M, Welland G, Pai M, Parsonnet J, Banaei N. Challenges with QuantiFERON-TB Gold assay for large-scale, routine screening of U.S. healthcare workers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:1005-10.
27. Mancuso JD, Bernardo J, Mazurek GH. The elusive "gold" standard for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:122-4.
28. Daley Reves RR, Reves RR, Beard MA, Boyle J, Clark RB, Beebe JL, et al. A summary of meeting proceedings on addressing variability around the cut point in serial interferon- γ release assay testing. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2013;34:625-30.
29. Commissie voor Praktische Tuberculosebestrijding / KNCV Tuberculosefond. Tuberculosescreeningsbeleid Ziekenhuismedewerkers. Den Haag: KNCV;2013.
30. Mulder B. Kwantitatieve IGRA-uitslagen in de diagnostiek van latente tuberculose. *Labinf@ct*; 2010.

Tuberculosebestrijding in Afrika; vernieuwingen en obstakels

E. Bowles

Trefwoorden

Tuberculose, Afrika, lage-inkomenslanden, hiv/tbc-co-infectie

Inleiding

Eén van de milleniumontwikkelingsdoelen van de Verenigde Naties is om in 2015 de prevalentie van en de mortaliteit aan tuberculose (tbc) te halveren ten opzichte van 1990. Wereldwijd lijkt het erop dat dit doel gehaald zal worden, maar Afrika blijft achter in het realiseren van deze doelstelling.

De hiv/tbc-co-epidemie: een aantal kille cijfers

Hiv jaagt de tbc-epidemie aan: mensen met hiv hebben een 21 tot 34 maal grotere kans op het ontwikkelen van actieve tbc dan mensen zonder hiv, toenemend met de daling van het CD4-getal.¹

Volgens schattingen van de WHO waren er in 2011 8,7 miljoen nieuwe tbc-patiënten in de wereld, waarvan 13 procent ook met hiv geïnfecteerd was. Er stierven dat jaar 1,4 miljoen mensen aan tbc. Hiervan waren 430.000 hiv-positief. Ongeveer een kwart van de hiv-sterfte is gerelateerd aan tbc en ongeveer 30 procent van alle tbc-sterfte komt voor onder hiv-geïnfecteerden.²

Tachtig procent van alle patiënten met een hiv/tbc-co-infectie leeft in Afrika, terwijl daar maar 11 procent van de hele wereldbevolking leeft. Het continent herbergt 29 procent van alle tbc-patiënten en 34 procent van alle tbc-gerelateerde sterfte.³

Bestrijding

De bestrijding van tbc in Afrika wordt gehinderd door zwakke gezondheidszorgsystemen, een gebrek aan laboratoriumcapaciteit en logistieke problemen met de beschikbaarheid van medicijnen. De openbare gezondheidszorg en de infectiepreventie binnen ziekenhuizen en klinieken falen, met als gevolg nosocomiale transmissie van (resistente) tbc, met name onder patiënten met hiv.³

In de jaren 90 van de vorige eeuw was een hiv-infectie in de derde wereld een uitzichtloos doodvonnis, omringd door stigma en taboe. In het begin van de 21^e eeuw

kwamen antiretrovirale middelen tegen gereduceerde prijzen beschikbaar in Afrika en werden grootschalige hiv-programma's opgezet. Er was weer hoop voor hiv-geïnfecteerden en de aanwas van het tot dan toe gestaag groeiende leger aidswezen nam af.

Antiretrovirale behandeling reduceert de incidentie van tbc met gemiddeld tweederde; de mate van reductie neemt toe met stijging van het CD4-getal.¹

De meeste hiv-programma's waren zogeheten 'verticale programma's', gefinancierd door internationale organisaties en niet geïntegreerd in de al bestaande tbc-programma's. Hierdoor is het niet ongebruikelijk dat een Afrikaan met een hiv/tbc-co-infectie voor zijn hiv-behandeling naar de ene en voor de tbc-behandeling naar de andere kliniek moet. Dit leidt ertoe dat bij tbc-patiënten die hiv-positief zijn, vaak laat wordt gestart met antiretrovirale therapie (ART), en dat hiv-geïnfecteerden vaak onvoldoende worden gescreend op tbc. De WHO heeft dit fenomeen inmiddels aangepakt in de 'policy on collaborative tbc/hiv activities'.⁴ Doel hiervan is om de hiv- en tbc-zorg beter op elkaar af te stemmen. De WHO stelt in dit document dat de hiv-zorgverlener ook verantwoordelijk is voor de zorg voor hiv-gerelateerde tbc. Implementatie van 'de drie I's en vroege start van antiretrovirale therapie' beoogt dit doel te bereiken. Het programma bestaat uit de volgende onderdelen:

1. Intensieve 'case-finding' en kwalitatief goede anti-tbc-behandeling

Bij ieder contact moet de zorgverlener de patiënt screenen op vier symptomen: hoest, koorts, gewichtsverlies en nachtzweeten. Iedereen die een van deze symptomen heeft, dient nader onderzocht te worden op tbc en zo nodig behandeld te worden. Bij afwezigheid van deze symptomen, is actieve tbc onwaarschijnlijk.

Correspondentieadres: E. Bowles, Gelre Ziekenhuizen, Apeldoorn/
Zutphen, e-mail: e.bowles@gelre.nl.

2. Isoniazide-profylaxe

Mensen met hiv die géén actieve tbc hebben, krijgen isoniazide-profylaxe voor minstens zes maanden, om progressie van latente naar actieve tbc te voorkomen.

3. Infectiepreventie

In alle zorginstellingen, maar ook in gevangenissen, instellingen voor verslavingszorg etc. moeten infectiepreventie-maatregelen geïmplementeerd worden.

4. Vroege start van ART

Dit is een heel belangrijk onderdeel, zowel voor preventie van actieve tbc als voor het verminderen van mortaliteit van hiv-positieve tbc-patiënten. De WHO adviseert de start van ART bij *iedere* hiv-positieve patiënt met actieve tbc, ongeacht zijn CD4-getal.

Diagnostiek

De diagnostische methoden die tot voor kort door de WHO werden aanbevolen, bestaan uit microscopisch sputum-onderzoek, thoraxfoto, kweek in vloeibaar medium en antibiotica-gevoeligheidstest.

Hierbij moet worden opgemerkt dat in de Afrikaanse setting de tbc-kweek maar zelden wordt gedaan omdat de laboratoriumcapaciteit en het gespecialiseerde personeel maar op een handvol plaatsen op het continent beschikbaar is.

Diagnostiek bij patiënten met een hiv/tbc-co-infectie is lastig omdat zij vaker extrapulmonale tbc hebben en hun sputummicroscopie en kweek vaker negatief zijn dan bij tbc-patiënten zonder hiv. Tevens laat röntgenonderzoek van de longen vaker atypische of slechts geringe afwijkingen zien.

Sinds 2010 wordt de GeneXpert MTB/RIF® (Cepheid, Sunnyvale, CA) door de WHO aanbevolen als eerstelijns diagnostisch middel bij mensen die verdacht worden van hiv-gerelateerde of meervoudig resistente tbc (MDR-TB). Dit is een betrouwbare moleculaire test, die dicht bij de patiënt uitgevoerd kan worden door laaggeschoold laboratoriumpersoneel, zonder dat daarvoor uitgebreide laboratoriumfaciliteiten nodig zijn.

De Xpert MTB/RIF is een real-time PCR, die *M. tuberculosis*-complex en rifampicine-resistentie aantoonst. Het is een gesloten automatisch, semikwantitatief systeem dat, na een korte voorbereiding van het sputummonster met bijgeleverde reagentia en het pipetteren hiervan in de cartridge, de amplificatie en de detectie van de doelsequentie (de 81 basenpaar-tellende 'hotspot' regio van het *rpoB*-gen) integreert. Alle reacties vinden plaats in één wegwerpcartridge die gedurende het gehele proces gesloten blijft. Dit minimaliseert het risico op ampliconcontaminatie.⁵ Het apparaat is compact en is alleen afhankelijk van een continue stroomvoorziening. De sensitiviteit van de test is met 89 procent aanzienlijk hoger dan die van microscopie, die varieert tussen de 34 en 80 procent.^{6,7} De test duurt minder dan twee uur,

Tanzania

In Tanzania was de hiv-zorg centraal georganiseerd; patiënten moesten naar speciale centra in grotere steden om hun hiv-therapie te krijgen. De tuberculosezorg is echter van oudsher decentraal georganiseerd, dichtbij de patiënt. Dit had tot gevolg dat het percentage hiv-positieve tbc-patiënten dat met antiretrovirale therapie startte, achterbleef. Er werd veel op hiv getest, maar de hiv-behandeling werd vaak niet gestart.

Een pilotproject om de hiv-behandeling in de tbc-kliniek te starten, in plaats van andersom, bleek zeer succesvol; in 80 procent van de gevallen werd gestart met ART. In navolging hiervan heeft Tanzania nu zijn 'TB-officers'. Zij zijn getraind in hiv-behandeling en geïntegreerde hiv/tbc-zorg en werkzaam in 70 tbc-klinieken in het hele land.¹¹

dus bij een positieve uitslag kan de patiënt dezelfde dag nog starten met de behandeling. Een revolutie in tuberculosedagnostiek!

In een aantal klinieken in zuidelijk Afrika is de Xpert kort na deze aanbeveling van de WHO in de diagnostische algoritmes geïncorporeerd. De resultaten van deze strategie zijn onlangs gepubliceerd.^{8,9} In een kliniek in Johannesburg werden in drie maanden tijd 641 van tbc verdachte patiënten geïncorporeerd, het grootste deel (69 procent) was hiv-positief.

Patiënten met een positieve Xpert-uitslag startten op dezelfde dag met de behandeling. Patiënten bij wie de diagnose tbc werd gesteld op basis van kliniek of radiologie, startten gemiddeld na 14 dagen en als de diagnose werd gesteld door middel van een positieve kweek duurde het 144 dagen voordat de therapie werd gestart. Hoewel een positieve Xpert-uitslag wel resulteerde in een razendsnelle start van de tbc-behandeling, had de test in deze studie toch geen impact op de eindpunten van de tbc-behandeling of op de mortaliteit.⁸

Vergelijkbare resultaten werden gevonden in een andere studie, die in vijf klinieken in zuidelijk Afrika in totaal ruim 1500 van tbc verdachte patiënten randomiseerden tussen ofwel diagnostiek door middel van de Xpert MTB/Rif ofwel sputummicroscopie.⁹ Daarnaast werd bij alle patiënten een thoraxfoto gemaakt en sputum gekweekt op tbc. Ook uit deze studie bleek dat de Xpert wel zorgde voor sneller starten met behandeling, maar niet voor een lagere morbiditeit op lange termijn. Dit kwam deels doordat veel Xpert- en microscopie-negatieve patiënten toch empirisch startten met tbc-behandeling.

De Xpert lijkt dus geen wondermiddel, maar een heel nuttige test indien hij gebruikt wordt als onderdeel van een rationeel diagnostisch algoritme en beoordeeld wordt in de context van sputummicroscopie, thoraxfoto's en het klinische beeld.

De realiteit is helaas dat al deze diagnostische mogelijkheden op het Afrikaanse continent nog maar mondjesmaat beschikbaar zijn. In het jaar 2011 stond bijvoorbeeld in Tanzania, een land met 44 miljoen inwoners, op slechts zes plaatsen een Xpert, vijf laboratoria konden een tbc-kweek doen en slechts in 3 procent van de laboratoria werd LED-microscopie gedaan. In Mozambique (24 miljoen inwoners) waren in 2011 twee laboratoria die over kweekfaciliteiten beschikten, gebruikte minder dan 1 procent van de laboratoria een LED-microscopie en telde het hele land één Xpert-machine. Momenteel wordt de test grootscheeps verder beschikbaar gemaakt onder andere via het *WHO Global TB Programme* en de *Stop TB Partnership*. Dat is goed nieuws.

Feit blijft dat de kostprijs van het gebruik van de GeneXpert vele malen hoger is dan microscopisch sputumonderzoek, waardoor het maar de vraag is of de kosten van deze test uiteindelijk door de Afrikaanse tbc-programma's gedragen kunnen worden.¹⁰

In de praktijk berust de diagnostiek van tbc in het grootste deel van het continent met de hoogste ziektelast voornamelijk op lichtmicroscopie gecombineerd met de klinische inschatting van de dokter, clinical assistant of de public health nurse. Net als 50 jaar geleden.

Referenties

1. Lawn SD, Wood R, De Cock KM, Kranzer K, Lewis JJ, Churchyard GJ. Antiretrovirals and isoniazid preventive therapy in the prevention of HIV-associated tuberculosis in settings with limited health-care resources. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:489-98.
2. WHO – Global Tuberculosis Report 2012.
3. Ghandi NR, Moll A, Sturm AW, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet.* 2006;368:1575-80.
4. WHO policy on collaborative TB/HIV activities: Guidelines for national programmes and other stakeholders 2012. http://www.who.int/tb/publications/2012/tb_hiv_policy_9789241503006/en/ (geraadpleegd 15-9-2013).
5. Bowles EC, C. Erkens, D. van Soelingen. Tuberculose in Nederland en de wereld: goede, snelle diagnostiek is onmisbaar om verspreiding te stoppen. *Ned Tijdschr Med Microbiol.* 2011;19:23-7.
6. Steingart KR, Sohn H, Schiller I, et al. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jan 21;1:CD009593.
7. Davies PDO, Pai M. The diagnosis and misdiagnosis of tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2008;11:1226-34.
8. Hanrahan CR, Selibas K, Deery CB, et al. Time to Treatment and Patient Outcomes among TB Suspects Screened by a Single Point-of-Care Xpert MTB/RIF at a Primary Care Clinic in Johannesburg, South Africa. *PLoS ONE* 8(6): e65421. doi:10.1371/journal.pone.0065421.
9. Theron G, Zijenah L, Chanda D, et al. Feasibility, accuracy, and clinical effect of point-of-care Xpert MTB/RIF testing for tuberculosis in primary-care settings in Africa: a multicentre, randomised, controlled trial. *Lancet.* 2014;383:424-35.
10. Vassall A, Kampen S van, Sohn H, et al. Rapid Diagnosis of Tuberculosis with the Xpert MTB/RIF Assay in High Burden Countries: A Cost-Effectiveness Analysis. *PLoS Medicine* 2011;8(11): e1001120. doi:10.1371/journal.pmed.1001120.
11. Report of the Regional TB/HIV Implementation Workshop, Maputo 2013. pdf, http://www.who.int/tb/challenges/hiv/implementation_workshop_report.pdf (geraadpleegd 15-9-2013).

Epidemiologische typering van *Mycobacterium tuberculosis* – van faagtypering tot Whole Genome Sequencing in twee decennia

D. van Soolingen, G. de Vries, R. van Hunen, M. Kamst, J. de Beer

Samenvatting

Tot in de jaren 90 werden in Nederland, in het kader van epidemiologisch onderzoek, faagtyperingen van *Mycobacterium tuberculosis*-isolaten uitgevoerd. Het onderscheidend vermogen van deze benadering was echter zeer beperkt. In het begin van de jaren 90 werden repeterende DNA-sequenties in *M. tuberculosis* ontdekt, zoals het insertie-element IS6110 en de Direct Repeats, die geassocieerd bleken te zijn met verschillende niveaus van DNA-polymorfisme in het genoom van *M. tuberculosis*. Hierdoor werd het mogelijk DNA-fingerprintmethoden te ontwikkelen, zoals de restrictiefragmentlengte-polymorfisme (RFLP)- en de spoligotypering. Deze typeringen werden wereldwijd toegepast en zijn de basis geworden van de moleculaire epidemiologie van tuberculose. In 2006 werd een nieuwe typeringsmethode geïntroduceerd als de nieuwe internationale gouden standaard: de variable number of tandem repeats (VNTR)-typering. In 2009 is de VNTR-methode ingevoerd in Nederland voor het typeren van alle *M. tuberculosis*-isolaten. In 2010 zijn de eerste studies gepubliceerd over het gebruik van Whole Genome Sequencing als typeringsmethode, waarmee in uniforme RFLP/VNTR-clusters van patiënten de transmissieketens konden worden onderscheiden. Dit artikel beschrijft de ontwikkelingen in typering van *M. tuberculosis* in de laatste twee decennia en de toepassing van deze technieken in de epidemiologie van tuberculose.

Trefwoorden

Epidemiologische typering, VNTR-typering, Whole Genome Sequencing

Inleiding

In de laatste twee decennia zijn de ontwikkelingen in de typering van *Mycobacterium tuberculosis* revolutionair geweest. Tot aan de jaren 90 waren er voor het vaststellen van epidemiologische verbanden slechts twee laboratoriumtechnische benaderingen mogelijk; door middel van resistentieprofielen¹ en faagtypering²

werd transmissie van *M. tuberculosis* onderzocht. Vanzelfsprekend was het erg onnauwkeurig om een resistentieprofiel van een bacterie als kenmerk te gebruiken, omdat resistentiepatronen veelal identiek zijn en snel kunnen veranderen. De typering met fagen kende echter ook zijn beperkingen. Allereerst diende er voldoende bacteriën te worden gekweekt in een vloeibaar medium, waarna deze als een suspensie op een agarplaat werden gebracht. Na 24 uur werd er een panel van bacterio-fagen op de bacteriële laag gespot en werd aan de hand van het lysispatroon een faagtype vastgesteld. Hierbij werden vier hoofdtypen en slechts een paar subtypen onderscheiden, hetgeen resulteerde in een beperkt discriminerend vermogen.

Na de ontdekking van repeterende DNA-sequenties in het genoom van *M. tuberculosis* in het begin van de jaren 90 en het hoge niveau van polymorfisme onder *M. tuberculosis*-isolaten dat daarmee zichtbaar gemaakt kon worden, was de basis gelegd voor de moleculaire epidemiologie van tuberculose. Eén van de eerste publicaties over de bruikbaarheid van restrictiefragmentlengtepolymorfisme (RFLP)-typering op basis van het insertie-element IS6110 om transmissie van tuberculose te onderzoeken in Nederland verscheen in 1991.³ Door de hoge mate van standaardisatie van deze techniek werd deze internationaal toegepast voor de epidemiologische typering van *M. tuber-*

M. Kamst, J. de Beer, Tuberculose referentielaboratorium, Centrum voor Infectieziektendiagnostiek en screening (IDS), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM); R. van Hunen, Tuberculose referentielaboratorium, Centrum voor Infectieziektendiagnostiek en screening (IDS), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), KNCV Tuberculosefonds, Den Haag; G. de Vries, KNCV Tuberculosefonds, Den Haag, Centrum voor Infectieziektebestrijding (CIb), RIVM, Bilthoven. Correspondentieadres: D. van Soolingen, Tuberculose referentielaboratorium, Centrum voor Infectieziektendiagnostiek en screening (IDS), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen, e-mail: dick.van.soolingen@rivm.nl.

culosis.⁴ Deze trend heeft zich voortgezet en tot op de dag van vandaag is de typering van *M. tuberculosis* een van de best gestandaardiseerde technieken vergeleken met typeringen van alle andere micro-organismen.

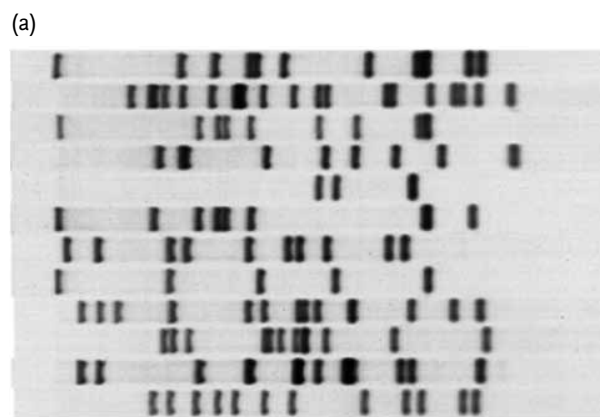
In de jaren die volgden bleek de RFLP-typering niet alleen zeer bruikbaar te zijn om allerlei klassieke vragen op te lossen over de epidemiologie van tuberculose,^{5,6} maar werd deze techniek vanaf 1993 ook gebruikt om alle *M. tuberculosis*-isolaten in Nederland routinematig te typeren. Deze typeringen werden vanaf die tijd gebruikt om bronopsporing en contactonderzoek te ondersteunen, in nauwe samenwerking met het KNCV Tuberculosefonds en de GGD'en.

Invoering VNTR-typering

Er is veel geleerd van de toepassing van RFLP-typering, maar deze techniek kende ook nadelen. Voor de uitvoering was een grote hoeveelheid DNA nodig, waardoor de bacteriële kweken langdurig dienden te worden geïncubeerd. Verder was de technische uitvoering van RFLP-typering complex en was het vergelijken van RFLP-bandenpatronen (figuur 1) zeer gecompliceerd. In 2006 werd de variable number of tandem repeats (VNTR)-typeringsmethode in internationaal verband gestandaardiseerd en werd besloten deze techniek ook in Nederland in te voeren.⁷ De VNTR-methode is gebaseerd op een multiplex-PCR gevolgd door de detectie van het aantal herhalingen in 24 loci in het genoom van *M. tuberculosis*. Hierdoor is deze techniek niet alleen veel sneller dan RFLP-typering, maar worden de resultaten weergegeven als een 24-cijferige code (figuur 1), hetgeen de vergelijking sterk vereenvoudigt. Rekening houdend met de planning van de laboratoriumwerkzaamheden kan in de praktijk na ontvangst van een kweek bij het RIVM na 11 dagen een VNTR-typering worden afgegeven.

Om de invoering van VNTR-typering in 2009 mogelijk te maken is de volledige collectie van Nederlandse *M. tuberculosis*-isolaten van 2004-2008, die al routinematig waren getypeerd met RFLP, opnieuw getypeerd met VNTR. Hierdoor werd opnieuw een 'geheugen' aangelegd van circulerende stammen in Nederland die bronnen van transmissie zouden kunnen worden. Tevens gaf dit de mogelijkheid om de RFLP- en VNTR-resultaten goed met elkaar te vergelijken.⁸ Uit de analyse bleek dat het discriminerende vermogen van beide technieken nagenoeg gelijk was. Bovendien kwam bij 78,5 procent van de bijna 4000 isolaten de indeling in clusters overeen. Bij de discrepanties bleek de clustering op grond van VNTR beter overeen te komen met de bevindingen van GGD'en in het onderzoek naar epidemiologische verbanden tussen tuberculosepatiënten, dan die op grond van RFLP-typering.^{8,9} In een project van het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) dat door het RIVM werd gecoördineerd, is een paar jaren geleden voor het eerst een

Figuur 1. Weergave van de resultaten van moleculaire typering van *M. tuberculosis*-kweken met (a) RFLP-typering en (b) VNTR-typering.



(b)

523835226251284261223343
253334444432658253213423
263645424234247253215423
251335444452658253213423
263635424234248253213424

wereldwijde kwaliteitscontrole van de standaard 24-loci VNTR-typering georganiseerd. De resultaten waren in eerste instantie teleurstellend te noemen wat betreft intra- en inter-laboratoriumreproduceerbaarheid.¹⁰ Na het invoeren van talrijke verbeteringen in de techniek bij individuele laboratoria en het doorvoeren van een hoger niveau van standaardisatie waren de resultaten in de tweede ronde aanzienlijk beter.¹¹

Definitie van VNTR-clusters

Alle cellen, waaronder bacteriën, maken een evolutionaire ontwikkeling door. Hierdoor treden er steeds kleine veranderingen op in het genoom. De vraag is dan ook hoe stabiel DNA-fingerprints zijn. In de vroege fase van de invoering van RFLP-typering is hier veel onderzoek naar gedaan door stammen te typeren die gedurende een half jaar waren doorgekweekt in het laboratorium.¹² Ook werden cavia's met stammen geïnfecteerd, waarna de IS6110 RFLP-patronen van de oorspronkelijke en de uit de cavia geïsoleerde stammen werden vergeleken.⁵ Later zijn meervoudige kweken van patiënten onderzocht op de stabiliteit van de RFLP-patronen¹³ en werd de halfwaardetijd van IS6110 RFLP-patronen bepaald op drie tot vier jaar.

Ook in VNTR-patronen worden soms dubbele allelen zichtbaar die kunnen duiden op gemengde infecties of evolutionaire drift. De vraag dient zich dan ook aan de definitie van clustering van isolaten van patiënten

gebaseerd zou moeten zijn op identieke 24-loci VNTR-patronen, of dat kleine afwijkingen getolereerd zouden moeten worden. Om deze vraag te onderzoeken is recent een onderzoek uitgevoerd naar de populatiestructuur van *M. tuberculosis* in Nederland.¹⁴ Hierbij is gebleken dat veel stammen zo sterk op elkaar lijken op grond van de VNTR-patronen, dat ze in klonale complexen vallen. Als de definitie van clustering op grond van VNTR-typering opgerekt zou worden naar stammen die bijna identieke patronen hebben, zou het percentage clusterende isolaten sterk omhoog gaan. Dit zou de bruikbaarheid van de DNA-fingerprinting in Nederland niet vergroten en daarmee de werkelijke transmissieketens niet zichtbaar maken. Hierom is besloten om bij de definitie van clustering uit te blijven gaan van identieke 24-loci VNTR-patronen.

Bevindingen in de moleculaire epidemiologie van tuberculose

In de laatste twee decennia heeft de moleculaire typering van *M. tuberculosis*-complexisolaten in belangrijke mate bijgedragen aan het oplossen van, soms klassieke, vraagstukken in de epidemiologie van tuberculose.⁶ Er is nu bijvoorbeeld bekend hoeveel recente transmissie er plaatsvindt in Westerse landen en wat de risicofactoren zijn voor transmissie, zoals stedelijke omgeving, mannelijk geslacht, lage leeftijd, dakloos zijn, drugs en alcoholverslaving enz. In de laatste jaren is ook meer bekend geworden over het voorkomen van dubbele infecties van *M. tuberculosis*, vooral in hoogprevalente gebieden.¹⁵ Na curatieve behandeling wordt in bepaalde gebieden frequent recidiverende tbc gevonden. Met DNA-fingerprinting is aannemelijk gemaakt dat een aanzienlijk deel van deze recidieven te wijten is aan re-infecties met andere tuberculosestammen.^{16,17} Deze bevinding heeft belangrijke consequenties voor de tuberculosebestrijding, maar ook voor het denken over mogelijkheden om adequaat te vaccineren. In de loop van de jaren zijn veel institutionele uitbraken van tuberculose beschreven. Vooral nosocomiale transmissie blijkt een rol van betekenis te spelen in hoogprevalente gebieden, maar deze wordt incidenteel ook in Nederland aangetoond.¹⁸ In Nederland wordt DNA-fingerprinting ook structureel ingezet om mogelijke laboratoriumkruiscontaminaties te traceren. Kweken afkomstig van één laboratorium met een afnamedatum die niet meer dan een week verschilt en met identieke DNA-fingerprints, zijn mogelijk afkomstig van een laboratoriumkruiscontaminatie. In Nederland zijn in de laatste drie jaren gemiddeld zeven van de kweken per jaar herleid naar kruiscontaminaties.

Gebruik van VNTR-typering bij GGD'en

Vanaf 1993 worden GGD'en in Nederland structureel voorzien van de DNA-fingerprints van *M. tuberculosis*-

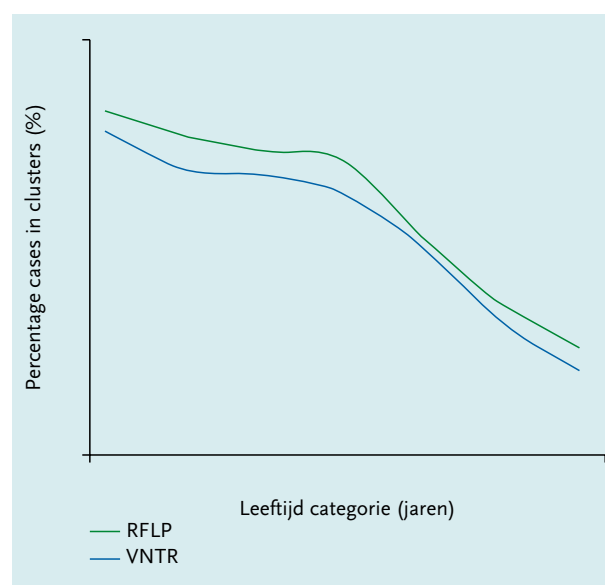
kweken. Aanvankelijk leek na de overstap naar VNTR-typering het percentage geclusterde stammen te verminderen, maar in 2012, na negen jaar VNTR-typering (inclusief de hertyperingsperiode 2004-2008), valt ongeveer de helft van de stammen in een nationaal cluster,¹⁹ en komt dit overeen met de mate van clustering tijdens de periode van RFLP-typering.

Deze clustering is het hoogst bij patiënten in de laagste leeftijdscategorie en daalt lineair met het toenemen van de leeftijd (figuur 2). Op lage leeftijd heeft de infectie dan ook per definitie recent plaatsgevonden en is de bron meestal ook traceerbaar. Op hogere leeftijd neemt de kans op een endogene reactivatie van vroegere infecties toe en zijn de patronen van de geïsoleerde tuberculosestammen vaak uniek.

DNA-fingerprinting is in de afgelopen decennia succesvol toegepast in de publieke gezondheidszorg om uitbraken vast te stellen²⁰ en te monitoren,²¹ plaatsen van verhoogde tuberculosetransmissie, zoals in cafés,²² op te sporen en het risico voor gezondheidswerkers in Nederland te beschrijven.²³

Clustering betekent echter niet altijd transmissie, en zeker niet altijd recente transmissie. Een epidemiologische link wordt vaak niet aangetoond tussen cases in een groter cluster. Ten eerste kan transmissie ongemerkt plaatsvinden, zonder dat de bronpatiënt en de persoon die later tuberculose ontwikkelt, elkaar kennen. Een clusterende bacterie kan daarnaast veel voorkomen in het land van herkomst van een tuberculosepatiënt. Dit is vooral aannemelijk gemaakt als een immigrant bij binnenkomst in Nederland al tuberculose heeft met een clusterende bacterie. De bacterie kan ook zo goed zijn geconserveerd

Figuur 2. Percentage geclusterde gevallen volgens RFLP en VNTR-typering per leeftijdscategorie



dat deze gevonden wordt bij oudere Nederlandse tuberculosepatiënten die tientallen jaren eerder zijn geïnfecteerd met een toen veel voorkomende bacterie. Ten slotte, de sensitiviteit van de VNTR-typering is niet 100 procent, omdat slechts een deel van het genoom wordt onderzocht. DNA-fingerprinting is in het veld van tuberculosebestrijding dan ook vooral nuttig om recente transmissiepatronen te herkennen. Dat kan met behulp van een classificatiemodel van recente transmissie.²⁴ In 2011 had circa een derde van de kweekbevestigde tuberculosepatiënten in Nederland de ziekte ten gevolge van recente transmissie. De WHO heeft als doel gesteld tuberculose in 2050 te elimineren (minder dan één geval per miljoen). Dat zal ook in Nederland niet worden gehaald. De huidige mobiliteit in de wereld, de lange therapieën met veel bijwerkingen en het gebrek aan een goed tbc-vaccin staan het behalen van de WHO-doelstelling in de weg. In Nederland zal de focus liggen op het elimineren van transmissie. DNA-fingerprinting is een uitstekend gereedschap om dat te monitoren en gerichte interventies uit te voeren in de tuberculosebestrijding.

Indeling van *M. tuberculosis*-isolaten in genotypefamilies

Al snel na de invoering van de RFLP-typering werd duidelijk dat de patronen per geografische regio sterk verschillen. Dit onderzoek werd bevorderd door de ontwikkeling van spoligotypering (spacer oligotyping), een zeer robuuste, op PCR gebaseerde moleculaire typeringsmethode met een beperkt discriminerend vermogen wat betreft het vaststellen van transmissie, maar geschikt om de fylogenie van het *M. tuberculosis*-complex te onderzoeken.^{25,26} De SITVIT WEB-database bevat een grote collectie van spoligo- en VNTR-typeringsresultaten die wereldwijd zijn verkregen en inzicht geven in de verspreiding van genotypefamilies.²⁷

De oudste divergent van het *M. tuberculosis*-complex blijkt *M. canettii* te zijn, die veel voorkomt in de Hoorn van Afrika en ooit in Nederland is ontdekt.²⁸⁻³⁰ Hoewel spoligotypering sterk heeft bijgedragen aan de ontdekking van de genotypefamilies van *M. tuberculosis*, zijn andere fylogenetische markers betrouwbaarder gebleken, zoals grote genomische deleties²⁹ en mutaties.³¹

In 1995 werd de eerste studie gepubliceerd over de voornaamste genotypefamilie van *M. tuberculosis* in Zuidoost-Azië; de Beijing-lineage.³² De stammen die daar werden aangetroffen bleken genetisch sterk geconserveerd en in veel delen van de wereld geassocieerd met resistentie.³³ Ook in Europa heeft moleculaire surveillance door middel van VNTR-typering aangetoond dat multi-drugresistente (MDR-) stammen sterk geassocieerd zijn met het Beijing-genotype.^{34,35} Daarbij is ook aangetoond dat 45 procent van de MDR-TB-gevallen in Europa het gevolg zijn van transmissie en niet van verworven resistentie.³⁶

Om het dominante karakter van het Beijing-genotype te verklaren is in de laatste jaren veel onderzoek verricht vanuit verschillende invalshoeken. Zo is recent vastgesteld dat een deel van de Beijing-genotype stammen een hogere mutatiefrequentie heeft en een verminderde gevoeligheid voor rifampicine;^{37,38} dit zou de associatie kunnen verklaren met MDR-tuberculose. Tevens lijken deze stammen een afwijkende methylering te hebben ontwikkeld, hetgeen van invloed is op de expressie van genen.^{39,40} Ook zijn er aanwijzingen dat de zich verspreidende Beijing-stammen een andere immuunrespons induceren bij patiënten dan de vroegere varianten⁴¹ en dat de moderne varianten in staat zijn om aan de BCG-geïnduceerde immuniteit te ontsnappen.⁴²

Gebruik van Whole Genome Sequencing in de epidemiologie van tuberculose

DNA-fingerprinting was tot enkele jaren geleden gebaseerd op de detectie van polymorfisme geassocieerd met repeterende DNA-structuren zoals het insertie-element IS6110, VNTRs en Direct Repeats. Wanneer echter dergelijke typeringen langere tijd worden gebruikt in een bepaald land, groeien de clusters en worden de epidemiologische verbanden tussen patiënten in de clusters steeds minder duidelijk. In feite zou het ideaal zijn als de DNA-fingerprints van stammen bij transmissie herkenbaar zouden blijven, maar dat er tevens een kleine verandering plaatsvindt in het DNA-patroon, waardoor de transmissiepatronen herkenbaar blijven in de tijd. Om de resolutie van DNA-fingerprinting te verhogen is daarom enkele jaren geleden begonnen met Whole Genome Sequencing (WGS). Diverse studies hebben aangetoond dat een klein aantal mutaties te vinden is in isolaten met identieke RFLP- en VNTR-patronen, die kunnen worden gebruikt om transmissieketens in clusters van elkaar te onderscheiden. In het Harlingen-cluster, dat meer dan honderd isolaten bevatte, werd met succes een aantal mutaties opgespoord waarmee de transmissie vanuit individuele gevallen kon worden vastgesteld.⁴³ Dit riep de vraag op hoe vaak deze mutaties optreden in het genoom van *M. tuberculosis*. Daarom werden ongeveer 100 paren stammen met identieke RFLP- of VNTR-patronen en al dan niet een epidemiologisch bevestigde link, onderworpen aan WGS. Hierbij bleken de mutaties zeer onregelmatig op te treden in de tijd en verschilde de mutatiefrequentie per cluster.⁴⁴ Er werd een gemiddelde mutatiefrequentie berekend van 0,36 mutaties per genoom per jaar. Dit is in overeenstemming met een soortgelijke studie in Engeland, waarbij een frequentie van 0,5 mutaties per genoom per jaar werd gevonden.⁴⁵ We zullen er dus rekening mee moeten houden dat het genoom van *M. tuberculosis* zeer stabiel is en er stammen circuleren in Nederland die zelfs met WGS niet van elkaar zijn te onderscheiden, terwijl er geen epidemiologische link vastgesteld kan worden

tussen de respectievelijke patiënten. Toch biedt WGS de hoogste resolutie en zodra ook het polymorfisme dat geassocieerd is met repeterende DNA-sequenties in deze methode zichtbaar gemaakt kan worden, lijkt dit de typeermethode te worden die de werkelijke transmissie zo goed mogelijk in kaart brengt. Met deze techniek kunnen dan identificaties op (sub-)speciesniveau worden uitgevoerd, de fylogenetische positie van de stammen worden bepaald, evenals indicatieve moleculaire resistentiebepalingen en typeringen worden uitgevoerd op stamniveau. Om dit mogelijk te maken dient het analyseproces van WGS-data sterk te worden vereenvoudigd en dient de techniek verder te worden geoptimaliseerd tot een toepasbaarheid op kleinere aantallen bacteriën, bij voorkeur direct in klinisch materiaal.

Abstract

Until the 1990s, phage typing of *Mycobacterium tuberculosis* was conducted in the Netherlands to support epidemiological research. The level of resolution, however, was very limited. In the early 1990s, repetitive DNA sequences were disclosed in *M. tuberculosis*, like insertion sequence IS6110 and the Direct Repeats, which appeared associated with different levels of DNA polymorphism in the genome of *M. tuberculosis*. This discovery enabled the development of DNA fingerprint methods such as restriction fragment length polymorphism (RFLP)- and spoligotyping. These typing methods were applied worldwide and became the basis of the molecular epidemiology of tuberculosis. In 2006 a new typing method was introduced as international gold standard; the “variable number of tandem repeat” (VNTR) typing. In 2009 this VNTR method was introduced in the Netherlands for the typing of all *M. tuberculosis* isolates. Thereafter, in 2010, the first studies were published on the use of Whole Genome Sequencing as a typing method by which in uniform RFLP/VNTR clusters of patients, chains of transmission could be distinguished. This article describes the developments in typing of *M. tuberculosis* in the last two decades and the application of these techniques in the epidemiology of tuberculosis.

Referenties

- Gruft H, Johnson R, Claflin R, Loder A. Phage-typing and drug-resistance patterns as tools in mycobacterial epidemiology. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130:96-7.
- Collins DM, De Lisle GW. 1985. DNA restriction endonuclease analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the tuberculosis complex. *J Clin Microbiol.* 1985;21:562-4.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2578-86.
- van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993;31:406-9.
- van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med.* 2001;249:1-26.
- Borgdorff MW, van Soolingen D. The re-emergence of tuberculosis: what have we learnt from molecular epidemiology? *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(10):889-901
- Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4498-510.
- de Beer JL, van Ingen J, de Vries G, Erkens C, Sebek M, Mulder A, et al. Comparative study of IS6110 RFLP and VNTR typing of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands, based on a five year nationwide survey. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1193-8.
- van Deutekom H, Supply P, de Haas PE, Willery E, Hoijing SP, Locht C, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat analysis, a more accurate method for identifying epidemiological links between patients with tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4473-9.
- de Beer JL, Kremer K, Kodmon C, Supply P, van Soolingen D. First worldwide proficiency study on variable-number tandem-repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol.* 2012;50:662-9.
- de Beer JL, Ködmön C, van Ingen J, Supply P, van Soolingen D. Second worldwide proficiency study on variable number of tandem repeats typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2014;5:594-600.
- van Soolingen D, Arbeit RD. Dealing with variation in molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis*: low-intensity bands and other challenges. *J Med Microbiol.* 2001;50:749-51.
- de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PE, Nagelkerke NJ, van Embden JD, van Soolingen D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis.* 1999;180:1238-44.
- Sloot R, Borgdorff MW, de Beer JL, van Ingen J, Supply P, van Soolingen D. Clustering of Tuberculosis Cases Based on Variable-Number Tandem-Repeat Typing in Relation to the Population Structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2013;51:2427-31.
- Huyen MN, Kremer K, Lan NT, Cobelens FG, Buu TN, Dung NH, et al. Mixed tuberculosis infections in rural South Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1586-92.
- Verver S, Warren RM, Beyers N, Richardson M, van der Spuy GD, Borgdorff MW, et al. Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005;171:1430-5.
- Buu TN, Huyen MN, van Soolingen D, Lan NT, Quy HT, Tiemersma EW, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not affect tuberculosis treatment failure in Vietnam. *Clin Infect Dis.* 2010;51:879-86.
- Lambregts-van Weezenbeek CS, Sebek MM, van Gerven PJ, de Vries G, Verver S, Kalisvaart NA, van Soolingen D. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7:S463-470.
- de Vries G, van Hunen R, van Soolingen D. Dynamiek in DNA-fingerprint-clusters in Nederland. *Tegen de Tuberculosis.* 2013.
- de Vries G, van Hest RA. From contact investigation to tuberculosis screening of drug addicts and homeless persons in Rotterdam. *Eur J Public Health.* 2006;16:133-6.
- de Vries G, van Hest RA, Richardus JH. Impact of mobile radiographic screening on tuberculosis among drug users and homeless persons. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:201-7.
- Kiers A, Drost AP, van Soolingen D, Veen J. Use of DNA fingerprinting in international source case finding during a large outbreak of tuberculosis in The Netherlands. *Int J Tuberc Lung Dis.* 1997;1:239-45.
- de Vries G, Sebek MM, Lambregts-van Weezenbeek CS. Healthcare workers with tuberculosis infected during work. *Eur Respir J.* 2006;28:1216-21.

24. de Vries G, Baars HW, Sebek MM, van Hest NA, Richardus JH. Transmission classification model to determine place and time of infection of tuberculosis cases in an urban area. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3924-30.
25. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35:907-14.
26. Sola C, Ferdinand S, Mammina C, Nastasi A, Rastogi N. Genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* in Sicily based on spoligotyping and variable number of tandem DNA repeats and comparison with a spoligotyping database for population-based analysis. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1559-65.
27. Demay C, Liens B, Burguiere T, Hill V, Couvin D, Millet J, et al. SITVITWEB--a publicly available international multimarker database for studying *Mycobacterium tuberculosis* genetic diversity and molecular epidemiology. *Infect Genet Evol.* 2012;12:755-66.
28. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol.* 1997;47:1236-45.
29. Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:3684-9.
30. Supply P, Marceau M, Mangenot S, Roche D, Rouanet C, Khanna V, et al. Genomic analysis of smooth tubercle bacilli provides insights into ancestry and pathoadaptation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Genet.* 2013;45:172-9.
31. Hershberg R, Lipatov M, Small PM, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, et al. High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography. *PLoS Biol.* 2008;6:e311.
32. van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3234-8.
33. Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:103-11.
34. Devaux I, Kremer K, Heersma H, Van Soolingen D. Clusters of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* cases, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1052-60.
35. Devaux I, Manissero D, Fernandez de la Hoz K, Kremer K, van Soolingen D. Surveillance of extensively drug-resistant tuberculosis in Europe, 2003-2007. *Euro Surveill.* 2010;15:11:1-6.
36. De Beer J, Kodmon C, van der Werf M, van Ingen J, van Soolingen D. Molecular surveillance of multi- and extensively drug-resistant tuberculosis transmission in the European Union from 2003 to 2011. *Euro Surveill.* 2014;19.
37. de Steenwinkel JE, van Soolingen D, Bakker-Woudenberg IA. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Type Mutation Frequency. *Emerg Infect Dis.* 2013;19.
38. Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, et al. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet.* 2013;45:784-90.
39. van Soolingen D, de Haas PE, Blumenthal RM, Kremer K, Sluijter M, Pijnenburg JE, et al. Host-mediated modification of PvuII restriction in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 1996;178:78-84.
40. Shell SS, Prestwich EG, Baek SH, Shah RR, Sasseti CM, Dedon PC, et al. DNA methylation impacts gene expression and ensures hypoxic survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog.* 2013;9:e1003419.
41. van Laarhoven A, Mandemakers JJ, Kleinnijenhuis J, Enaimi M, Lachmandas E, Joosten LA, et al. Low induction of proinflammatory cytokines parallels evolutionary success of modern strains within the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. *Infect Immun.* 2013;81:3750-6.
42. Kremer K, van-der-Werf MJ, Au BK, Anh DD, Kam KM, van-Doorn HR, et al. Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:335-9.
43. Schurch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, van Soolingen D. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3403-6.
44. Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, et al. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis.* 2013;13:110.
45. Walker TM, Ip CL, Harrell RH, Evans JT, Kapatai G, Dedicoat MJ, et al. Whole-genome sequencing to delineate *Mycobacterium tuberculosis* outbreaks: a retrospective observational study. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:137-46.

Toekomstvisie op ontwikkelingen in de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose en andere mycobacteriosen

D. van Soolingen, A. van der Zanden, J. van Ingen

Trefwoorden

Tbc-diagnostiek, nontuberculeuze mycobacteriën

Inleiding

De introductie van moleculaire technieken in de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose (tbc) heeft veel invloed gehad op de wijze waarop de benodigde informatie uit het klinische monster kan worden verkregen, wat betreft het identificeren van mycobacteriën, het vaststellen van de indicatieve gevoeligheid voor antimycobacteriële middelen en onderzoek naar de transmissie van tbc. Doordat deze veranderingen in een kort tijdsbestek hebben plaatsgevonden en mycobacteriële infecties relatief zeldzaam zijn, is er nogal wat verwarring ontstaan over wat de plaats van nieuwe moleculaire technieken in het huidige en toekomstige diagnostische algoritme zou kunnen zijn. In dit artikel wordt een visie beschreven van het meest ideale gebruik van de revolutionaire ontwikkelingen in de diagnostiek in een land met een dalende incidentie van tbc, zoals Nederland, waarin ook infecties met nontuberculeuze mycobacteriën (NTM) in toenemende mate een belangrijke rol spelen.

Tbc-diagnostiek

Tot nu toe was de kweek van mycobacteriën uit sputum, gevolgd door identificatie van de isolaten met moleculaire methoden, de gouden standaard in de diagnostiek van mycobacteriosen. Simultaan hieraan werden moleculaire technieken, zoals PCR, toegepast als 'snelle diagnostiek', waar al dan niet consequenties aan werden verbonden. De twijfel rondom de bruikbaarheid van moleculaire technieken werd deels veroorzaakt door een gebrek aan sensitiviteit en het frequent optreden van fout-positieve bepalingen ten gevolge van kruiscontaminaties.¹ De huidige moleculaire technieken zijn echter dermate sterk verbeterd wat betreft deze negatieve aspecten en er is inmiddels zoveel ervaring opgedaan in het gebruik van deze benadering, dat veilig kan worden gesteld dat de moleculaire detectie net zo betrouwbaar is als de kweek en

de gevoeligheid van de PCR die van de kweek bijna altijd evenaart. Bij gebruik van meervoudige technieken in de detectie van mycobacteriën is echter een klein percentage van de onderzochte patiënten wel positief in één van de beide benaderingen, maar niet in de andere (van der Zanden, NVMM-congres 2007, www.nvmm.nl).² Deze lacune kan echter voor het grootste deel opgevuld worden door, zoals door de WHO wordt aanbevolen, minstens twee sputummonsters te onderzoeken en bij een sterk vermoeden op een mycobacteriose soms zelfs meer. Vooral bij het toepassen van de PCR gebeurt dit in de praktijk nog niet bepaald standaard. Vanwege de snelheid waarmee de infectie kan worden vastgesteld met een moleculaire techniek, waarvoor meestal niet meer tijd nodig is dan een aantal uren tot een dag, verdient deze benadering in principe de sterke voorkeur boven kweek. Uitsluitend sputa die positief zijn in de moleculaire detectietest zouden dan nog voor kweek in aanmerking komen. Voor patiëntmaterialen die moeilijk te verkrijgen zijn, zoals van extrapulmonale sites, zouden zowel de kweek als moleculaire detectie ingezet moeten worden. Ook voor alle materialen van bepaalde patiënten, zoals hiv-positieven en anderszins immuungecompromitteerde personen en bijvoorbeeld patiënten van de intensiverecare-unit, zou er naast de moleculaire detectie altijd een kweek ingezet moeten worden, omdat de gevoeligheid van moleculaire diagnostiek en van de kweek per materiaal verschillen. Bij extrapulmonale tbc en bij immuungecompromitteerde patiënten is de gevoeligheid van de moleculaire diagnostiek lager dan bij reguliere patiënten.

J. van Ingen, Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen; A. van der Zanden, LabMicTa, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Hengelo.
Correspondentieadres: D. van Soolingen, Tuberculose referentielaboratorium, Centrum voor Infectieziektendiagnostiek en screening (IDS), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven; Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen, e-mailadres: dick.van.soolingen@rivm.nl.

De discussie rondom de noodzakelijkheid van kweek uit sputa is in het internationale perspectief sowieso zeer actueel, gezien de massale introductie van semi-automatische moleculaire technieken zoals de GeneXpert in gebieden met een hoge prevalentie van tbc waar van oudsher de mogelijkheden voor kweek ontbreken.³ Dergelijke gesloten PCR-systemen zullen ook in landen met een lage tbc-prevalentie hun weg vinden in de diagnostiek van tbc en van andere infectieziekten.

Een belangrijke reden om te twifelen aan de bruikbaarheid van moleculaire testen voor het detecteren van resistentie is gebaseerd op de terechte vrees om resistente gevallen van tbc te missen en bij fout-positieve bevindingen onterecht de behandeling bij te stellen. De moleculaire testen voor detectie van resistentie tegen isoniazide en rifampicine zijn in de afgelopen jaren echter dermate betrouwbaar gebleken, dat deze testen veilig kunnen worden gebruikt om effectief te screenen op deze resistenties. Patiëntmaterialen die positief worden bevonden in de PCR op *Mycobacterium tuberculosis*-complex, zouden daarom ook direct getest kunnen worden op resistentie tegen de twee meest belangrijke eerstelijnsmiddelen.⁴ In Nederland is in de laatste jaren een stijgende trend waar te nemen in de resistentie tegen eerstelijnsmiddelen, waarbij zo'n 12 procent van de *M. tuberculosis*-kweken een vorm van resistentie vertoont en er jaarlijks tussen de 10 en 20 multidrugresistente gevallen van tbc (MDR-TB) gevonden worden (Ruesen 2014; Eurosurveillance; in press). De toenemende resistentieproblematiek pleit ervoor om bij detectie van *M. tuberculosis*-complex direct te screenen met een moleculaire methode op resistentiemutaties en niet te wachten op de fenotypische gevoeligheidsbepaling. Het bevestigen van de bevindingen in moleculaire testen met fenotypische testen is echter nog steeds van groot belang, omdat bij het niet correct bepalen van resistenties door middel van een moleculaire test een verkeerde behandeling kan worden ingezet voor de duur van ten minste zes maanden. Groeiremming bij fenotypische gevoeligheidsbepalingen is uiteindelijk ook veelzeggender dan het aantonen van indicatieve resistentiemutaties. De fenotypische gevoeligheidsbepaling is echter ook niet altijd voor honderd procent dekkend voor het aantonen van resistentie. Voor *M. tuberculosis* is dit weliswaar nog niet beschreven, maar gramnegatieve staven kunnen een carba-penemase-gen bevatten en toch nog gevoelig tot enigszins verminderd gevoelig kunnen zijn voor meropenem.⁵ Verder wordt een klein deel van de INH- en rifampicineresistente gevallen in de moleculaire testen gemist, omdat er alternatieve resistentiemechanismen zijn die nog niet in de moleculaire detectie opgespoord kunnen worden.

Het vinden van mutaties in het *inhA*-gen, die geassocieerd zijn met een verminderde gevoeligheid voor isoniazide, heeft normaliter geen consequenties voor de behandeling. Bij het vinden van mutaties in de andere resistentie-

genen, *katG* en *rpoB*, die geassocieerd zijn met een hoog niveau van resistentie tegen isoniazide en rifampicine, dient de behandeling wel bijgesteld te worden. Verder dienen er bij het vinden van mutaties in het *rpoB*-gen ook direct moleculaire testen uitgevoerd te worden om eventuele resistentie tegen pyrazinamide en tweedelijnsmiddelen, zoals de fluorchinolonen en aminoglycosiden vast te stellen, zodat de behandelaar direct geïnformeerd kan worden over mogelijke extra resistentie tegen deze belangrijke klassen van middelen.⁶

De moleculaire test op ethambutol-resistentie is tot nu toe helaas onbetrouwbaar gebleken. De voorspellende waarde van specifieke mutaties voor het aantonen van resistentie tegen bepaalde tweedelijnsmiddelen is bij lange na geen honderd procent. Dit is bekend in ons land en uit de literatuur en deze informatie dient gebruikt te worden bij de overweging om de behandeling al dan niet bij te stellen op grond van de moleculaire testen.⁷ Omdat sommige moleculaire testen op resistentie tegen tweedelijnsmiddelen een lagere voorspellende waarde hebben dan die voor isoniazide en rifampicine, zijn de fenotypische testen hierbij van een nog groter belang. Helaas groeien multi-drugresistente stammen vaak nog langzamer dan normaal gevoelige *M. tuberculosis*-stammen en duurt het nog langer voordat de uitslag bekend is. Het is op dit moment nog onduidelijk of whole genome sequencing (WGS) een grotere voorspellende waarde zal hebben voor het aantonen van resistentie dan de huidige moleculaire technieken die uitsluitend bepaalde mutaties kunnen aantonen.⁸ Er loopt in Nederland ook onderzoek dat dit zou moeten aantonen.

Ook de ontwikkelingen op het gebied van epidemiologische typering gaan zeer snel. Waar tot 2009 nog de gecompliceerde restrictiefragmentlengtepolymorfisme (RFLP)-typering werd gebruikt als de standaardtechniek, werd vanaf die tijd de veel snellere variable number of tandem repeat (VNTR)-typering toegepast in Nederland.⁹ Dit heeft de doorlooptijd van typering van gemiddeld twee maanden tot twee weken teruggebracht. Een op PCR gebaseerde genotyperingsmethode (spoligo- en VNTR-typering) op patiëntmateriaal kan in bijzondere gevallen, bijvoorbeeld wanneer geen kweek is uitgevoerd en een hoge load aan *M. tuberculosis* aanwezig is, worden verricht.¹⁰ In de laatste jaren worden ook de mogelijkheden onderzocht om WGS te gebruiken als epidemiologische typering om de hoogste graad van resolutie in typering te bereiken en de resultaten zijn zeer veelbelovend.¹¹ Helaas is de analyse van WGS nog dermate gecompliceerd dat dit veel tijd en expertise vergt. Tevens is het met de huidige DNA-sequentieanalyse technieken nog lastig om repeterende DNA-sequenties te analyseren, terwijl deze juist veel polymorfisme bevatten. Ook kan WGS helaas nog niet rechtstreeks worden toegepast op mycobacteriën in patiëntmateriaal. Dit betekent dat op dit moment nog een

kweek nodig is voor de epidemiologische typering. Toch lijkt het niet onredelijk om te veronderstellen dat WGS in de nabije toekomst een zeer groot deel van de huidige diagnostiek zal gaan vervangen wat betreft de detectie van het causale agens, de identificatie van *M. tuberculosis*-complex subspecies en nontuberculeuze mycobacteriën, typering op genotype familie- en stamniveau, alsmede de detectie van resistentiemutaties. Van de gegevens die hieruit voortkomen zal het onderzoek naar de taxonomie, de virulentie en transmissie sterk profiteren.

NTM-diagnostiek

Het is van grootste belang om niet alleen *M. tuberculosis*, maar alle mycobacteriën die tot het genus *Mycobacterium* behoren, te detecteren in klinisch materiaal van verdachte patiënten, omdat er naast tuberculose ook ernstige, vaak op tuberculose lijkende infecties kunnen optreden, die veroorzaakt worden door nontuberculeuze mycobacteriën (NTM).¹² De behandeling hiervan is ook wezenlijk anders dan de behandeling van tbc.¹³ Verder dient bij een negatieve PCR op microscopisch-positief materiaal altijd gedacht te worden aan onder andere een *Nocardia*-, *Actinomyces*- en een NTM-infectie, om het onterecht opzetten van tbc-contactonderzoek en een foutieve behandeling te voorkomen.

Het diagnostisch palet voor de NTM-infecties is helaas nog veel kleiner dan voor tbc; moleculaire detectie van resistentie is wel mogelijk, maar nauwelijks gestandaardiseerd en slechts geschikt voor enkele klassen antibiotica en enkele species.¹⁴

Moleculaire detectie van NTM in patiëntmaterialen is zeer wel mogelijk, maar de klinische relevantie van NTM-detectie in niet-steriele materialen is vaak onduidelijk. NTM zijn wijd verspreid in het milieu en zelfs bijvoorbeeld drinkwater en kunnen daarom toevallig aanwezig zijn in sputum. Verder zijn niet alle NTM van bekende en onbekende species gemakkelijk te kweken en zijn er veel verwante micro-organismen die het diagnostisch proces kunnen verstoren, hetgeen kan betekenen dat de PCR op *Mycobacterium* wel positief is, maar de kweek negatief. Moleculair-epidemiologisch onderzoek van NTM staat nog in de kinderschoenen, maar interessante inzichten in verspreiding van bijvoorbeeld *M. abscessus* onder CF-patiënten is verkregen met behulp van WGS.^{15,16} Screening van sputum op de aanwezigheid van *M. tuberculosis*-complex zou nu al standaard uitgevoerd kunnen worden met moleculaire testen, indien meervoudige monsters geïncubeerd worden. Dit zou veel mycobacteriële kweken kunnen voorkomen. Idealiter is een dergelijke moleculaire techniek gebaseerd op de detectie van het genus *Mycobacterium* en niet alleen op *M. tuberculosis*-complex. Uitsluitend op sputa die een positief resultaat geven in de moleculaire detectie op *M. tuberculosis*-complex zou altijd een kweek ingezet moeten worden,

terwijl een kweek voor het aantonen van nontuberculeuze mycobacteriën, afhankelijk van het klinische beeld, overwogen zou moeten worden in risicopopulaties. Bij bijzondere materialen dient altijd een kweek en moleculaire detectie ingezet te worden. De *M. tuberculosis*-complex positieve patiëntmaterialen dienen direct getest te worden op mogelijke INH- en rifampicine-resistentie met een moleculaire test om eventueel de behandeling bij te stellen. Bij het vinden van rifampicine-resistentie dient tevens meteen een moleculaire test op resistentie tegen fluorchinolonen en aminoglycosiden ingezet te worden. De voorspellende waarde van bepaalde mutaties bij genen die bij deze resistenties een rol spelen is grotendeels bekend en dient op genuanceerde wijze gerapporteerd te worden aan de behandelende arts. Hoewel de voorspellende waarde nog niet ideaal is (publicatie in voorbereiding), hebben deze testen weldegelijk een toegevoegde waarde in de sneldiagnostiek van tuberculose. De moleculaire testen voor het indicatief aantonen van resistentie dienen altijd geverifieerd te worden met een (uitgebreide) fenotypische bepaling, in het geval van resistente isolaten met een uitgebreid panel aan middelen in een referentielaboratorium of hierin gespecialiseerd laboratorium. De kweek blijft voor PCR-positieve patiënten voorlopig tevens nog nodig om epidemiologische typering uit te voeren. Wellicht worden ook typeringsmethoden in de toekomst geschikt voor directe toepassing op klinisch materiaal.

Voor de diagnostiek van NTM-infecties is eenzelfde palet aan diagnostische tools nodig, maar dit veld loopt in de ontwikkeling van dergelijke tools nog ver achter op de diagnostische tools voor tuberculose.

Door gebruik te gaan maken van een moleculaire benadering in de detectie van mycobacteriën in sputum wordt de noodzakelijkheid van een groot aantal BSL3-laboratoria in Nederland nu al sterk verminderd, omdat er veel minder kweken hoeven te worden ingezet. Alleen alle PCR-positieve monsters zouden gekweekt moeten worden. Een vorm van centralisatie hierin zou een enorme financiële besparing op kunnen leveren wat betreft het bouwen en onderhouden van BSL3-laboratoria. Tevens zou dit kunnen leiden tot veel minder blootstelling van laboratoriumpersoneel aan de gevaren van een laboratoriuminfectie.

Referenties

1. Noordhoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2004;10:295-301.
2. Akkerman OW, van der Werf TS, de Boer M, de Beer JL, Rahim Z, Rossen JW, et al. Comparison of 14 molecular assays for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol*. 2013;51:3505-11.
3. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert(R) MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014;1:CD009593.

4. Boehme CC, Nabeta P, Hillemann D, Nicol MP, Shenai S, Krapp F, et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *NEJM*. 2010;363:1005-15.
5. van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC infectious diseases*. 2014;14:27.
6. Ferro BE, Garcia PK, Nieto LM, van Soolingen D. Predictive value of molecular drug resistance testing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Valle del Cauca, Colombia. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2220-4.
7. Drobniowski F, Nikolayevskyy V, Balabanova Y, Bang D, Papaventsis D. Diagnosis of tuberculosis and drug resistance: what can new tools bring us? *The international journal of tuberculosis and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. 2012;16:860-70.
8. Koser CU, Bryant JM, Becq J, Torok ME, Ellington MJ, Marti-Renom MA, et al. Whole-genome sequencing for rapid susceptibility testing of *M. tuberculosis*. *NEJM* 2013;369:290-2.
9. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2006;44:4498-510.
10. de Beer JL, Akkerman OW, Schurch AC, Mulder A, van der Werf TS, van der Zanden A, et al. Optimization of standard in-house 24-locus Variable Number of Tandem Repeat typing for *Mycobacterium tuberculosis* and its direct application to clinical material. *J Clin Microbiol*. 2014.
11. Schurch AC, Kremer K, Daviena O, Kiers A, Boeree MJ, Siezen RJ, et al. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3403-6.
12. van Ingen J, Boeree MJ, de Lange WC, Dekhuijzen PN, van Soolingen D. Impact of new American Thoracic Society diagnostic criteria on management of nontuberculous mycobacterial infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:418; author reply 9.
13. van Ingen J, Ferro BE, Hoefsloot W, Boeree MJ, van Soolingen D. Drug treatment of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in HIV-negative patients: the evidence. *Expert review of anti-infective therapy*. 2013;11:1065-77.
14. van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D, Mouton JW. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2012;15(3):149-61.
15. Bryant JM, Grogono DM, Parkhill J, Floto RA. Transmission of *M* abscessus in patients with cystic fibrosis – Authors' reply. *Lancet*. 2013;382:504.
16. Bryant JM, Grogono DM, Greaves D, Foweraker J, Roddick I, Inns T, et al. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2013;381:1551-60.
17. Van der Zanden, AGM. Tuberculosis diagnostics on respiratory samples: is culture always necessary? (contra). *Voorjaarsvergadering 2007*. Abstract O98, blz. 55.

Diagnostiek en behandeling van infecties door nontuberculeuze mycobacteriën

J. van Ingen

Samenvatting

Nontuberculeuze mycobacteriën (NTM) worden in toenemende mate erkend als verwekkers van ziekte bij de mens. Incidentie en prevalentie van deze infecties lijken toe te nemen in Nederland. De methoden voor laboratoriumdiagnostiek van deze infecties wijken, met name door het gebruik van meerdere mediatypen en incubatie bij lagere temperaturen, af van de diagnostiek van tuberculose. Het grootste struikelblok in de diagnostiek van humane infecties door NTM betreft het inschatten van de klinische relevantie van NTM geïsoleerd uit niet-steriele materialen, zoals uit de luchtwegen. Deze klinische relevantie verschilt sterk per species. Slechts een klein aantal van de ruim 150 verschillende NTM-species geeft ziekte waarvoor behandeling nodig is. De antibiotische behandeling is moeizaam door zijn lange duur, toxiciteit, veelvuldig falen van therapie en complexe farmacokinetische interacties, ook met middelen ter behandeling van het onderliggend lijden. Resistentiebepalingen zijn leidend in de selectie van middelen voor therapie, met name bij de snelle groeiers, zoals *Mycobacterium abscessus*. Bij de langzame groeiers (zoals het *M. avium*-complex) zijn er belangrijke discrepanties tussen in-vitrogevoeligheid en in vivo uitkomst van therapie. In dit overzichtsartikel worden belangrijke concepten van laboratoriumdiagnostiek, inschatting van klinische relevantie en antibiotische behandeling uiteengezet.

Trefwoorden

Nontuberculeuze mycobacteriën, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium abscessus*

Inleiding

Het genus *Mycobacterium* bevat drie hoofdgroepen, het *Mycobacterium tuberculosis*-complex, *M. leprae* en een restgroep, die collectief nontuberculeuze mycobacteriën (NTM; eerder ook 'atypische mycobacteriën') wordt genoemd. Deze laatste groep is zeer heterogeen en bevat momenteel ruim 150 erkende species, een aantal dat nog snel groeiende is. De NTM zijn veelvuldig aanwezig in ons milieu, met name in grond- en (kraan)water. Het milieu is ook de meest waarschijnlijke bron van humane infecties. De NTM worden van oudsher ingedeeld in twee

groepen, op basis van hun groeikarakteristieken: de snelle en langzame groeiers (snel is zichtbare groei binnen zeven dagen vanuit een sterk verdund inoculum). De meeste humane infecties worden veroorzaakt door species die tot de langzame groeiers behoren.¹

In veel landen waar de incidentie van tuberculose daalt, neemt de incidentie van infecties door NTM juist toe.² Het aantal NTM-isolaten dat werd ingestuurd naar het RIVM heeft in de periode tot 2008 een duidelijke stijging laten zien, hetgeen een stijgende incidentie van NTM-infecties doet vermoeden.³ In Nederland werd de incidentie in 2008 nog geschat op 1,7/100.000/jaar,³ in de Verenigde Staten zijn prevalenties tot 6,6/100.000/jaar gemeten, die nog steeds stijgen.⁴

Het grootste struikelblok in de diagnostiek van humane infecties door NTM betreft het inschatten van de klinische relevantie van NTM geïsoleerd uit niet-steriele materialen, meestal uit de luchtwegen. Dit is extra belangrijk omdat 90 procent van alle geïsoleerde NTM in Nederland juist geïsoleerd wordt uit die pulmonale materialen.⁵

Dit overzichtsartikel behandelt technische aspecten en klinische interpretatie van laboratoriumdiagnostiek, maar ook de antibiotische behandeling van deze infecties.

Laboratoriumdiagnostiek

De grote verscheidenheid binnen de NTM en de grote verschillen in optimale kweekcondities ten opzichte van *Mycobacterium tuberculosis* betekenen dat voor het optimaliseren van de microbiologische diagnostiek van NTM-infecties een aanpassing van diagnostische algoritmes nodig kan zijn.

Decontaminatie

De meest gebruikte decontaminatiemethode voor pulmonale en andere niet-steriele materialen voor de mycobacteriële kweek is de methode met gebruik

Correspondentieadres: J. van Ingen, aios, Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie (777), Postbus 9101, 6500 HB, Nijmegen, e-mail: jakko.vaningen@radboudumc.nl.

van N-Acetyl-L-Cysteine en NaOH (NALC-NaOH). Decontaminatie met 0,25 procent/1 procent n-acetyl-L-cysteine (NALC)-NaOH is gebruikelijk; opheven naar 1,25 procent NaOH verlaagt de contaminatiegraad maar leidt ook tot 10 procent afname in detectie van mycobacteriën met kweek en wordt afgeraden.⁶ Decontaminatie met 3 procent zwavelzuur leidt tot een lichte toename van detectie van NTM in vloeibare kweekmedia ten opzichte van 0,25 procent/1 procent NALC-NaOH.⁷

Voor monsters van Cystic Fibrosis (CF)-patiënten kan na de 0,25 procent/1 procent NALC-NaOH-decontaminatie een tweede stap met 5 procent oxaalzuur een reductie van de contaminatiegraad opleveren;⁸ een alternatief is decontaminatie met alleen 1 procent chloorhexidine. Hoewel chloorhexidine-decontaminatie goede resultaten geeft⁹ verstoort chloorhexidine de detector van het veelgebruikte Mycobacterium Growth Indicator Tube (MGIT, BD Bioscience, Erembodegem, België) geautomatiseerde vloeibare kweekstelsel. Naast deze decontaminatieprotocollen wordt een combinatie van polymyxine B (50 U/ml), amfotericine B (5 µg/ml), nalidixinezuur (20 µg/ml), trimethoprim (5 µg/ml) en azlocilline (10 µg/ml) (PANTA) toegevoegd aan kweekmedia om overgroei door overige microben te remmen.

In veel centra wordt een contaminatiegraad van 4 tot 5 procent aangehouden als optimale balans tussen te veel remming van de mycobacteriën zelf en te veel overgroei door overige microben. Dit percentage is echter gebaseerd op resultaten van centra die voornamelijk tuberculose-diagnostiek doen. Centra die meer NTM-longinfecties zien, bijvoorbeeld bij COPD- en CF-patiënten en patiënten met bronchiëctasieën door onderliggend lijden anders dan CF, zullen meer gecontamineerde kweken zien vanwege de kolonisatie van de onderste luchtwegen in deze patiëntcategorieën, vooral door *Pseudomonas aeruginosa*. Azlocilline maakt deel van het PANTA-supplement voor kweekmedia juist om de overgroei door *P. aeruginosa* te voorkomen, maar enkele gespecialiseerde CF-centra vervangen azlocilline toch door piperacilline.

Media en temperatuur

De sensitiviteit van de kweek wordt grotendeels bepaald door de keuze van media. Vloeibare media, zoals het in Nederland veel gebruikte MGIT-systeem, zijn gevoeliger dan ei-gebaseerde Löwenstein-Jensen, Ogawa, Coletsos en agar-gebaseerde Middlebrook 7H10/7H11 vaste media.^{10,11} De praktijk leert wel dat sommige species moeizaam groeien in het MGIT-systeem en een combinatie met een vast medium leidt tot een lichte verhoging van de sensitiviteit.¹⁰⁻¹² De meeste NTM hebben hun groeioptimum bij een temperatuur van 30°C; dit geldt in het bijzonder voor de species die huidinfecties en lymfadenitis veroorzaken (*M. marinum*, *M. haemophilum*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*). Hoewel dit aspect onvoldoende is onderzocht, lijkt het

raadzaam om bij verdenking op een NTM-infectie, zeker van de huid of lymfeklieren, ook bij 30°C te incuberen. Voor het succesvol kweken van *M. haemophilum* is het noodzakelijk om extra ijzer of hemine aan media toe te voegen.

Identificatie

Correcte identificatie van NTM is van belang voor een eerste inschatting van klinische relevantie en gerichte therapie. Moleculaire methoden worden het meest gebruikt en bieden een redelijk onderscheidend vermogen. De identificatie van snelle groeiers (*M. chelonae-abscessus*-complex, *M. fortuitum*-complex) is het meest problematisch, terwijl juist de species binnen deze groepen sterk verschillen in hun klinische relevantie en gevoeligheid voor antibiotica, en correcte identificatie dus een belangrijke steun voor klinici kan zijn. Recente studies laten zien dat het aantonen van de subspecies van *M. abscessus* (*M. abscessus* subsp. *abscessus* en *M. abscessus* subsp. *bolletii*¹³) belangrijk is omdat *M. abscessus* subsp. *abscessus* intrinsiek macrolideresistent is, maar een deel van de *M. abscessus* subsp. *bolletii*-stammen macrolidegevoelig is (voorheen was deze groep tot species '*M. massiliense*' verheven). De klinische respons op macrolidegebaseerde regimes is in deze laatste groep ook veel beter.¹⁴ Om tot een dergelijk onderscheidend vermogen te komen is sequencing vereist; 16S rRNA gen-sequentie-analyse heeft nauwelijks onderscheidend vermogen voor snel groeiende NTM. Het 65kDa heat shock protein gen (*hsp65*) is het meest gebruikte target dat een dergelijk onderscheidend vermogen wel biedt,^{15,16} een fragment van het *rpoB*-gen biedt een vrijwel vergelijkbare resolutie.¹⁷ Commercieel beschikbare line probe assays (Inno-LiPA [Innogenetics, Gent, België] en GenoType CM/AS [Hain Lifescience, Nehren, Duitsland]) hebben het voordeel dat sequencing niet nodig is maar kennen een veel lager onderscheidend vermogen, met name weer onder de snelgroeiende NTM.^{18,19}

Gevoeligheidsbepalingen

Gevoeligheidsbepalingen voor nontuberculeuze mycobacteriën zijn nauwelijks klinisch gevalideerd. Hoewel wereldwijd zowel E-testen, agardilutiemethoden en micro-en macrodilutiemethoden worden gebruikt, zijn alleen die laatste gebruikt in klinische trials waarin MIC's werden gerelateerd aan uitkomsten van therapie.²⁰ Alleen een lage MIC (< 4 mg/l) voor claritromycine is geassocieerd met goede klinische uitkomst van therapie met gecombineerde regimes met claritromycine, in zowel hiv-geassocieerde gedissemineerde infecties als in pulmonale infecties.²¹⁻²⁴ De MIC's van rifampicine en ethambutol voor *M. avium*-complexbacteriën zijn niet voorspellend voor de uitkomst van therapie en het wordt daarom aanbevolen alleen gevoeligheid voor macroliden te bepalen.²⁰ Het

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) heeft wel, met gepaste reserve, breekpunten geformuleerd voor moxifloxacin en linezolid, maar in de praktijk wordt vrijwel nooit gevoeligheid voor deze middelen gemeten.²⁵ Zeer recent is ook gebleken dat bij pulmonale infecties door *M. avium*-complexbacteriën een amikacine MIC ≥ 64 mg/l het gevolg is van verworven mutaties tijdens of na falende therapie met amikacine-bevattende regimes; stammen met amikacine MIC's ≥ 64 mg/l dienen als resistent te worden beschouwd.²⁶

Rifampicine speelt een sleutelrol in de behandelregimes voor *M. kansasii*-infecties en rifampicineresistentie, in vitro (MIC's meer dan 1 mg/l), leidt tot falen van rifampicine-bevattende regimes.^{27,28} Daarom wordt momenteel vooral het testen van rifampicine aangeraden (zie tabel 1).²⁵

Voor de snelle groeiers zijn de validatiestudies veel beperkter en retrospectief van aard; slechts één studie heeft MIC's gerelateerd aan uitkomsten van therapie, bij patiënten met extrapulmonale infecties.²⁹ Deze studie rapporteerde klinische genezing door vooral trimethoprim-sulfamethoxazol-monotherapie bij 90 procent van de patiënten met *M. fortuitum*-infecties en 72 procent bij behandeling met amikacine en cefoxitine voor infecties door '*M. chelonae*' (nu opgedeeld in *M. chelonae*- en de *M. abscessus*-groep); bij allen was de therapie gekozen op geleide van de resultaten van de gevoeligheidsbepaling door middel van microdilutie.²⁹ Voor patiënten met pulmonale infecties is de voorspellende waarde van in-vitrogevoeligheidsbepaling veel beperkter.^{30,31} Op basis van deze beperkte studies heeft CLSI aanbevelingen gepubliceerd voor het uitvoeren van gevoeligheidsbepalingen voor NTM. De aanbevelingen qua methoden en te testen antibiotica, per species, staan in tabel 1.²⁵ Uit contact met Europese collega's blijkt dat deze aanbevelingen zeer beperkt ingang hebben gevonden. Het Radboudumc biedt momenteel de door CLSI gepropageerde microdilutie-methode aan voor alle NTM.

Risicogroepen voor NTM-infecties

De holtevormende longinfecties treffen vooral patiënten met bronchiëctasieën door COPD, CF of non-CF. Het nodulair-bronchiëctatische type is in Nederland zeer zeldzaam (zie figuur 1). Dit laatste type treft doorgaans postmenopauzale niet-rokende vrouwen zonder relevante pulmonale voorgeschiedenis en is de meest voorkomende NTM-ziektemanifestatie in de Verenigde Staten.^{12,32} In deze groep zijn opvallend hoge prevalenties van gastro-oesofageale refluxziekte, 26 tot 44 procent, gemeten en worden frequent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) genmutaties gevonden.^{32,33,34}

Gedissemineerde en extrapulmonale infecties worden gezien bij patiënten die immuungecompromiteerd zijn door gebruik van immunosuppressieve medicatie (anti-TNF, corticosteroiden, post-transplantatie), hiv-infecties met CD 4-aantallen $< 50/\mu\text{l}$, hematologische maligniteiten of, zeldzaam, door defecten van de interferon-gamma / IL-12 signaaltransductieketen.¹²

Lymfadenitis door NTM treft vooral kinderen onder de 8 jaar. Ook na uitvoerig immunologisch onderzoek lijken deze kinderen immunocompetent te zijn.³⁵ BCG-vaccinatie op babyleeftijd lijkt wel te beschermen tegen lymfadenitis door NTM.^{36,37}

Klinische relevantie van NTM in pulmonale materialen

Het bepalen van de klinische relevantie van NTM geïsoleerd uit pulmonale materialen is bij uitstek een taak voor de arts-microbioloog. Het vraagt bijvoorbeeld kennis van species-specifieke eigenschappen, het aantal positieve kweken en de intervallen tussen afnames en de geschatte bacteriële belasting. Ook morfologische aspecten kunnen helpen bij het schatten van deze klinische relevantie; *M. abscessus*-stammen met een ruwe koloniemorfologie worden vooral geïsoleerd bij patiënten met echte longinfecties, terwijl gladde bolle *M. abscessus*-kolonies vooral worden gezien bij kolonisatie.³⁸ In samenspraak met de behandelaar kan dan getoetst worden of een patiënt

Tabel 1. CLSI-aanbevelingen voor gevoeligheidsbepalingen van NTM.

Species/complex	Eerstekeusmethode	Alternatief	Antibiotica
<i>M. avium</i> -complex	Macrodilutie (7H12b)	Microdilutie (CAMH)	CLA, MOX, LNZ, (AMI)
<i>M. kansasii</i>	Microdilutie (CAMH)	Macrodilutie (7H12b)	RIF, CLA
Overige langzame groeiers	Microdilutie (CAMH)*	Niet vastgesteld	CLA, CIP, MOX, LNZ, AMI, RIF, EMB, DOX, MIN, TGC, SXT, STR
<i>M. marinum</i>	Microdilutie (CAMH)	Macrodilutie, agardiffusie	CLA, RIF, EMB, DOX, SXT
Snelle groeiers	Microdilutie (CAMH)	Geen	CLA, CIP, MOX, LNZ, AMI, TOB, DOX, MIN, TGC, SXT, IMI, FOX

7H12b: Middlebrook 7H12b medium / BacTec460 (cave: in Nederland niet leverbaar); CAMH: cation-adjusted Mueller-Hinton broth met OADC supplement. CLA: clarithromycine; CIP: ciprofloxacin; MOX: moxifloxacin; LNZ: linezolid; AMI: amikacine; TOB: tobramycine; RIF: rifampicine; EMB: ethambutol; DOX: doxycycline; MIN: minocycline; TGC: tigecycline; SXT: cotrimoxazol; STR: streptomycine; IMI: imipenem; FOX: cefoxitine.

**M. xenopi* groeit slecht in dit medium

Kader. Diagnostische criteria voor NTM-longinfecties van de American Thoracic Society.

Kliniek

1. Pulmonale symptomen, nodulaire of holtevormende afwijkingen op een conventionele thoraxfoto, of een HRCT scan met multifocale bronchiëctasieën en kleine noduli.

en

2. Verantwoorde uitsluiting van andere diagnosen.

Microbiologie

1. Positieve kweken uit ten minste twee separaat afgenomen sputummonsters (als de eerste sputa geen aanknopingspunten bieden, overweeg dan altijd deze te herhalen).

of

2. Een positieve kweek uit ten minste één bronchoalveolaire lavage of spoeling

of

3. Een transbronchiale of andere longbiopsie met histopathologische afwijkingen passend bij een mycobacterieel infect (granulomateuze ontsteking of zichtbare zuurvaste staven) en een corresponderende positieve kweek voor NTM of ten minste één recente positieve kweek uit sputum of een bronchoalveolaire lavage of spoeling.

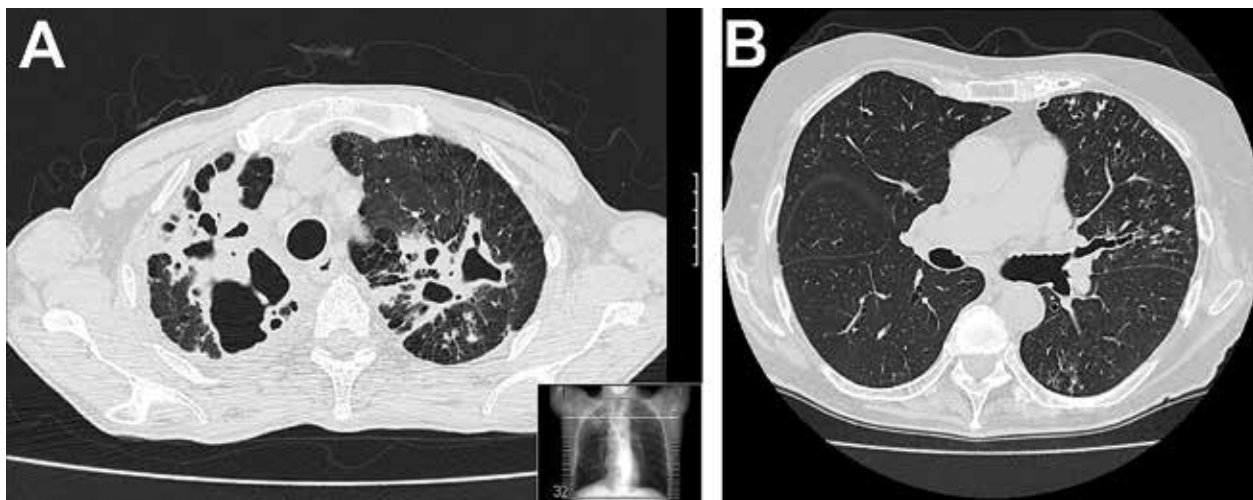
Let op: Voor correct gebruik van deze criteria dienen minstens drie separaat afgenomen pulmonale monsters beschikbaar te zijn. HRCT: High resolution computed tomography; NTM: nontuberculeuze mycobacteriën.

voldoet aan de diagnostische criteria opgesteld door de Amerikaanse longartsenvereniging (ATS; zie kader 1).¹² De klinische relevantie van NTM geïsoleerd uit pulmonale materialen verschilt zeer sterk per species. Aan een zijde van het spectrum staan species als *M. gordonae*, *M. terrae* en *M. phlei*, die vrijwel nooit als klinisch relevant hoeven te worden beschouwd, maar aan de andere zijde staan species als *M. kansasii*, *M. malmoense* en *M. szulgai*, waarbij pulmonale isolaten vrijwel altijd geassocieerd lijken te zijn met ware ziekte, die monitoring of behandeling behoeft.⁵ In Nederland is deze mate van klinische relevantie voor vele species retrospectief onderzocht, een grove samenvatting van de bevindingen is weergegeven in figuur 2.^{5,39-43} Uit vergelijking met gepubliceerde data uit andere landen blijkt dat de Nederlandse situatie niet gelijk is aan die in andere landen. De isolatiefrequentie van species verschilt per land/regio,⁴⁴ maar ook de mate van klinische relevantie van een species kan sterk verschillen per land, bijvoorbeeld voor *M. kansasii* en *M. szulgai*, die in Zuid-Korea veelvuldig worden gevonden, maar nauwelijks geassocieerd zijn met ziekte.⁴⁵

Antibiotische behandeling van NTM (long)infecties

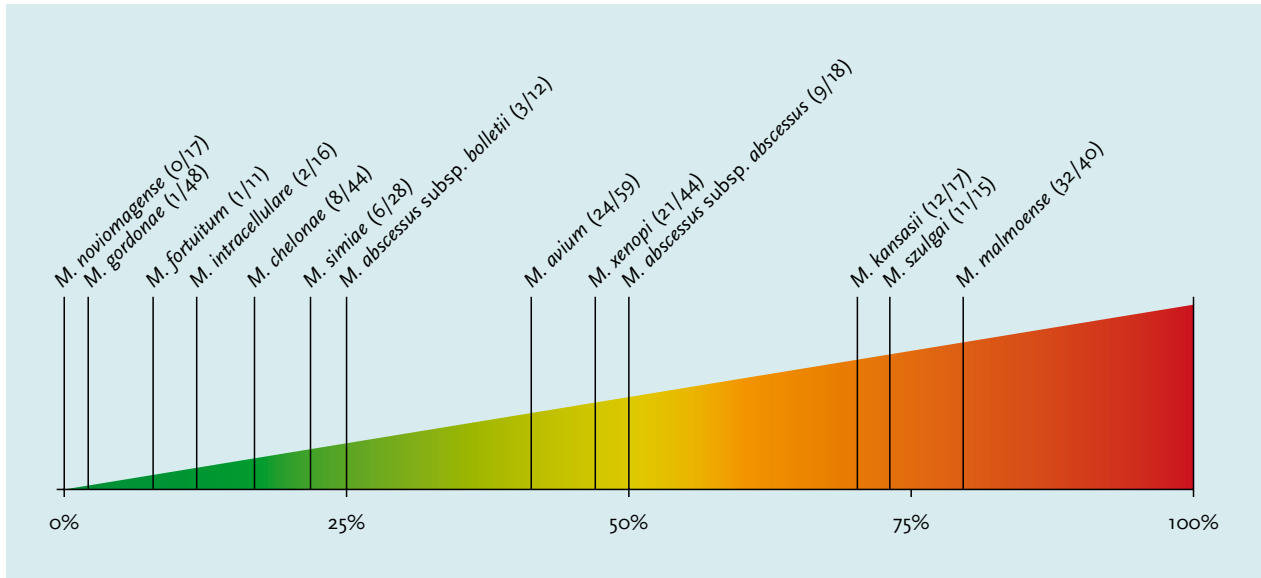
De antibiotische behandeling van NTM-infecties is lang, moeizaam door het gebruik van combinatietherapie en gestoeld op zeer gebrekkig klinisch onderzoek. Waar mogelijk heeft chirurgische debulking een zeer belangrijke plaats in de therapie, zowel in pulmonale als extrapulmonale infecties.^{12,46} In de antibiotische therapie wordt de middelenkeuze bepaald door de verwekker en de duur door de lokalisatie. De antibiotische therapie wordt hieronder kort samengevat per species/complex en per lokalisatie. De momenteel geadviseerde behandeling van longinfecties^{12,47} is per species kort samengevat in tabel 2.

Figuur 1. De twee uitingsvormen van pulmonale NTM-infecties.



A: holtevormende infectie door *M. szulgai*; B: nodulair-bronchiëctatische ziekte door *M. intracellulare*.

Figuur 2. Klinische relevantie van verschillende NTM species, geïsoleerd uit pulmonale materialen.



De percentages zijn de percentages patiënten bij wie het betreffend species werd geïsoleerd, die uiteindelijk aan de diagnostische criteria van de ATS bleken te voldoen ($n_{ATS\ criteria\ voldaan} / n_{totaal}$). Vanzelfsprekend gaat het vaak om kleine aantallen en is dit dus een grove raming.

Tabel 2. Huidig geadviseerde behandelregimes voor NTM longinfecties, per species.

Species	Aangeraden regime	Alternatief
<i>M. avium</i> -complex	RE-macrolide (+/- AS) Duur: > 12 maanden CN	CloE-macrolide
<i>M. kansasii</i> (rifampicine-gevoelig getest)	HRE (+AS in maand 1 t/m 3) Duur: 12 maanden	RE-macrolide Duur: > 12 maanden CN
<i>M. malmoense</i>	RE-macrolide Duur: > 12 maanden CN	RE-FQ Duur: > 12 maanden CN
<i>M. xenopi</i>	RE-macrolide (+/- FQ) Duur: > 12 maanden CN	RE-FQ Duur: > 12 maanden CN
<i>M. abscessus subsp. abscessus</i> of <i>M. abscessus subsp. bolletii</i> (eerder 'M. bolletii') Induceerbare macrolideresistentie	3 of 4 van: amikacine, cefoxitine, imipenem, tigecycline, linezolid (intensieve fase) Duur: > 12 maanden CN	
<i>M. abscessus subsp. bolletii</i> (eerder 'M. massiliense') Geen induceerbare macrolideresistentie	Macrolide, plus 2 van: amikacine, cefoxitine, imipenem, linezolid (intensieve fase) Duur: > 12 maanden CN	Amikacine, cefoxitine, macrolide, ciprofloxacine, doxycycline Duur: > 12 maanden CN

R: rifampicine; E: ethambutol; Clo: clofazimine; H: isoniazide; AS: amikacine of streptomycine; FQ: fluorochinolon; CN: na conversie naar negatieve kweken.

M. avium-complex

Het geadviseerde regime voor longinfecties door MAC is gegeven in tabel 2. Het is belangrijk te beseffen dat deze adviezen zijn gebaseerd op casuïstiek en een klein aantal klinische onderzoeken.^{23,24} Rifampicine heeft sterke interacties met claritromycine en leidt tot meer dan 60 procent verlaagde spiegels van claritromycine.⁴⁸ De klinische relevantie van deze interactie is nooit onderzocht. Voor patiënten met holtevormende afwijkingen wordt geadviseerd om in de eerste maanden van therapie amikacine of streptomycine toe te voegen aan de therapie.¹² Het enige gecontroleerde onderzoek dat dit aspect heeft

onderzocht vond een snellere conversie naar negatieve kweken, maar geen significante verschillen in uiteindelijke uitkomst van therapie.⁴⁹ Voor gedissemineerde infecties bij hiv/AIDS-patiënten zijn meerdere klinische trials gedaan. Op basis van deze trials wordt een regime van claritromycine, ethambutol en rifabutin aangeraden. Rifabutin heeft minder interacties met hiv-medicatie en heeft daarom de voorkeur boven rifampicine. De duur van behandeling ligt niet vast, maar is vaak ongeveer 12 maanden, of totdat de patiënt klachtenvrij is en gedurende 12 maanden een CD4-getal van meer dan 100 heeft onder stabiele antiretrovirale therapie.¹²

Voor gelokaliseerde MAC-infecties, bijvoorbeeld van huid of weke delen, geldt een behandelduur van 6 tot 12 maanden, mede afhankelijk van de mogelijkheid om chirurgische debulking toe te passen.¹² Bij de behandeling van extrapulmonale of gedissemineerde infecties is het vanzelfsprekend ook belangrijk om de immunestatus van de patiënt zo ver mogelijk te optimaliseren.

M. kansasii

Het behandelregime voor longinfecties door *M. kansasii* is te vinden in tabel 2. *Mycobacterium kansasii* neemt een bijzondere plek in binnen de behandeling van NTM-infecties, omdat de behandeling veel meer lijkt op de tuberculosebehandeling, gezien de middelenkeuze en de relatief korte duur.²⁷ De behandeling met isoniazide, rifampicine en ethambutol wordt ook toegepast bij extrapulmonale en gedissemineerde infecties. Hier gelden dezelfde ideeën qua behandelduur en eventuele chirurgische behandeling als bij MAC.¹² De uitkomsten van behandeling van *M. kansasii*-infecties zijn doorgaans gunstiger dan bij andere NTM, met name MAC en *M. abscessus*.^{12,47}

Overige langzame groeiers (*M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. simiae*)

Voor de behandeling van infecties met langzame groeiers anders dan MAC en *M. kansasii* is zeer weinig literatuur beschikbaar. Binnen de Britse wetenschappelijke vereniging van longartsen zijn twee studies uitgevoerd voor *M. malmoense* en *M. xenopi*. De eerste studie liet zien dat het toevoegen van isoniazide aan een regime van 24 maanden rifampicine en ethambutol weinig toegevoegde waarde had.⁵⁰ De tweede studie vergeleek 24 maanden rifampicine, ethambutol en claritromycine met 24 maanden rifampicine, ethambutol en ciprofloxacine. Alleen voor *M. malmoense* leek het toevoegen van claritromycine tot betere uitkomsten te leiden.⁵¹ Gezien het gerapporteerde succes van de macroliden bij MAC wordt door de Amerikaanse wetenschappelijke vereniging van longartsen toch aangeraden laagdrempelig een macrolide toe te voegen. In Nederland zijn de uitkomsten van therapie bij *M. malmoense*-infecties doorgaans goed,⁴⁰ bij *M. xenopi* juist bijzonder slecht.³⁹ Er is bij *M. xenopi* met name een hoge mortaliteit in het algemeen, omdat dit species met name gevonden wordt bij zeer oude patiënten met ernstig pulmonaal lijden en gelijktijdige andere (schimmel)infecties.^{50,52}

Infecties door *M. simiae* zijn notoir om de zeer slechte uitkomsten van therapie. Dit organisme veroorzaakt slechts zelden ziekte,⁴¹ maar de ziekte reageert nauwelijks op de standaardtherapieën zoals voor MAC. De huidige richtlijnen geven dit ook aan en adviseren om te behandelen met rifampicine, ethambutol, macroliden en fluorchinolonen, liefst met bewijs van in-vitrogevoeligheid voor die laatste twee klassen.¹²

M. abscessus

De therapie van infecties door *M. abscessus* is zeer moeizaam en de resultaten zijn zeer beperkt, zeker bij longinfecties. *M. abscessus* subsp. *bolletii* (ten minste de stammen die eerder '*M. massiliense*' mochten worden genoemd) heeft een defect *erm*-gen en is in vitro gevoelig voor macroliden. De uitkomst van therapie met regimes met macroliden bij dit subspecies is dan ook veel gunstiger dan bij *M. abscessus* subsp. *abscessus*.¹⁴ Voor *M. abscessus* subsp. *abscessus* zijn op basis van in-vitrogevoeligheid vooral amikacine, cefoxitine en in mindere mate imipenem en linezolid mogelijke opties voor behandeling.⁴⁷ De behandeling is dus ook per definitie intraveneus voor de gehele therapieduur. In de praktijk wordt deze therapie kort verdragen en wordt zij vaak slechts enkele maanden volgehouden ('intensieve fase'), waarna over wordt gegaan op een milder regime van zoveel mogelijk orale of inhaalbare middelen ('continuatiefase'), vergelijkbaar met de tuberculosebehandeling. Met name de middelenkeuze in de continuatiefase is nauwelijks onderzocht.⁴⁷ Er is succes beschreven van continuatietherapie met doxycycline, ciprofloxacine en claritromycine, zelfs bij in-vitroresistentie tegen de eerste twee.^{14,31}

Overige snelle groeiers (*M. chelonae*, *M. fortuitum*-complex)

Hoewel *M. chelonae* en *M. fortuitum* regelmatig worden geïsoleerd is echte ziekte door deze organismen zeldzaam.⁵ Huid- en weke deleninfecties of zelfs osteomyelitis na lokale inoculatie is een bekende klinische entiteit. Gedissemineerde infecties, die zich uiten in multipiele (sub)cutane nodulaire afwijkingen en abscessen, worden gezien bij ernstig immuungecompromitteerden.¹² In tegenstelling tot de nauw verwante *M. abscessus*-groep is *M. chelonae* in vitro gevoelig voor vele klassen antibiotica en is de uitkomst van therapie met deze middelen goed. Tobramycine, claritromycine en chinolonen zijn middelen van eerste keuze.^{12,53} Therapie voor *M. fortuitum*-infecties wordt gebaseerd op de in-vitrogevoeligheid, waarbij chinolonen, cotrimoxazol en amikacine een belangrijke rol hebben.^{12,53} Combinaties van twee tot drie middelen zijn doorgaans succesvol. De therapieduur bij infecties van huid en weke delen is ongeveer vier maanden, bij osteomyelitis zes maanden en bij longinfecties tot 12 maanden na conversie naar negatieve kweken.¹² De macroliden hebben waarschijnlijk een belangrijke rol bij *M. chelonae*-infecties, maar niet bij *M. fortuitum*-infecties omdat *M. fortuitum* en alle nauw verwante species *erm*-genen en dus induceerbare macrolideresistentie hebben.²⁰

Lymfadenitis door NTM

Voor cervicofaciale lymfadenitis door NTM, een aandoening die vooral gezien wordt bij kinderen jonger dan 6 jaar, is chirurgische verwijdering van aangedane klieren de optimale behandeling.⁵⁴ Indien chirurgie

gecontra-indiceerd of onwenselijk is kan met drie maanden rifabutin en claritromycine een genezingsgraad van 66 procent worden bereikt, maar rifabut-intoxiciteit kan een belemmerende factor zijn.⁵⁴ Deze behandeling is geschikt voor de in Nederland meest voorkomende verwekkers, *M. avium*-complex, *M. malmoense* en *M. haemophilum*.⁵⁵

Conclusies

NTM kunnen een breed palet aan infecties veroorzaken en een deel daarvan lijkt in de laatste jaren in frequentie toe te nemen. De arts-microbioloog heeft een belangrijke rol in het bepalen van de klinische relevantie van gekweekte NTM, zoals dit ook geldt voor andere opportunisten. Kennis van speciesspecifieke eigenschappen en daarmee geassocieerde ziektebeelden, virulentie, groei behoeften en resistentie zijn belangrijk voor goede klinische advisering. Gezien de stabiel lage incidentie van tuberculose en het toenemende relatieve belang van de NTM voor mycobacteriologische laboratoria in Nederland kan het herzien van protocollen voor decontaminatie, mediaselectie en duur en temperatuur van incubatie nodig zijn. Het Radboudumc (met Universitair Centrum voor Chronische Ziekten Dekkerswald) is een referentiecentrum voor deze infecties en kan zowel klinische als microbiologische ondersteuning bieden, waaronder resistentiebepalingen.

De behandeling van NTM-infecties blijft zeer moeizaam en laat zich qua complexiteit en uitkomst vergelijken met de behandeling van meervoudig resistente en extensief resistente tuberculose. Ons huidige antibiotische arsenaal is onvoldoende, met name bij infecties door *M. abscessus*. Er moeten nieuwe middelen en effectievere doseringen en combinaties van huidige middelen worden gezocht.

Referenties

1. Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119:107-59.
2. Marras TK, Daley CL. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2002;23:553-67.
3. van Ingen J. Nontuberculous mycobacteria; from gene sequences to clinical relevance. Proefschrift. Radboud Universiteit Nijmegen, 2009. http://webdoc.ubn.ru.nl/mono/i/ingen_j_van/nontmy.pdf
4. Prevots DR, Shaw PA, Strickland D, et al. Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182:970-6.
5. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WCM, et al. Clinical relevance of nontuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, the Netherlands. *Thorax.* 2009;64:502-6.
6. Peres RL, Maciel EL, Morais CG, et al. Comparison of two concentrations of NALC-NaOH for decontamination of sputum for mycobacterial culture. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13:1572-5.
7. Buijtelts PC, Petit PL. Comparison of NaOH-N-acetyl cysteine and sulfuric acid decontamination methods for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *J Microbiol Methods.* 2005;62:83-8.
8. Whittier S, Hopfer RL, Knowles MR, Gilligan PH. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:861-4.
9. Ferroni A, Vu-Thien H, Lanotte P, Le Bourgeois M, et al. Value of the chlorhexidine decontamination method for recovery of nontuberculous mycobacteria from sputum samples of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2237-9.
10. Idigoras P, Beristain X, Iturzaeta A, Vicente D, Pérez-Trallero E. Comparison of the automated nonradiometric Bactec MGIT 960 system with Löwenstein-Jensen, Coletosos, and Middlebrook 7H11 solid media for recovery of mycobacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19:350-4.
11. Yan JJ, Huang AH, Tsai SH, Ko WC, Jin YT, Wu JJ. Comparison of the MB/BacT and BACTEC MGIT 960 system for recovery of mycobacteria from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000;37:25-30.
12. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:367-416.
13. Leao SC, Tortoli E, Euzéby JP, Garcia MJ. Proposal that *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* be united and reclassified as *Mycobacterium abscessus* subsp. *bolletii* comb. nov., designation of *Mycobacterium abscessus* subsp. *abscessus* subsp. nov. and emended description of *Mycobacterium abscessus*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2011;61:2311-3.
14. Koh WJ, Jeon K, Lee NY, et al. Clinical significance of differentiation of *Mycobacterium massiliense* from *Mycobacterium abscessus*. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183:405-10.
15. Telenti A, Marchesi F, Balz M, et al. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31:175-8.
16. Zelazny AM, Root JM, Shea YR, et al. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1985-95.
17. Adekambi T, Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2004;54:2095-105.
18. Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4418-20.
19. Richter E, Rüscher-Gerdes S, Hillemann D. Evaluation of the GenoType Mycobacterium Assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1769-75.
20. van Ingen J, Boeree M, van Soolingen D, Mouton J. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria. *Drug Resist Updat.* 2012;15:149-61.
21. Chaisson RE, Benson CA, Dube MP, et al. Clarithromycin therapy for bacteremic *Mycobacterium avium* complex disease. A randomized, double-blind, dose-ranging study in patients with AIDS. *AIDS Clinical Trials Group Protocol 157 Study Team. Ann Intern Med.* 1994;121:905-11.
22. Sison JP, Yao Y, Kemper CA, et al. Treatment of *Mycobacterium avium* complex infection: do the results of in vitro susceptibility tests predict therapeutic outcome in humans? *J Infect Dis.* 1996;173:677-83.
23. Wallace RJ Jr, Brown BA, Griffith DE, Girard WM, Murphy DT. Clarithromycin regimens for pulmonary *Mycobacterium avium* complex: the first 50 patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153:1766-72.
24. Tanaka E, Kimoto T, Tsuyuguchi K, et al. Effect of clarithromycin regimen for *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160:866-72.
25. Clinical Laboratory Standards Institute. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes – Approved Standard. Second Edition. 2011. Clinical Standards Institute. CLSI document M24-A2. Wayne, PA.
26. Brown-Elliott BA, Iakhiaeva E, Griffith DE, et al. In vitro activity of amikacin against isolates of *Mycobacterium avium* complex with proposed MIC breakpoints and finding of a 16S rRNA gene mutation in treated isolates. *J Clin Microbiol.* 2013;51:3389-94.
27. Ahn CH, Lowell JR, Ahn SS, Ahn SI, Hurst GA. Short-course chemotherapy for pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii*. *Am Rev Respir Dis.* 1983;128:1048-50.

28. Wallace RJ Jr, Dunbar D, Brown BA, et al. Rifampin-resistant *Mycobacterium kansasii*. Clin Infect Dis. 1994;18:736-43.
29. Wallace RJ, Swenson JM, Silcox VA, Bulen MG. Treatment of nonpulmonary infections due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* on the basis of in vitro susceptibilities. J Infect Dis. 1985;152:500-14.
30. Jarand J, Levin A, Zhang L, Huit G, Mitchell JD, Daley CL. Clinical and microbiologic outcomes in patients receiving treatment for *Mycobacterium abscessus* pulmonary disease. Clin Infect Dis. 2011;52:565-71.
31. Jeon K, Kwon OJ, Lee NY, et al. Antibiotic treatment of *Mycobacterium abscessus* lung disease: a retrospective analysis of 65 patients. Am J Respir Crit Care Med. 2009;180:896-902.
32. Kim RD, Greenberg DE, Ehrmantraut ME, et al. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease: prospective study of a distinct preexisting syndrome. Am J Respir Crit Care Med. 2008;178:1066-74.
33. Koh WJ, Lee JH, Kwon YS, et al. Prevalence of gastroesophageal reflux disease in patients with nontuberculous mycobacterial lung disease. Chest. 2007;131:1825-30.
34. Thomson RM, Armstrong JG, Looke DF. Gastroesophageal reflux disease, acid suppression, and *Mycobacterium avium* complex pulmonary disease. Chest. 2007;131:1166-72.
35. Haverkamp MH, Lindeboom JA, de Visser AW, et al. Nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children from the multicenter, randomized, controlled trial in The Netherlands: relevance of polymorphisms in candidate host immunity genes. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2010;74:752-4.
36. Trnka L, Dankova D, Svandova E. Six years' experience with the discontinuation of BCG vaccination: 4. Protective effect of BCG vaccination against the *Mycobacterium avium* intracellulare complex. Tuberc Lung Dis. 1994;75:348-52.
37. Romanus V, Hallander HO, Wählén P, Olinder-Nielsen AM, Magnusson PH, Juhlin I. Atypical mycobacteria in extrapulmonary disease among children. Incidence in Sweden from 1969 to 1990, related to changing BCG vaccination coverage. Tuberc Lung Dis. 1995;76:300-10.
38. Catherinot E, Roux AL, Macheras E, et al. Acute respiratory failure involving an R variant of *Mycobacterium abscessus*. J Clin Microbiol. 2009;47:271-4.
39. van Ingen J, Boeree MJ, de Lange WCM, et al. *Mycobacterium xenopi* clinical relevance and determinants, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2008;14:385-9.
40. Hoefsloot W, van Ingen J, de Lange WCM, Dekhuijzen PNR, Boeree MJ, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium malmoense* isolation in the Netherlands. Eur Respir J. 2009;34:926-31.
41. van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PNR, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium simiae* in pulmonary samples. Eur Respir J. 2008;31:106-9.
42. van Ingen J, Boeree MJ, de Lange WCM, de Haas PEW, Dekhuijzen PNR, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium szulgai* in the Netherlands. Clin Infect Dis. 2008;46:1200-5.
43. van Ingen J, de Zwaan R, Dekhuijzen R, Boeree M, van Soolingen D. Clinical relevance of *Mycobacterium chelonae-abscessus* group isolation in 95 patients. J Infect. 2009;59:324-31.
44. Hoefsloot W, van Ingen J, Andréjak C, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: A NTM-NET collaborative study. Eur Respir J. 2013 Apr 18. [Epub ahead of print]
45. Koh WJ, Kwon OJ, Jeon K, et al. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea. Chest. 2006;129:341-8.
46. Yu JA, Weyant MJ, Mitchell JD. Surgical treatment of atypical mycobacterial infections. Thorac Surg Clin. 2012;22:277-85.
47. van Ingen J, Ferro BE, Hoefsloot W, Boeree MJ, van Soolingen D. Treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease in HIV-negative patients: the evidence. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11:1065-77.
48. van Ingen J, Egelund EF, Levin A, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease treatment. Am J Respir Crit Care Med. 2012;186:559-65.
49. Kobashi Y, Matsushima T, Oka M. A double-blind randomized study of aminoglycoside infusion with combined therapy for pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. Respir Med. 2007;101:130-8.
50. Research Committee of the British Thoracic Society. First randomised trial of treatments for pulmonary disease caused by *M. avium intracellulare*, *M. malmoense*, and *M. xenopi* in HIV negative patients: rifampicin, ethambutol and isoniazid versus rifampicin and ethambutol. Thorax. 2001;56:167-72.
51. Research Committee of the British Thoracic Society. Clarithromycin vs ciprofloxacin as adjuncts to rifampicin and ethambutol in treating opportunist mycobacterial lung diseases and an assessment of *Mycobacterium vaccae* immunotherapy. Thorax. 2008;63:627-34.
52. Andréjak C, Lescure FX, Pukenyte E, et al; Xenopi Group. *Mycobacterium xenopi* pulmonary infections: a multicentric retrospective study of 136 cases in north-east France. Thorax. 2009;64:291-6.
53. Griffith DE, Girard WM, Wallace RJ Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: an analysis of 154 patients. Am Rev Respir Dis. 1993;147:1271.
54. Lindeboom JA, Kuijper EJ, Bruijnesteijn van Coppenraet ES, Lindeboom R, Prins JM. Surgical excision versus antibiotic treatment for nontuberculous mycobacterial cervicofacial lymphadenitis in children: a multicenter, randomized, controlled trial. Clin Infect Dis. 2007;44:1057-64.
55. van Ingen J, van Soolingen D. Cervicofacial lymphadenitis caused by nontuberculous mycobacteria; host, environmental or bacterial factors? Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2011;75:722-3.

Nieuwe richtlijn voor microbiologische diagnostiek van tuberculose

E.J. Kuijper, S. Vainio, M. Scholing, A. van der Zanden, B. Mulder, J. de Steenwinkel, J. van Ingen, G. de Vries, C. Richter, J. Rossen, W. de Lange, M. Mensen, F. Vlaspolder, D. van Soolingen

Trefwoorden

Richtlijn, tuberculose

In 2006 heeft de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) een richtlijn gepubliceerd voor de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose (<http://www.nvmm.nl/richtlijnen>). Deze is in nauwe samenwerking met GGD-artsen tuberculosebestrijding en met afgevaardigden uit de Nederlandse Vereniging Artsen Longziekten en Tuberculose (NVALT), Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot bestrijding der Tuberculose (KNCV), Nederlandse Internisten Vereniging (NIV) en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) tot stand gekomen. De tuberculosediagnostiek in Nederland kreeg verder aandacht tijdens internationale visitaties in 2003 en 2008. Er is een Nationaal Plan van tuberculose bestrijding (2011-2015) opgesteld met een aantal aanbevelingen. Het doel van dit plan is om bij een dalende incidentie van tuberculose toch een optimale tuberculosebestrijding in Nederland na te streven. In dit plan wordt voor gebruik van het juiste inperkingsniveau (BSL₃) en voor een schaalvergroting gepleit. In 2013 is er opnieuw een internationale visitatie gehouden. Het rapport is in mei 2014 bekend geworden. Er wordt gepleit voor de instelling van een officieel nationaal referentielaboratorium en voor de ontwikkeling van een gestructureerd netwerk voor diagnostiek van tuberculose, met een beperkt aantal laboratoria en goede kwaliteitsbewaking, zowel intern als extern.

In 2012 heeft een enthousiaste groep artsen-microbioloog en moleculair microbiologen besloten de richtlijn van 2006 bij te werken, in samenwerking met de hierboven genoemde instanties. Inmiddels is een aantal onderwerpen afgerond, die hieronder worden samengevat. Punten die nog te bespreken zijn maar die geen al te grote veranderingen zullen ondergaan, zijn de laboratoriumtechniek van de interferon-gamma release assay (IGRA), de biologische veiligheid (zie ook "Veilig werken aan betere kwaliteit", april 2012), de samenwerking met GGD en de conventionele kweek van *M. tuberculosis*. Voor de diverse

onderwerpen van de richtlijn zijn subgroepen gevormd die volgens het CBO-richtlijnformaat (<http://www.diliguide.nl/>) de literatuur hebben verzameld van 2007 tot 2013. De kwaliteit van deze artikelen is door werkgroepleden beoordeeld en de geselecteerde artikelen zijn vervolgens gegradeerd naar de mate van het gewicht van bewijs. Tuberculose wordt meestal veroorzaakt door *Mycobacterium tuberculosis*, één van de subspecies van het *M. tuberculosis*-complex. Met de huidige moleculaire technieken kunnen alle subspecies relatief makkelijk worden geïdentificeerd. Andere subspecies dan *M. tuberculosis* zijn de minder vaak gevonden *M. africanum*, *M. bovis*, *M. bovis caprae*, *M. canetti*, *M. oryxis*, *M. bovis* BCG, *M. pinnipedii* en *M. microti*. Het is vooral vanwege de verschillen in de epidemiologie van de mycobacteriën van de diverse subspecies, maar ook in het kader van de iets verschillende gevoeligheid voor pyrazinamide dat een onderscheid van belang is. In 2013 is in Nederland bij ongeveer 850 mensen tuberculose vastgesteld. Dit is een forse daling ten opzichte van 2012, toen 962 patiënten werden gemeld.

Veranderingen in het microscopisch onderzoek

Voor het microscopisch onderzoek van zowel respiratoire als niet-respiratoire materialen is een fluorochroomkleuring de eerste keuze, bij voorkeur de auramine O-rhodamine

Dr. S. Vainio, VUmc, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Amsterdam; drs. M. Scholing, afdeling Medische Microbiologie, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam; dr. B. Mulder en dr. A.G.M. van der Zanden, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Hengelo; dr. J. de Steenwinkel, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Rotterdam; dr. J. van Ingen, Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen; dr. G. de Vries KNCV, Den Haag; dr. C. Richter, afdeling Interne Geneeskunde/Infectieziekten, Rijnstate Ziekenhuis, Arnhem; dr. J. Rossen, afdeling Medische Microbiologie, UMCG, Groningen; dr. W. de Lange, afdeling Longziekten, UMCG, Groningen; drs. M. Mensen, afdeling GGD, Amsterdam; dr. F. Vlaspolder, Laboratorium voor Medische Microbiologie, Maastradziekenhuis Rotterdam; prof. D. van Soolingen, Nationale tuberculose Referentielaboratorium, RIVM.
Correspondentieadres: prof. dr. E.J. Kuijper, LUMC, afdeling Medische Microbiologie, Leiden, e-mail: e.j.kuijper@lumc.nl

B-kleuring. Light-emitting diodes (LED)-gebaseerde fluoresceentiemicroscopie heeft de voorkeur boven de conventionele fluoresceentiemicroscopie met behulp van een kwiklamp. Dit heeft te maken met de langere levensduur van de LED's, de afwezigheid van toxische stoffen en het gemakkelijker microscoperen.¹ Auramine-positieve preparaten hoeven niet langer te worden geconfirmeerd met een Ziehl-Neelsen (ZN)-kleuring, maar bij voorkeur met een nucleïnezuuramplificatietest (NAT)-test voor identificatie van mycobacteriën. Omdat in een aantal studies een directe associatie wordt gelegd tussen mate van positieve microscopie en transmissie van tuberculose, is het gewenst bij de uitslag ook een schatting van de hoeveelheid aanwezige mycobacteriën te rapporteren. Het verdient aanbeveling om in overleg met de lokale GGD de wens voor gradering op direct materiaal in een convenant op te nemen.

De werkgroep vindt dat er bij microscopisch onderzoek altijd een positieve controle moet worden meegenomen en bij drie preparaten of minder ook een negatieve controle. In een systematische review concluderen de onderzoekers dat de microscopie van sputummonsters die zijn voorbehandeld door middel van decontaminatie en concentratie, een gemiddeld hogere sensitiviteit heeft dan niet-voorbehandelde materialen.² De werkgroep heeft deze aanbevelingen overgenomen, anders dan de WHO.³

Moleculaire detectie van *M. tuberculosis*-complex in patiëntmateriaal

Er zijn verschillende NAT's, zoals polymerase chain reaction (PCR), nucleic acid sequence based amplification (NASBA), transcription mediated amplification (TMA) en loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Ook bestaan er verschillende methoden om het geamplificeerde product te detecteren. In Nederland heeft een aantal laboratoria gezamenlijk een IS6110 RT-PCR ontwikkeld en deze test wordt in ons land veel gebruikt.⁴ In de literatuur zijn echter *M. tuberculosis*-stammen vanuit Azië beschreven waarin het IS6110-element ontbreekt. Andere targets zoals bijvoorbeeld het 16S rRNA-, het *rpoB*-, en het *sod*-gen, kunnen ook worden gebruikt voor het detecteren van *M. tuberculosis*, al dan niet in combinatie met IS6110. Het *mpt40*-gen is niet geschikt in Nederland, omdat 8 procent van de stammen in Nederland dit gen mist. Er is weinig tot geen literatuur te vinden over het effect van voorbehandeling (homogeniseren, decontaminatie en concentratie) op de gevoeligheid van de NAT. De commissie concludeert dat NAT zowel op voorbehandeld als niet-voorbehandeld materiaal kan worden uitgevoerd.

De meest gebruikte methoden die sinds 2009 in de literatuur zijn gerapporteerd, betreffen commerciële NAT's Amplified *M. tuberculosis* Direct Test (AMDT, Gen-Probe,

San Diego, CA, USA; een NASBA methode met 16S rRNA als target), de COBAS TaqMan *M. tuberculosis* test (Roche Diagnostic system, Basel, Switzerland; RT-PCR met 16S rRNA gen als target) en de volledig geautomatiseerde Gene Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA; RT-PCR met *M. tuberculosis*-complex specifiek DNA en *rpoB* als targets). Deze drie commerciële testen zijn ook door de FDA goedgekeurd voor respiratoir materiaal. De gevoeligheid van de NAT's voor respiratoire microscopie positief materiaal is 95,6-100 procent (gemiddeld 98,8 procent), maar voor microscopie negatief materiaal aanzienlijk lager (40-88,9 procent; gemiddeld 60,0 procent). Om die reden kan een negatieve NAT niet worden gebruikt om pulmonale tuberculose uit te sluiten. De meeste studies melden een specificiteit van meer dan 95 procent voor zowel microscopisch positief als negatief materiaal. Ook voor niet-respiratoir materiaal worden er geen significante verschillen gevonden tussen de drie FDA-goedgekeurde testen, hoewel de sensitiviteit duidelijker lager ligt dan voor respiratoir materiaal. Vanwege de snelheid wordt het gebruik van NAT vooral aanbevolen voor de diagnostiek van meningitis tuberculosa. Literatuur na 2003 bevat vooral studies bij tuberculeuze meningitis met in-house PCR's die gebruikmaken van verschillende targets, vaak in multiplex- of nested-PCR-opzet. Deze studies melden een gemiddelde gevoeligheid van 65 procent (51 tot 100 procent) en specificiteit van 97 procent (91-100 procent), overeenkomend met een recent gepubliceerde meta-analyse.⁵ De GeneXpert heeft een duidelijk lagere sensitiviteit dan bovengenoemde testen bij tuberculeuze meningitis.⁶

De werkgroep is van mening dat in elk laboratorium de mogelijkheid moet bestaan voor moleculaire citodiagnostiek op *M. tuberculosis*-complex, ook in het weekend. De uitslag van een citoaanvraag moet binnen 48 uur bekend zijn. Net als de in 2013 gepubliceerde aanbevelingen van het ECDC, is de werkgroep van mening dat de snelle moleculaire testen de conventionele diagnostiek en gevoeligheidsbepalingen nog niet kunnen vervangen.⁷ Dit zal in de toekomst waarschijnlijk wel gaan gebeuren, mits de sensitiviteit verbetert. Er zal dan screening van materialen met een moleculaire test plaatsvinden en uitsluitend positieve materialen zullen aan kweek worden onderworpen. Voor uitzonderlijke materialen, zoals van extra-pulmonale sites zal kweek nog steeds worden toegepast.

Detectie van antimicrobiële resistentie van *M. tuberculosis*-complex

In Nederland vertoont ongeveer 12 procent van de *M. tuberculosis*-isolaten een vorm van resistentie voor minstens één van de vier middelen die in de eerste lijn worden gebruikt. Er worden ongeveer 15 tot 20

gevallen van multidrugresistente tuberculose (tegen tenminste INH en rifampicine) per jaar gevonden en er zijn in totaal vier gevallen van extensief resistente tbc (XDR-TB), gevonden, waarbij naast resistentie tegen INH en rifampicine ook resistentie tegen ten minste een aminoglycoside en een fluorochinolon is gedetecteerd. Resistentiebepalingen van *M. tuberculosis* waren tot een tiental jaren geleden uitsluitend fenotypisch van aard. Op dit moment is de Mycobacteria Indicator Growth Indicator (MGIT)-kweektechniek in internationaal verband de standaard-fenotypische resistentiebepaling. Aan de MGIT-kweekbuis is een kritische concentratie van een antibioticum toegevoegd, zodat de groei van een isolaat kan worden vergeleken met groei in een controlebuis zonder antibioticum. Om echter de behandeling bij te kunnen stellen, zijn snellere resistentiebepalingen zeer gewenst. Sinds de resistentiemechanismen in *M. tuberculosis* van isoniazide (INH) en rifampicine bekend werden, zijn er testen ontwikkeld om de meeste mutaties die zijn geassocieerd met resistentie te kunnen aantonen. De meest bekende is de MTBDR_{plus} kit (Hain, Nehren, Duitsland) die kan worden gebruikt om positieve kweken te onderzoeken, maar ook op verdacht klinisch materiaal kan worden toegepast. Er is een tweede versie op de markt gekomen met een verbeterde gevoeligheid. Hoewel de Hain Company ook een reverse line blot kit op de markt heeft gebracht voor de detectie van resistentie tegen fluorochinolonen, aminoglycosiden en ethambutol (MTBDR_{sl}), is de interpretatie van de resultaten nog moeilijk. Het is te verwachten dat ook voor deze test de voorspellende waarden snel bekend zullen worden. De moleculaire testen voor de detectie van resistentiegenen dienen echter altijd geconfirmeerd te worden met de fenotypische gevoeligheidsbepaling.

In 2009 is er een nieuw diagnostisch apparaat op de markt gekomen; de GeneXpert. Met dit apparaat kan op simultane wijze de aanwezigheid van *M. tuberculosis* in sputum (en andere materialen) worden aangetoond en of er sprake is van rifampicine-resistentie. De GeneXpert heeft als voordeel dat alle reagentia al in een cartridge aanwezig zijn en dat het apparaat op semikwantitatieve wijze binnen twee uren een uitslag geeft. Hierbij hoeft sputum in geval van tbc-verdenking slechts vervloeid te worden, waarna het in de cartridge gepipetteerd kan worden voor de automatische analyse. De gevoeligheid van de GeneXpert lijkt wat minder te zijn voor de detectie van *M. tuberculosis*,⁸ maar de negatief-voorspellende waarde voor het aantonen van rifampicine-resistentie is heel hoog,⁹ mits het sputum microscopisch positief is (dus voldoende *M. tuberculosis*-complex aanwezig) en er wordt getest in een omgeving waar rifampicine-resistentie regelmatig voorkomt. De voorspellende waarde van deze test kan sterk worden verhoogd door deze uitsluitend te gebruiken voor patiënten

met een verhoogd risico op rifampicine-resistentie, zoals degenen die eerder zijn behandeld of afkomstig zijn uit een gebied met een hoge prevalentie van MDR-TB.

Moleculaire typeringen

In de laatste twee decennia heeft de moleculaire typering van *M. tuberculosis*-complexisolaten in belangrijke mate bijgedragen aan het bestuderen van de epidemiologie van tuberculose. In het begin van de jaren 90 werden repeterende DNA-sequenties in het genoom van *M. tuberculosis* ontdekt, zoals insertie-element IS6110 en de Direct Repeats. Hierop gebaseerd werd restrictiefragmentlengte-polymorfisme (RFLP)- en de spoligotypering ontwikkeld.¹⁰ Sinds 1993 werd RFLP gebruikt om alle *M. tuberculosis*-complexisolaten in Nederland te typeren ten behoeve van bronopsporings- en contactonderzoek bij GGD. Omdat RFLP-typering technisch moeilijk uitvoerbaar is, werd in Nederland in 2009 de 24-loci “Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)-typering” geïntroduceerd. Dit is ook inmiddels de wereldwijde standaardtypering van *M. tuberculosis* geworden.¹¹ Als definitie voor clustering op grond van VNTR-typering is besloten om uit te gaan van alleen volledig identieke VNTR-patronen. Om de resolutie van DNA-fingerprinting verder te verhogen is enkele jaren geleden begonnen met Whole Genome Sequencing (WGS) en Single Nucleotide Polymorphisms (SNP). Diverse studies hebben aangetoond dat inderdaad een klein aantal mutaties te vinden is in het genoom van isolaten met identieke VNTR-patronen, die gebruikt kunnen worden om afzonderlijke transmissieketens in VNTR-clusters van elkaar te onderscheiden.¹² Naar verwachting is dit de typering van de toekomst, maar dan zal deze techniek beter gestandaardiseerd en de interpretatie vereenvoudigd moeten worden.

Conclusie

De moleculaire testen voor directe diagnostiek, voor identificatie en voor resistentie hebben een belangrijke plaats in de microbiologische laboratoria gekregen maar kunnen de conventionele kweek (nog) niet vervangen. De laboratoria die tuberculosedagnostiek verzorgen zullen over BSL-3-faciliteiten moeten beschikken en aan nog nader vast te stellen minimale kwaliteitseisen moeten voldoen. In de komende periode wordt veel verwacht van de vroege genetische herkenning van resistentie voor de vroege bijsturing van de therapie. De fenotypische resistentiebepalingen zullen altijd nodig blijven om de moleculaire bepalingen te verifiëren. Citodiagnostiek met behulp van moleculaire testen zal in microbiologische laboratoria of centra mogelijk moeten zijn, ook in het weekend. In de landelijke tuberculosebestrijding spelen het Cib en het Nationale tuberculose Referentielaboratorium bij het RIVM een coördinerende rol, maar is de bijdrage vanuit de medisch-microbiologische laboratoria cruciaal.

Referenties

1. World Health Organization (2010) Fluorescent light emitting diode (LED) microscopy for diagnosis of tuberculosis: policy statement.
2. Steingart KR, Ng V, Henry M, et al. Sputum processing methods to improve the sensitivity of smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect Dis.* 2006;6:664-74.
3. WHO, International Standards for Tuberculosis Care (ISTC), 2nd edition, December 2009.
4. Savelkoul PH, Catsburg A, Mulder S, Oostendorp L, Schirm J, Wilke H, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *J Microbiol Methods.* 2006;66:177-80.
5. Solomons RS, van Elsland SL, Visser DH, Hoek KG, Marais BJ, Schoeman JF, et al. Commercial nucleic acid amplification tests in tuberculous meningitis-a meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014 pii: S0732-8893(14)00012-1.
6. Nhu NT, Heemskerck D, Thu do DA, Chau TT, Mai NT, Nghia HD, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for diagnosis of tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol.* 2014;52:226-33.
7. ERLN-TB expert opinion on the use of the rapid molecular assays for the diagnosis of tuberculosis and detection of drug resistance. Stockholm, July 2013, ISBN 978-92-9193-483-6, European Centre for Disease Prevention and Control, 2013.
8. Sohn H, Aero AD, Menzies D, Behr M, Schwartzman K, Alvarez GG, et al. Xpert MTB/RIF testing in a low TB incidence, high-resource setting: limitations in accuracy and clinical impact. *Clin Infect Dis.* 2014 Jan 14. [Epub ahead of print]
9. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014 Jan 21;1:CD009593.
10. Borgdorff MW, van Soolingen D. The re-emergence of tuberculosis: what have we learnt from molecular epidemiology? *Clin Microbiol Infect.* 2013;19:889-901.
11. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Rusch-Gerdes S, Willery E, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4498-510.
12. Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, et al. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis.* 2013;13:110.

Mycobacterium bovis

O. Akkerman

Samenvatting

Mycobacterium bovis is onderdeel van het *Mycobacterium tuberculosis*-complex. Het veroorzaakt niet alleen bij runderen het ziektebeeld tuberculose (tbc), maar kan dit ook bij mensen, huisdieren en in het wild levende dieren veroorzaken. Na een uitgebreid eradicatieprogramma in de jaren 50 van de vorige eeuw wordt de Nederlandse veestapel tegenwoordig rundertuberculosevrij verondersteld. Overdracht van dier op mens en van mens op mens is beschreven en kan zowel aerogeen als door het nuttigen van ongepasteuriseerde melk(producten) verlopen. Dit laatste is met name een belangrijke factor. In Nederland wordt jaarlijks ongeveer 1,4 procent van de humane tuberculose veroorzaakt door *M. bovis*. De kliniek van *M. bovis*-tbc is niet te onderscheiden van *M. tuberculosis*-tbc. Door de intrinsieke resistentie tegen pyrazinamide bestaat de behandeling uit negen maanden isoniazide en rifampicine. Een immuungecompromitteerde status is een risicofactor voor reactivering van *M. bovis*. Derhalve is voor start van immuunsuppressieve therapie een tuberculine-huidtest en/of de interferon-gamma release assay, naast een gerichte anamnese, erg belangrijk.

Trefwoorden

Mycobacterium bovis, tuberculose

Achtergrond

Mycobacterium bovis is onderdeel van het *Mycobacterium tuberculosis*-complex, naast *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canetti* en *M. pinapedii*.¹ De naam *M. bovis* is ontstaan vanuit de oorspronkelijke gedachte dat deze vooral bij runderen werd gevonden.^{2,3} Naast runderen kan *M. bovis* ook bij andere dieren tuberculose (tbc) veroorzaken; dit is zowel bij huisdieren als bij in het wild levende dieren beschreven.⁴ *M. bovis subsp. caprae comb. nov.* is vooral belangrijk bij geiten en wordt als subspecies van *M. bovis* gezien.⁵ *M. bovis* kan ook bij mensen een klinisch niet van *M. tuberculosis* veroorzaakt ziektebeeld onderscheiden, hoewel door de overdracht van *M. bovis* via het maag-darmkanaal wel vaker extrapulmonale tbc optreedt.⁶ Sequencing van het *M. bovis* genoom laat zien dat deze minder gen bevat dan het genoom van *M. tuberculosis* en waarschijnlijk vanuit een gedeelde voorloper is geëvolueerd.⁷ Algemeen wordt nu aangenomen dat er twee

aparte stambomen ('lineages') van mycobacteriën zijn ontstaan uit een voorloper van het *M. tuberculosis*-complex. In een van de lijnen zit *M. tuberculosis* en in de andere lijn onder andere *M. bovis*, maar ook een *M. tuberculosis*-stam van de humane East-African-Indian-populatie (EAI). Deze humane populatie is ontstaan als een van de zeven populaties die vanuit de eerste mensen in Afrika over de wereld zijn verspreid, circa 40.000 tot 50.000 jaar geleden. Vermoedelijk is ruim 20.000 jaar geleden de besmetting van mens op vee met *M. tuberculosis* van de EAI-populatie overgegaan. Vanuit deze dierlijke (zoönotische) populatie zijn de dierlijke *Mycobacterium*-species van het *M. tuberculosis*-complex ontstaan.^{1,5}

Transmissie

M. bovis wordt beschouwd als een zoönose, waarvan dieren het belangrijkste reservoir voor transmissie zijn, dit in tegenstelling tot *M. tuberculosis*, waarvan de mens voornamelijk het reservoir is.^{5,8} In de Europese Unie wordt daarom een streng screeningsbeleid gevoerd op tuberculose bij de veestapel. De lidstaten waar het vee nog niet vrij is van tuberculose zijn bekend.⁹ In Nederland wordt verondersteld dat de veestapel *M. bovis*-vrij is, maar er zijn de laatste jaren wel incidenteel uitbraken geweest. Humane tuberculose door *M. bovis* (*M. bovis*-tbc) dat wordt veroorzaakt door direct contact met vee, is in Nederland vrijwel verdwenen; er is geen relatie tussen uitbraken van boviene tuberculose bij vee en humane *M. bovis* tbc.¹⁰ In Groot-Brittannië is sinds 1990 maar eenmaal *M. bovis*-tbc door contact met geïnfecteerd vee vastgesteld.⁴ Wel een risicofactor voor het krijgen van *M. bovis*-tbc is het drinken van ongepasteuriseerde melk. Hoewel het pasteuriseren van melk in Nederland verplicht is, wordt in de Verenigde Staten het nuttigen van ongepasteuriseerde melkproducten nog steeds als de belangrijkste risicofactor gezien, met name het eten van ongepasteuriseerde kaasproducten uit Mexico.^{11,12}

Correspondentieadres: O. Akkerman, Tuberculosecentrum Beatrixoord, Universitair Medisch Centrum Groningen, Haren, e-mail: o.w.akkerman@umcg.nl.

M. bovis-tbc veroorzaakt door contact met andere dieren dan het rund, als de transmissie van *M. bovis* van hert op jager, is beschreven in de westerse wereld.¹³ Wereldwijd zijn de das in Groot-Brittannië, het edelhert in Groot-Brittannië en Ierland, de voskoesoe (een buideldier) en de fret in Nieuw-Zeeland, de Afrikaanse Kaapse buffel in Zuid-Afrika, de Kafue lechwe (een antilope) in Afrika, de Noord-Amerikaanse bizon in Canada en het witstaarthert in de Verenigde Staten bekende gastheren voor *M. bovis*.^{12,14} Beschreven clusters van *M. bovis*-tbc bij mensen laten mogelijk bewijs zien van transmissie van mens tot mens.^{15,16} Individuen met een verlaagde immuniteit (bijvoorbeeld mensen met hiv) vormen een risicogroep.^{17,18} In Nederland moet rekening worden gehouden met de kans op reactivering bij patiënten die bijvoorbeeld TNF-alfablokkerende medicatie krijgen.¹⁰

Epidemiologie

Zoals hierboven beschreven is het nuttigen van ongepasteuriseerde melkproducten een van de risicofactoren voor het verkrijgen van *M. bovis*-tbc. Nadat het pasteuriseren van melk in 1940 verplicht werd gesteld in Nederland, daalde het percentage tbc door *M. bovis* van 11 procent in 1938, naar 1,5-2 procent in 1952, tot 1,4 procent in de afgelopen jaren.^{10,19,20}

Het percentage *M. bovis*-tbc bij mensen in de Verenigde Staten ligt ook rond de 1,4 procent.⁸ In Groot-Brittannië ligt dit percentage tussen de 0,5 procent en 1,5 procent.⁴ Recent is de epidemiologie van besmettingen met *M. bovis* in Nederland in de jaren 1993-2007 beschreven. Hoewel in de onderzochte periode het aantal autochtone Nederlanders in de meerderheid was (59,7 procent) nam de proportie van buiten Nederland geboren patiënten geleidelijk toe.¹⁰

Pathogenese

De pathogenese van *M. bovis*-tbc bij mensen verschilt niet van de pathogenese van *M. tuberculosis*-tbc. Na inademing of inslikken van *M. bovis* ontstaat er binnen enkele maanden een primair complex in de long of de dunne darm afhankelijk van de porte d'entree. Van hieruit kan er hematogene verspreiding ontstaan. De meeste besmettingen resulteren niet direct in een actieve ziekte, maar lokaal in een granulomateuze, inflammatoire reactie.

Tijdens een besmetting worden de mycobacteriën met name gefagocyteerd in mononucleaire fagocyten en dendritische cellen. Intracellulair doden van de mycobacteriën kan indien de vacuole van de fagocyt fuseert met het lysosoom. Indien deze fusie geblokkeerd kan worden door de mycobacterie, hetgeen veel wildtypemycobacteriën kunnen, dan kan het doden worden gestopt. Indien dit laatste gebeurt, resulteert dat in het persisteren van de mycobacterie in de macrofaag. Deze is dan ook de primaire gastheercel voor een mycobacteriële infectie. De macrofaag verspreidt cytokinen, die een belangrijke rol spelen in het

reguleren van andere afweercellen voor het vormen van een granuloom.

Zo'n granuloom is uiteindelijk het resultaat van een complexe immunoreactie van de gastheer. Een granuloom kan door het vormen van een necrotisch centrum zorgen voor een plaats waar levende maar slapende ('dormant') mycobacteriën kunnen persisteren. Deze persisterende mycobacteriën verkeren in een lage metabole toestand door expressie van genen onder invloed van het immuunsysteem van de gastheer. Als die immunologische druk door CD4+- en CD8+-positieve T-lymfocyten afneemt door afname van de TNF-alfa- en IL-2-productie kan expressie van deze genen weer reduceren, waardoor de mycobacteriën weer metabool actief worden en gaan repliceren: tuberculose kan dan reactiveren.²¹ Het risico is met name toegenomen bij mensen met een falend immuunsysteem, zoals bij ouderen, bij hiv-infectie, diabetes mellitus, alcoholgebruik en bij medicatiegebruik die het immuunsysteem onderdrukt. De pathogenese bij dieren is analoog aan die bij mensen.¹²

Kliniek

De kliniek van *M. bovis*-tbc bij mensen is doorgaans niet te onderscheiden van *M. tuberculosis*-tbc. Voor een verdere beschrijving hiervan wordt verwezen naar het artikel van Altena en Richter dat 10 jaar geleden is gepubliceerd in dit tijdschrift. In Nederland gaat het in bijna 60 procent (58,9 procent) van de patiënten om een extrapulmonale vorm van tuberculose, waarbij de meest voorkomende locaties de halsklieren, de meningen, het maag-darmkanaal en de huid zijn.^{10,22} Dit percentage is veel hoger dan bij *M. tuberculosis*-tbc. De oorzaak hiervan is niet volledig duidelijk.

Diagnostiek

De gouden standaard voor de diagnostiek naar *M. bovis*-tbc blijft de mycobacteriële kweek. Middels PCR kan vervolgens worden vastgesteld of het een mycobacteriespecies betreft van het *M. tuberculosis*-complex. Nadere determinatie gebeurt in Nederland via het RIVM, middels de GenoType® MTBC van Hain Lifescience.

M. bovis is intrinsiek resistent tegen pyrazinamide. De positief voorspellende waarde voor *M. bovis* in het geval van pyrazinamide-resistentie is echter laag.²³

Behandeling

Door de eerdergenoemde intrinsieke resistentie tegen pyrazinamide bestaat de standaardbehandeling uit isoniazide en rifampicine. Bij aanvang van de therapie is het verstandig om tevens ethambutol te starten, omdat resistentie tegen isoniazide beschreven is.²⁴ Er dienen echter wel gevoeligheidstesten gedaan te worden en afhankelijk van deze resultaten kan de behandeling aangepast worden. De duur van de behandeling is normaal gesproken negen maanden.²⁴

Controlemaatregelen

In veel landen lopen programma's om de veestapel in de betreffende landen *M. bovis*-vrij te krijgen en of te houden. Deze programma's zijn gericht op het voorkomen van *M. bovis*-tbc bij mensen. Voor veel landen is echter ook de productie en export van een *M. bovis*-vrije veestapel zeer belangrijk en een goede reden om het vee te testen op *M. bovis*.

In Nederland is in 1951 gestart met een programma tot eradicatie van rundertuberculose, omdat circa 30 procent van de rundveebedrijven besmet was met rundertuberculose. Dit eradicatieprogramma hield in dat jaarlijks elke veestapel in Nederland met tuberculine getest werd en positieve dieren afgevoerd werden. Binnen enkele jaren was het percentage besmette rundveebedrijven gedaald tot enkele procenten. Nu wordt binnen de EU Nederland beschouwd als een rundertuberculosevrij land. Om deze status te behouden mag er bij niet meer dan 0,1 procent van alle bedrijven rundertuberculose worden vastgesteld.²⁵ Om reactivatie van *M. bovis*-tbc bij mensen te voorkomen, zou hierop moeten worden gescreend voordat immuun-suppressieve therapieën, zoals TNF-alfablokkers, worden gestart.¹⁰ Screening zou naast de tuberculinehuidtest en/of interferon-gamma release assay ook moeten bestaan uit een gedegen anamnese, omdat de twee immunologische testen net als bij *M. tuberculosis*-tbc een fout-negatieve uitslag kunnen geven bij immuungecompromitteerden.^{26,27}

Abstract

Mycobacterium bovis is part of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Not only does it cause tuberculosis in cattle, but also in humans, domestic animals, and wild animals. After a thorough eradication program in the middle of the 20th century the Dutch livestock is currently bovine TBC free.

M. bovis causes approximately 1.4 procent of the human tuberculosis in the Netherlands each year. In humans the signs and symptoms of tuberculosis caused by *M. bovis* cannot be distinguished from the ones caused by *M. tuberculosis*. Due to its intrinsic resistance against pyrazinamid the treatment consists of isoniazid and rifampicin for nine months. Transmission between humans and animals and between humans mutually has been described and can be both through the consumption of unpasteurized dairy products and by inhalation of infected aerosols.

The largest risk for reactivation of *M. bovis* is if a person is immune compromised. Therefore screening for *M. bovis* infection both by thorough anamnesis and by the tuberculin skin test and or an interferon gamma release assay is highly recommendable.

Dankbetuigingen

Prof. dr. T.S. van der Werf, longarts, afdeling Longziekten en tuberculose en hoofd afdeling Infectiologie, Universitair

Medisch Centrum Groningen en drs. W.C.M. de Lange, longarts Tuberculosecentrum Beatrixoord, afdeling longziekten en tuberculose, Universitair Medisch Centrum Groningen, dank ik beiden voor het kritisch becommentariëren van het manuscript. Miranda van Kamst, analiste, tuberculose referentielaboratorium, RIVM te Bilthoven, dank ik voor het aanleveren van de informatie over de determinatie KIT, die door het RIVM wordt gebruikt.

Referenties

1. Wirth T, Hildebrand F, Allix-Beguec C, et al. Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000160.
2. Smith T. A comparative study of bovine tubercle bacilli and of human bacilli from sputum. *J Exp Med.* 1898;3:451-511.
3. Francis J. The work of the British royal commission on tuberculosis, 1901-1911. *Tubercle.* 1959;40:124-32.
4. de la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the united kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb).* 2006;86:77-109.
5. Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:537-44.
6. Durr S, Muller B, Alonso S, et al. Differences in primary sites of infection between zoonotic and human tuberculosis: Results from a worldwide systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2399.
7. Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, et al. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(13):7877-82.
8. Hlavsa MC, Moonan PK, Cowan LS, et al. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. *Clin Infect Dis.* 2008;47:168-75.
9. The Bovine tuberculosis subgroup of the Task Force on monitoring animal disease eradication. Working document on eradication of bovine tuberculosis in the EU. 2003.
10. Majoer CJ, Magis-Escurra C, van Ingen J, Boeree MJ, van Soolingen D. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, the Netherlands, 1993-2007. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:457-63.
11. Moonan PK, Chatterjee SG, Lobue PA. The molecular epidemiology of human and zoonotic *Mycobacterium bovis*: The intersection between veterinary medicine and public health. *Prev Vet Med.* 2009;88:226-7.
12. Neill SD, Pollock JM, Bryson DB, Hanna J. Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Vet Microbiol.* 1994;40:41-52.
13. Fanning A, Edwards S. *Mycobacterium bovis* infection in human beings in contact with elk (*cervus elaphus*) in alberta, canada. *Lancet.* 1991;338:1253-5.
14. de Lisle GW, Mackintosh CG, Bengis RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech.* 2001;20:86-111.
15. Evans JT, Smith EG, Banerjee A, et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: Evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet.* 2007;369:1270-6.
16. Akkerman O, van der Loo K, Nijmeijer D, et al. *Mycobacterium bovis* infection in a young dutch adult: Transmission from an elderly human source? *Med Microbiol Immunol.* 2012;201:397-400.
17. Dankner WM, Waecker NJ, Essey MA, Moser K, Thompson M, Davis CE. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: A clinico-epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore).* 1993;72:11-37.
18. Rivero A, Marquez M, Santos J, et al. High rate of tuberculosis re-infection during a nosocomial outbreak of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clin Infect Dis.* 2001;32:159-61.
19. Ruys AC. Bovine tuberculose bij den mensch in Nederland. 1938;81:4725.

20. Ruys AC. De bestrijding van de bovine tuberculose en de veranderingen in het epidemiologische beeld der tuberculose. 1952;96:676.
21. van Altena R, Duggirala S, Groschel MI, van der Werf TS. Immunology in tuberculosis: Challenges in monitoring of disease activity and identifying correlates of protection. *Curr Pharm Des.* 2011;17:2853-62.
22. Wedlock DN, Skinner MA, de Lisle GW, Buddle BM. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 2002;4:471-80.
23. de Jong BC, Onipede A, Pym AS, et al. Does resistance to pyrazinamide accurately indicate the presence of *Mycobacterium bovis*? *J Clin Microbiol.* 2005;43:3530-2.
24. McLaughlin AM, Gibbons N, Fitzgibbon M, et al. Primary isoniazid resistance in *Mycobacterium bovis* disease: A prospect of concern. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186:110-1.
25. H.J.W. van Roermund, M.A.P.M. van Asseldonk, E.A.J. Fischer, R.B.M. Huirne, M.C.M. de Jong. Modelstudie surveillance rundertuberculose. epidemiologische en economische evaluatie van detectiemethoden. 2003; ID-Lelystad project: 870.47401.00/2041547000.
26. Richeldi L, Losi M, D'Amico R, et al. Performance of tests for latent tuberculosis in different groups of immunocompromised patients. *Chest.* 2009;136:198-204.
27. Klein M, Jarosova K, Forejtova S, et al. Quantiferon TB gold and tuberculin skin tests for the detection of latent tuberculosis infection in patients treated with tumour necrosis factor alpha blocking agents. *Clin Exp Rheumatol.* 2013;31:111-7.

INGEZONDEN

Teske Schoffelen wint Dutch ECCMID Award 2014

J.W. Mouton, E.J. Kuijper, F.H. van Tiel, A. Voss

Op de 'Hollandse Avond' op de ECCMID 2014 in Barcelona werden de ECCMID-awards uitgereikt voor de beste Nederlandse inzendingen. Na een wetenschappelijk programma waarbij de nieuwste ontwikkelingen werden samengevat door prof. dr. Johan Mouton (Emergence of resistance, what was hot at ECCMID) and prof. dr. Jan Prins (Therapeutic challenges and antibiotic stewardship, news from ECCMID) werd de spanning opgevoerd met een algemeen overzicht van de Nederlandse inzendingen. Er waren 134 inzendingen waarbij invited speakers niet zijn meegeteld: 25 orals, 85 posters en 24 e-posters. Een respectabel aantal, waarbij Nederland op de achtste plaats staat wat betreft het aantal inzendingen en geaccepteerde abstracts. Het was een hele taak voor de jury, bestaande uit prof. Mouton (voorzitter), prof. dr. Andreas Voss, dr. Frank van Tiel en prof. dr. Ed Kuijper om hierover een gewogen oordeel te geven. Gedurende het hele congres werden alle posters bezichtigd en presentaties beluisterd, waarna twee scores werden toegekend van 1 tot 6, één voor inhoud en één voor presentatie. De top 10 van de gemiddelde scores werd vervolgens uitgebreid geëvalueerd, waarbij het opvallend was hoe eenduidig de scores tussen de verschillende juryleden waren. Inzendingen kwamen uit het hele land, met een opvallend hoge aanwezigheid uit Amsterdam, met name het AMC, gevolgd door Utrecht en Leiden. Dat ook in de wetenschap de vrouwelijke sekse de overhand krijgt, bleek uit de verdeling: 73 eerste auteurs waren vrouw en

61 man. Tijdens de uitreiking kregen als eerste de zeven 'runners-up', in willekeurige volgorde, de gelegenheid om ad hoc in een paar minuten hun werk samen te vatten voor de meer dan 150 aanwezigen. Opvallend was de presentatie van dr. Merel Langelaar (IGZ), die tijdens een sessie over de aanpak van resistentie beschreef hoe de inspectie in Nederland een proactieve rol speelt. De vragen en opmerkingen na de voordracht in de plenaire sessie gaven duidelijk aan dat Nederland met een open aanpak een gidsfunctie vervult. Ook de drie prijswinnaars vatten hun werk samen in een korte presentatie: Jacqueline Lankelma (AMC), die haar twee posters over de rol van microbiota in de darm toelichtte (derde prijs); Maris Arcilla (Erasmus MC) en Jarne van Hattem (AMC), die een gedeeld auteurschap hadden en de rol van resistentietoename door reizen toelichtten (tweede prijs). Ten slotte met drie posters, Teske Schoffelen (Radboudumc), die verschillende facetten van de Q-koortsdiagnostiek en immuunrespons toelichtte. De avond werd besloten met een hapje en een drankje en kan zeer geslaagd genoemd worden.

De Hollandse avond werd georganiseerd onder auspiciën van de NVMM door Congress Care en werd mede mogelijk gemaakt door AstraZeneca, Astellas, Gilead en Becton Dickinson.

Serologiecursus 2013 “Antistof, het verborgen goud”

A.T.R. Tholen



Deelnemers luisteren naar de presentatie van Jean-Luc Murk over flavivirussen.

Boos werd ik bij een van de arts-microbiologen op het matje geroepen. Een heel betoog, wat ik wel niet dacht. Goud geld verdienen met diagnostiek bij zieke patiënten, was dat de motivatie voor een cursus Serologie? “Antistof, het verborgen goud”, veel stof wierp de titel wel op.

Serum, goudkleurig toch? Of vindt u het meer geel? De informatie die je allemaal uit antistoffen kunt halen, goud! Soms wat verborgen, dat dan weer wel. Er moeten heel wat trucs worden uitgehaald om te vinden wat je zoekt. Elisa, captured Elisa's, immunofluorescent assays, Jean-Luc Murk begon de cursus met Basistechnieken in de serologie. Dat was de aftrap naar drie dagen intensieve les.

De cursus werd gehouden in de Nieuwe Liefde op de DaCostakade te Amsterdam. Een locatie die niet heel gemakkelijk te bereiken was, maar wel een kleine parel in de stad. Met de hoge ramen, brede gang en ruime trap schijnt het licht met gemak naar binnen, en dat is wat je nodig hebt in die sombere novembermaand.

Dag 1: lean management, assays, validaties en discussie

De eerste dag gaf een breed overzicht van management en basiskennis. Hoe bied je bijvoorbeeld hoge kwaliteit voor een lage prijs? Daar gaat LEAN-management over. LEAN staat voor ‘weg met waste’. Een illustratieve film over de bevoorrading van maaltijden op het eiland Rochester (vlakbij New York) na orkaan Sandy maakte duidelijk dat logistiek een sleutelrol speelt in een organisatie.

Het volgende onderwerp betrof validaties van serologische assays. Gebruikmakend van de CLSI-richtlijnen werd duidelijk dat het bijna onmogelijk is om aan al die voorwaarden te voldoen. Alleen al omdat men vaak niet beschikt over de aantallen monsters die deze richtlijn

Correspondentieadres: A.T.R. Tholen, AIOS medische microbiologie, VU Medisch Centrum, Amsterdam, e-mail: a.tholen@vumc.nl.

aangeeft. Greet Boland (UMCU) en Martin Schutte lieten dan ook zien dat zij vanwege de validaties van de Immulite en Liason XL (EMC) moeite hadden met het verzamelen van de juiste hoeveelheid monsters. Er is uiteindelijk dan ook nog steeds geen consensus over de manier waarop serologische assays moeten worden gevalideerd. Om daar meer duidelijkheid over te krijgen zou er meer veldwerk moeten worden verricht, om op basis daarvan een praktische richtlijn te maken.

De dag werd afgesloten met een discussie onder leiding van Peter Kabel. Cursisten, onder wie infectiologen, arts-microbioloog, analisten en fabrikanten namen deel. Op de stelling dat infectieziekteserologie over zeven jaar wel eens bij de patiënt thuis zou horen, reageerde een van de fabrikanten met een wel heel merkwaardig nieuwtje: sinds kort kun je in de Verenigde Staten thuis testen op hiv! Gekke Amerikanen... of straks heel gewoon?

Dag 2: serologie, infectieziekten, toxoplasmose en flavivirussen

Op dag twee startte Wim Ang met een bijdrage over syfilis. Terwijl je bij hem altijd het idee krijgt dat het uiteindelijk veel minder ingewikkeld is dan het lijkt, blijkt het bij een andere spirocheet, *Borrelia*, veel lastiger. Wat zijn er veel manieren van diagnostiek en waar blijft dan toch die gouden standaard?

Voor zowel syfilis als *Borrelia* geldt dat serologie een hoeksteen is in de diagnostiek. Dit geldt zeker wanneer sprake is van een neurologisch beeld waarbij zowel liquor als serum serologisch moeten worden getest en PCR alleen neuro-lues of -borreliose niet uitsluit.

Vervolgens waren er bijdragen over infectieziekten, waaronder hepatitis E, waarover ondergetekende zelf mocht vertellen. In het kort gezegd vonden wij in onze studie, bij niet-ernstig immuungecompromitteerde patiënten met acute hepatitis, even vaak hepatitis A als hepatitis E. Hoe de diagnose bij deze patiënten zou moeten worden gesteld, is echter nog niet geheel duidelijk. De vraag is dan ook of serologie alleen voldoende is of dat er standaard ook een PCR op bloed zou moeten worden verricht.

Van spirocheet, virus naar parasiet. Tom van Gool en toxoplasmose, je zou bijna geen rood vlees meer aanraken, terwijl het vaak zo lekker en sappig is. Hij nam ons mee in zijn leerzame casuïstiek en vertelde dat het nutteloos is om toxoplasmose-serologie te herhalen behalve bij een initieel IgM-positieve en IgG-negatieve/zwak-positieve patiënt. (Bij onduidelijkheid zou je hem kunnen bellen).

De dag werd afgesloten door Jean-Luc Murk, met een bijdrage over flavivirussen. Wist u dat chikungunya, ondanks dat de symptomen zo op dengue lijken, helemaal geen flavivirus is? Japanse encefalitis, westnijlvirus en hepatitis C zijn dat juist weer wel. Bij de diagnostiek zijn een goede reisanamnese, klinische symptomen en eerste ziektedag van absoluut belang om de resultaten te kunnen

Ann Vossen geeft uitleg over de rol van serologie bij de diagnostiek van CMV en EBV.



De serre met onder meer de stands van sponsoren.



interpreteren. Daarnaast raadde Jean-Luc Murk aan om bij verdenking tegelijkertijd op meerdere flavivirussen te testen, omdat onderling veel kruisreactiviteit bestaat.

Dag 3: bekende sprekers

Dag drie was met bekende sprekers als Ann Vossen, Hans Zaaijer en Anne Wensing allesbehalve saai. Hans Zaaijer kwam met bijzondere casuïstiek waarbij hij onderscheid maakte tussen verschillende stadia van hepatitis B. Deze noemde hij ‘geklaard’ indien het virus weg was, ‘latent’ indien patiënt HBsAg- en DNA-negatief maar hepatocytens-positief was en ‘occult’ als patiënt HBsAg-negatief en DNA-positief was. Bovendien stelde hij dat een patiënt met doorgemaakte hepatitis B negatief kan worden voor én HBcore én HBe. Nadat Hans Zaaijer iedereen nog wat valkuilen in de infectieziekte serologie had meegegeven, gingen de meeste deelnemers met een voldaan gevoel naar huis.

Evaluatie

Het was een zeer geslaagde en informatieve gouden cursus. Uit de evaluatie kwam naar voren dat niemand de cursus had willen missen. Ook eerstgenoemde microbioloog weet antistoffen nu nog meer te waarderen. Op naar de volgende Serologiecursus, haal eruit wat erin zit!

“The right drug for every bug; optimizing antimicrobial therapy through professional symbiosis” - Verslag van gezamenlijk symposium van NVAMM en VAZA

L. Andrews, M. van Doorn-Schepens, L. Favie, L. Franken, I. Maat, M. McCall, I. Overdevest, L. Reubsaet

Op 27 februari jl. organiseerde de Nederlandse Vereniging voor AIOS Medische Microbiologie (NVAMM) het jaarlijkse symposium, ditmaal samen met de Vereniging van Apothekers in opleiding tot Ziekenhuisapotheker (VAZA). Het symposium stond in het teken van intercollegiale samenwerking en behandelde de onderwerpen ‘antimicrobial stewardship’, ‘ontwikkeling van nieuwe antibiotica’ en ‘therapeutic drug management’. Het symposium werd gehouden in de conferentiezalen van Artis te Amsterdam. In dit artikel leest u een samenvatting van de voordrachten.

Antimicrobial stewardship

Stewardship in Nederland

Dr. Stephanie Natsch (ziekenhuisapotheker Radboudumc Nijmegen en bestuurslid van de SWAB) opende het

Dr. Stephanie Natsch



symposium met een veelbesproken onderwerp in diverse ziekenhuizen: antibiotic stewardship. Toenemende resistentiepercentages vragen om een goede samenwerking tussen onder meer de arts-microbioloog en de ziekenhuis-apotheker. In opdracht van de IGZ heeft de SWAB een visiedocument en richtlijnen opgesteld voor het invoeren van A-teams. Taken van een A-team zijn niet alleen het handhaven van een stringent antibioticabeleid maar ook het uitvoeren van audits, interveniëren en terugkoppelen van resultaten. Voor deze A-teamprogramma's bestaat een goede onderbouwing maar er blijft behoefte aan meer onderzoek om de klinische effecten van A-teams te kunnen meten. Genoeg te doen dus voor arts-microbiologen en ziekenhuisapothekers.

DUMAS-studie

Drs. Jonne Sikkens (PhD afdeling Infectiologie, VUmc, Amsterdam) presenteerde de veelbelovende resultaten van de DUMAS (Dutch Unique Method for Antimicrobial Stewardship) -studie. Het DUMAS-project heeft als doel het voorschrijven van antimicrobiële middelen in het ziekenhuis te verbeteren. Hierbij wordt een nieuwe, unieke methode gebruikt. Deze zogeheten ‘Participatory Action Research’ (PAR) -methode betreft gedrags-, culturele en organisatorische aspecten bij het uitvoeren van ‘antimicrobial stewardship’. Eerst wordt op een afdeling geïnventariseerd in welke mate het voorschrijven onjuist

L. Andrews, L. Franken, M. McCall, Erasmus Medisch Centrum Rotterdam; M. van Doorn-Schepens, VU Medisch Centrum Amsterdam; L. Favie, L. Reubsaet, Universitair Medisch Centrum Utrecht; I. Maat, RadboudUMC Nijmegen.
Correspondentieadres: I. Overdevest, St. Elisabeth Ziekenhuis Tilburg, e-mail: itmaoverdevest@gmail.com.

Drs. Jonne Sikkens



Dr. Benedikt Huttner



is en welke oorzaken hieraan ten grondslag liggen. Hierna wordt een plan opgesteld met interventies om het voorschrijven te verbeteren. Op de twee pilotafdelingen is het voorschrijven van antimicrobiële middelen significant verbeterd en is het gebruik van antimicrobiële middelen afgenomen. De implementatie van de PAR-methode is arbeidsintensief maar heeft de potentie om 'antimicrobial stewardship' tot een succes te maken.

Stewardship in de poliklinische setting

De derde spreker was dr. Benedikt Huttner (infectioloog, Geneva University, Zwitserland), die in zijn voordracht 'Outpatient antibiotic stewardship' de aandacht vestigde op antibioticagebruik door niet opgenomen patiënten. Het overgrote deel van de antibiotica die worden voorgeschreven gaat naar niet-opgenomen patiënten. Deze antibiotica hebben vaak breed een spectrum en de indicaties zijn soms dubieus. De recente verspreiding van multiresistente gramnegatieve staven in de algemene bevolking heeft de aandacht gevestigd op het belang van 'antibiotic stewardship' op de polikliniek. De wereldwijde variatie in antibioticabeleid is groot, maar in veel landen worden campagnes opgezet om de aandacht te vestigen op overmatig antibioticagebruik, zowel bij publiek als bij artsen. Het doel van antibiotic stewardship is ook om erachter te komen wat de beste interventies zijn om antibioticagebruik via de polikliniek te verminderen.

Nieuwe antibiotica

Antivirale middelen

Na de lunchpauze sprak prof. dr. Charles Boucher (arts-microbioloog, Erasmus MC, Rotterdam) over onderzoek naar en ontwikkeling van nieuwe antivirale middelen. Als voorbeeld nam hij de ontwikkelingscyclus van anti-hivmiddelen. Door de grote patiëntenpopulatie met het vooruitzicht op levenslange behandeling vormde dit een aantrekkelijke afzetmarkt voor de farmaceutische industrie. Het uitgangspunt bij de ontwikkeling van anti-hivmiddelen veranderde in de jaren van virologische en immunologische eindpunten naar bijwerkingenprofiel, resistentieontwikkeling en uiteindelijk compliance en langetermijnoverleving. Inmiddels lijkt er weinig ruimte meer voor verdere optimalisatie en beginnen generieke middelen de markt over te nemen. De ontwikkeling van anti-HCV-middelen loopt niet ver achter en inmiddels kan HCV genezen worden. Op dit moment wordt er gewerkt aan een genezing voor hiv, waarbij benadering met genterapie wordt onderzocht. Prof. Boucher eindigde met een verlanglijst: nieuwe middelen tegen influenza en breedspectrum antivirale middelen (polymeraseremmers).

Ontwikkeling van nieuwe antibiotica

Als laatste spreker voor de middagpauze mochten we prof. dr. Marc Bonten (arts-microbioloog, UMCU, Utrecht)



verwelkomen met een presentatie over de ontwikkeling van nieuwe antibiotica. De noodzaak van nieuwe antibiotica wordt tot op het hoogste politieke niveau erkend, maar er zijn nog maar weinig farmaceutische bedrijven die nieuwe antibiotica ontwikkelen. Het ontwikkelingstraject van nieuwe antibiotica is lang, duur en risicovol. Om al deze redenen hebben de Europese overheden en farmaceutische bedrijven in 2011 de handen ineengeslagen om de ontwikkeling en evaluatie van nieuwe antibiotica te stimuleren. De achtergronden en de huidige status van dit initiatief ("New Drugs for Bad Bugs, ND4BB") werden besproken.

Therapeutic drug management

Therapeutic drug management bij antifungale azolen

Dr. Roger Brüggemann (ziekenhuisapotheker, Radboudumc, Nijmegen) hield een presentatie met als titel: "Therapeutic drug monitoring of azole antifungals: useless or of absolute need?". De voordracht begon met de vraag of het publiek Therapeutic drug management (TDM) voor antifungale middelen toepast in bepaalde patiëntengroepen. Slechts een kleine minderheid bevestigde TDM voor antifungale middelen uit te voeren. Hierna werden de farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van verschillende antifungale middelen besproken, waarbij naar voren kwam dat TDM wel degelijk zinvol is. Daarnaast werden praktische adviezen gegeven om dit ook daadwerkelijk uit te voeren.

Therapeutic drug management bij aminoglycosiden

Als laatste spreker betrad prof. dr. Daan Touw (ziekenhuisapotheker, UMCG, Groningen) het podium voor een lezing over Therapeutic drug management (TDM) van aminoglycosiden, een tak van sport die in den lande door zowel artsen-microbioloog als ziekenhuisapothekers beoefend wordt. TDM van aminoglycosiden is een waardevolle toevoeging bij de behandeling met deze antibiotica vanwege de grote inter- en intrapatiëntvariabiliteit en de nauwkeurig vastgestelde targets voor effectiviteit en (het voorkomen van) toxiciteit. Prof. dr. Touw demonstreerde dat een proactieve benadering van TDM bij aminoglycosiden bijdraagt aan de effectiviteit van de behandeling en vermindering van de mortaliteit, beperking van de toxiciteit en, door verkorting van de ligduur, tevens een kostenbesparing met zich meebrengt.

Na afloop van het inhoudelijke programma en tijdens de pauzes werd veel gebruikgemaakt van de mogelijkheden tot interactie tussen ziekenhuisapothekers (i.o.) en artsen-microbioloog (i.o.). Voor beide groepen was de opkomst hoog, waardoor de zaal met 200 bezoekers helemaal vol zat. De deelnemers waren bijzonder enthousiast over het programma en de commissie ziet dit symposium dan ook als een goede start van een vruchtbare samenwerking tussen beide beroepsgroepen.

Prof. dr. Daan Touw



Prevention of healthcare associated Staphylococcus aureus infections

L.G.M. Bode

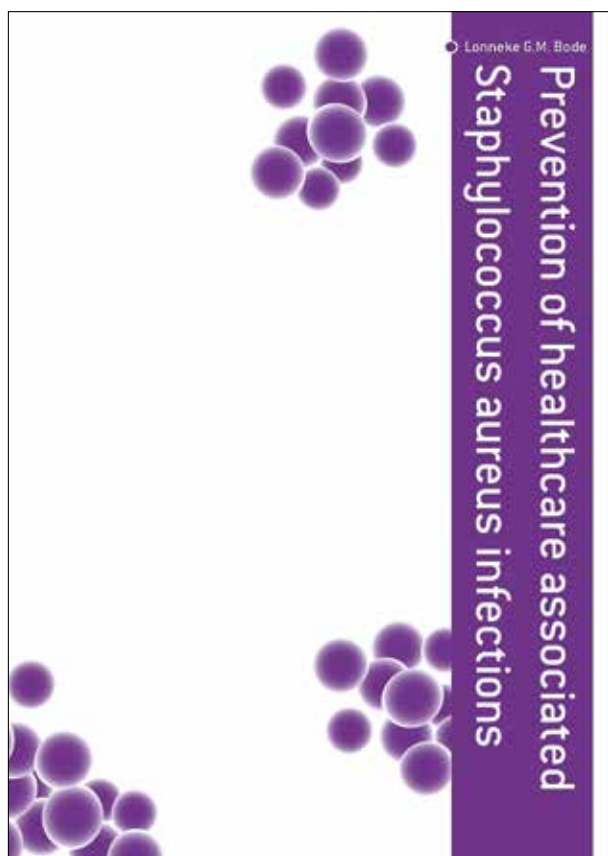
Het doel van dit proefschrift was om bij te dragen aan de kennis en de preventie van nosocomiale *S. aureus*-infecties. Hiertoe hebben we een gerandomiseerd, placebo-gecontroleerd onderzoek uitgevoerd in vijf Nederlandse ziekenhuizen (STEP-studie). Patiënten met een hoog risico op *S. aureus*-infecties werden bij opname gescreend op dragerschap met PCR. Draggers werden binnen 24 uur na opname gerandomiseerd, en kregen mupirocine-zalf en chloorhexidine-zeep, ofwel placebozalf en placebozeep, gedurende vijf dagen. De incidentie van nosocomiale *S. aureus*-infecties tot zes weken na ontslag was bijna 60 procent lager in de mupirocine/chloorhexidine-groep dan in de placebogroep. Postoperatieve

wondinfecties waren met bijna 80 procent gereduceerd. De opnameduur werd met circa twee dagen bekort.

Voor het effect op de lange termijn hebben we bij de chirurgische patiënten één en drie jaar na inclusie de sterfte tussen de mupirocine/chloorhexidine- en de placebogroep vergeleken. In de subgroep van patiënten die een schone ingreep hadden ondergaan was de mortaliteit een jaar na inclusie lager in de mupirocine/chloorhexidine-groep dan in de placebogroep. De screen-and-treatstrategie zou daarom ten minste moeten worden uitgevoerd bij patiënten die schone ingrepen ondergaan met een hoog risico op *S. aureus*-wondinfecties.

Nosocomiale infecties brengen extra kosten met zich mee, maar de screen-and-treatstrategie ook. Daarom hebben we de zorgkosten voor cardiochirurgische en orthopedische patiënten uit de behandelde en de placebogroep met elkaar vergeleken. De totale kosten voor een patiënt in de placebogroep waren gemiddeld € 1911 hoger dan voor een patiënt in de mupirocine/chloorhexidine-groep. De screen-and-treatstrategie is voor deze groepen patiënten daarom kosteneffectief te noemen.

In het Erasmus MC hebben we gekeken naar mupirocine-resistentie bij stafylokokken ten opzichte van het gebruik van mupirocine. Op afdelingen waar veel mupirocine wordt gebruikt is het aandeel resistente CNS-isolaten uit bloed ruim 45 procent, significant hoger dan op afdelingen waar nauwelijks mupirocine wordt gebruikt. Mupirocine-resistentie is geassocieerd met resistentie voor andere antibiotica, en het plasmide coderend voor resistentie kan worden overgedragen aan *S. aureus*. Het is daarom noodzaak om mupirocine slechts voor te schrijven aan patiënten die er baat bij hebben.



Correspondentieadres: dr. L.G.M. Bode,
e-mail: L.G.M.Bode@umcutrecht.nl.

In het Erasmus MC zijn ruim 2000 patiënten op dragerschap gescreend. Van de patiënten die een *S. aureus*-infectie ontwikkelden, zijn met Raman-spectroscopie kolonisatie- en infectiestam vergeleken. Hieruit bleek dat dragers een groter risico hadden op het ontwikkelen van een *S. aureus*-infectie, maar dat er absoluut gezien meer exogene dan endogene infecties waren. Daarnaast konden we binnen de infectiestammen enkele klonale clusters aanwijzen. Preventie van *S. aureus*-infecties moet zich daarom niet alleen richten op endogene infecties, maar op preventieve maatregelen in het algemeen.

Van 12 patiënten met een *S. aureus*-bacteriëmie werden de extracellulaire eiwitten van de infecterende stam geïdentificeerd, alsmede de antistofrespons op de infectie. Bij endogene infecties was de antistofrespons bij infectie onmiddellijk gericht op de extracellulaire eiwitten van de infecterende stam. Bij exogene infecties was de respons op de infecterende stam bij begin van de infectie matig, maar werd deze specifiek bij progressie van de infectie.

Dragers vertoonden dus stamspecifieke pre-immunisatie, wat kan verklaren dat de mortaliteit ten gevolge van *S. aureus*-sepsis lager is bij dragers dan bij niet-dragers.

Ten slotte hebben we een MRSA-prevalentiemeting gedaan, en de resultaten vergeleken met een eerdere prevalentiestudie. Hieruit blijkt dat het aandeel dragers over een periode van zes jaar weliswaar gestegen is, maar niet significant verschilde van de voorgaande meting. Aangezien het grootste deel van de gevonden MRSA van onbekende oorsprong was, is het belangrijk nieuwe bronnen op te sporen en de richtlijnen zonodig aan te passen. Regelmatige prevalentieingen kunnen bijdragen aan het vroegtijdig identificeren van nieuwe bronnen.

Lonneke Bode heeft op 11 maart 2014 haar proefschrift getiteld 'Prevention of healthcare associated Staphylococcus aureus infections' verdedigd aan het Erasmus MC te Rotterdam. Promotor was prof. dr. M.C. Vos.

AGENDA

6-9 september 2014

54th ICAAC 2014

Washington, DC, USA

[www.http://www.asm.org/index.php/asm-events/icaac2013](http://www.asm.org/index.php/asm-events/icaac2013)

11-13 september 2014

European Bone and Joint Infection Society-congres in Utrecht

www.ebjis2014.org;

email: ebjis2014@congressbydesign.com

16 september 2014

WMDI-bijeenkomst

17 september 2014

Workshop Antibiotics Stewardship – Promus

23 september 2014

Begrijpelijk en doelgericht schrijven voor huisartsen en medisch specialisten

www.pe-online.nl

23 september 2014

Bijeenkomst Werkgroep Klinische Parasitologie

29 september - 1 oktober 2014

NVMM managementcursus AIOS

23-24 oktober 2014

ESCMID-SHEA training course in hospital epidemiology

Phuket, Thailand

29 oktober - 1 november 2014

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies

Praag

<http://w3.kenes-group.com/mailshot/congress/esid2014/ms2.html?ref2=db1>

3 november 2014

WAMM-bijeenkomst

St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein

4 november 2014

WMDI-bijeenkomst

10-12 november

NVMM managementcursus AIOS

13-14 november 2014

Najaarsvergadering NVMM

Antwerpen

16-18 november 2014

The 9th Healthcare Infection Society International (HIS)

www.his.org.uk/conference

Handboek vaccinaties, deel B (Infectieziekten en vaccinaties)

Onder redactie van R. Burgmeijer, K. Hoppenbrouwers en F. van Gompel

De vaccinologie is een snel groeiend aandachtsgebied binnen de gezondheidszorg. Nieuwe vaccins, veranderingen in de epidemiologie van infectieziekten en een toenemende maatschappelijk interesse voor vaccins en vaccinatieprogramma's zijn hier debet aan. Voor professionals die dagelijks vaccineren is het al moeilijk die ontwikkelingen op de voet te blijven volgen en te vertalen naar de dagelijkse praktijk, laat staan voor professionals waarvoor vaccineren geen dagelijks werk is.

Het tweedelige Handboek Vaccinaties geldt als het standaardwerk over vaccinaties in de Lage Landen. Het bouwt voort op de in het verleden opgedane kennis en ervaring met vier drukken van Vaccinaties bij Kinderen. De auteurs hebben hun sporen ruimschoots verdiend binnen de vaccinologie als (voormalig) Hoofd Medische voorlichting en Productveiligheid van het Nederlands Vaccin Instituut, hoogleraar in de Jeugdgezondheidszorg en arts tropengeneeskunde en universitair hoofddocent tropische infectieziekten. Het handboek plaatst de vaccinologie in een begrijpelijk theoretisch kader en biedt handvatten voor het ter zake kundig uitvoeren van vaccinaties en het geven van evidence-based voorlichting aan patiënten. Bij het uitkomen van de eerste druk in 2007 viel het werk gelijk op door de prettige schrijfstijl, heldere informatie en verzorgde lay-out. In het vorig jaar in tweede druk verschenen deel B (Infectieziekten en vaccinaties) heeft men gelukkig deze sterke punten aangehouden en heeft vooral een update op inhoud plaatsgevonden. Deel A is (nog) niet toe aan een tweede druk en behandelt de theorie en uitvoeringspraktijk van vaccinaties.

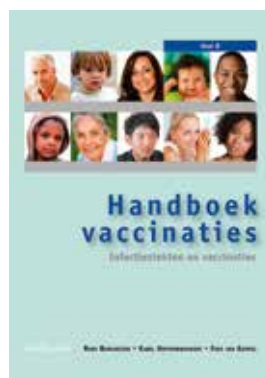
De open schrijfstijl van het Handboek maakt dit werk aantrekkelijk voor zowel degenen die beroepsmatig met vaccinaties te maken hebben (GGD-artsen, artsen-microbioloog, kinderartsen etc.) alsmede overige zorgprofessionals en de geïnteresseerde leek. Voor de arts-microbioloog is het een handzaam werk waarnaar makkelijk teruggegrepen kan worden bij vaccinatiecasuïstiek. Deel A behandelt alle aspecten van de vaccinologie met uitgebreide hoofdstukken over onder andere historie, immunologie, wet- en regelgeving, praktijk van het vaccineren, Rijksvaccinatieprogramma's en reizigersvaccinaties. In deel B wordt vervolgens ingegaan op infectieziekten waartegen vaccinatie mogelijk is, met steeds een

verwekker/ziektebeeld per hoofdstuk (26 hoofdstukken in totaal).

In deel B beginnen de hoofdstukken (nog) steeds met een historische introductie. Daarna komen verwekker, transmissie, klinisch beeld, diagnostiek, epidemiologie, bestrijding en tot slot natuurlijk uitgebreid vaccinatie aan de orde. De hoofdstukken zijn op sommige plaatsen geïllustreerd met afdrukken van postzegels uit de collectie van een van de redacteurs van het boek, hetgeen de leesbaarheid absoluut ten goede komt. Desondanks zal een boek het qua actualiteit altijd afleggen tegen digitale media (alhoewel bijvoorbeeld de VaccInformatiemap van het RIVM laatstelijk geactualiseerd is in 2011). Voor al dit soort standaardwerken geldt dan ook dat de uitgevers een digitale uitgave serieus zouden moeten overwegen opdat de lezer/abonnee te allen tijde een zo actueel mogelijk overzicht wordt geboden. Dit gezegd hebbende laat dit boek zich echter wel heel prettig op de bank of luie stoel lezen, hetgeen mij met een iPad toch nog steeds minder makkelijk lukt.

De complete set Handboeken A en B kost € 139,50. Handboek B alleen kost € 79,95. Redelijk bescheiden prijzen voor een dergelijk uitgebreid standaardwerk en derhalve het geld meer dan waard. In hoeverre een dergelijk werk een plaats verdient in uw maatschaps- of vakgroepbibliotheek blijft uiteraard afhankelijk van de mate waarin u in aanraking komt met vaccinatiegerelateerde vraagstukken.

M. van Rijn



ISBN: 978-90-23247715

608 pagina's

Jaar: 2013

Druk: 2

Uitgever: Gorcum b.v.

Prijs: € 79,95

Taal: Nederlands

PROMOTIES

11 juni 2013

L.J. Wammes

Immune regulation during parasitic infections: from bench to field

Promotor: prof. dr. M. Yazdanbakhsh

Copromotoren: dr. T. Supali, dr. H.H. Smits

LUMC Leiden, afdeling Parasitologie

13 juni 2013

A.E. Wiria

Helminth infections on Flores Island, Indonesia

Promotor: prof. dr. M. Yazdanbakhsh

Copromotoren: dr. T. Supali, dr. E. Sartono

LUMC Leiden, afdeling Parasitologie

17 oktober 2013

E.A.N. Oostdijk

The effects of selective decontamination in Dutch Intensive Care Units

Promotoren: prof. dr. M.J.M. Bonten, prof. dr. J. Kesecioglu

UMC Utrecht, afdeling Klinische Microbiologie en afdeling IC Geneeskunde

13 januari 2014

R. Blom

Molecular epidemiology of *Chlamydia trachomatis*

Promotor: prof. dr. H.J.C. de Vries

Copromotor(en): dr. S.M. Bruisten, dr. M.F. Schim van der Loeff

AMC Amsterdam, afdeling Dermatologie/GGD Amsterdam

13 februari 2014

S.B. Debats

Clostridium difficile infection: the role of antibiotics in outbreak control, epidemiology and treatment

Promotor: prof. dr. E.J. Kuiper

LUMC Leiden, afdeling Medische Microbiologie

25 februari 2014

L. Hogerwerf

Epidemiology of Q fever in dairy goat herds in the Netherlands

Promotoren: prof. dr. M. Nielen, prof. dr. ir. D.J.J. Heederik

Copromotor: dr. D. Klinkenberg

Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, afdeling Diersoortoverschrijdende disciplines.

Universiteit Utrecht, Institute for Risk Assessment Sciences

25 februari 2014

R.M. Schure

Pertussis specific T-cell immunity in Dutch children:

differences after whole-cell versus acellular vaccination

Promotor: prof. dr. E.A.M. Sanders

Copromotoren: dr. A.M. Buisman, dr. G. Berbers

UMC Utrecht, afdeling Pediatrische Immunologie

26 maart 2014

H.H. Semvua

Clinical pharmacological studies in tuberculosis patients: research from the Kilimanjaro Region, Tanzania

Promotor: prof. dr. D.M. Burger

Copromotoren: dr. R.E. Aarnoutse, dr. M.J. Boeree

Radboudumc Nijmegen, afdeling Apotheek/Centrale sterilisatie

8 april 2014

H. de Man

Best urban water management practices to prevent waterborne infectious diseases under current and future scenarios

Promotoren: prof. dr. F. van Knapen,

prof. dr. A.M. de Roda Husman

Copromotor: dr. E. Leenen

Universiteit Utrecht, Institute for Risk

Assessment Sciences. RIVM Bilthoven, Centrum

Infectieziektebestrijding

15 april 2014

L.M. Verhagen

Respiratory infections in Venezuelan children: interplay between host, pathogen and environment

Promotoren: prof. dr. P.W.M. Hermans,

prof. dr. J. H. de Waard

Copromotor: dr. A. Warris

Radboudumc Nijmegen, afdeling Kindergeneeskunde

22 april 2014

M. Mollers

Monitoring HPV vaccination: pre- and early post-vaccination data

Promotor: prof. dr. C.J.L.M. Meijer (emeritus)

Copromotor: dr. H.E. de Melker

VUmc Amsterdam, afdeling Pathologie

25 april 2014

S.M. Seyed Mousavi Tasieh

Strategies for treating aspergillosis due to azole-resistant *Aspergillus fumigatus*: from the bench to the bedside

Promotoren: prof. dr. P.E. Verweij, prof. dr. J.W. Mouton

Copromotoren: dr. W.J.G. Melchers, dr. R.J.M. Brüggemann

Radboudumc Nijmegen, afdeling Medische Microbiologie

21 mei 2014

E. Hafkamp-de Groen

Asthma Symptoms in Early Childhood: a public health perspective

Promotoren: prof. dr. H. Raat, prof. dr. J.C. de Jongste

Erasmus MC Rotterdam, afdeling Maatschappelijke

Gezondheidszorg en afdeling Kinderlongziekten

10 juni 2014

M.L. Tibúrcio

Targeting malaria transmission: erythrocyte remodeling by *Plasmodium falciparum* in gametocyte-host interplay

Promotor: prof. dr. R.W. Sauerwein

Copromotor: dr. P. Alano

Radboudumc Nijmegen, afdeling Medische Microbiologie