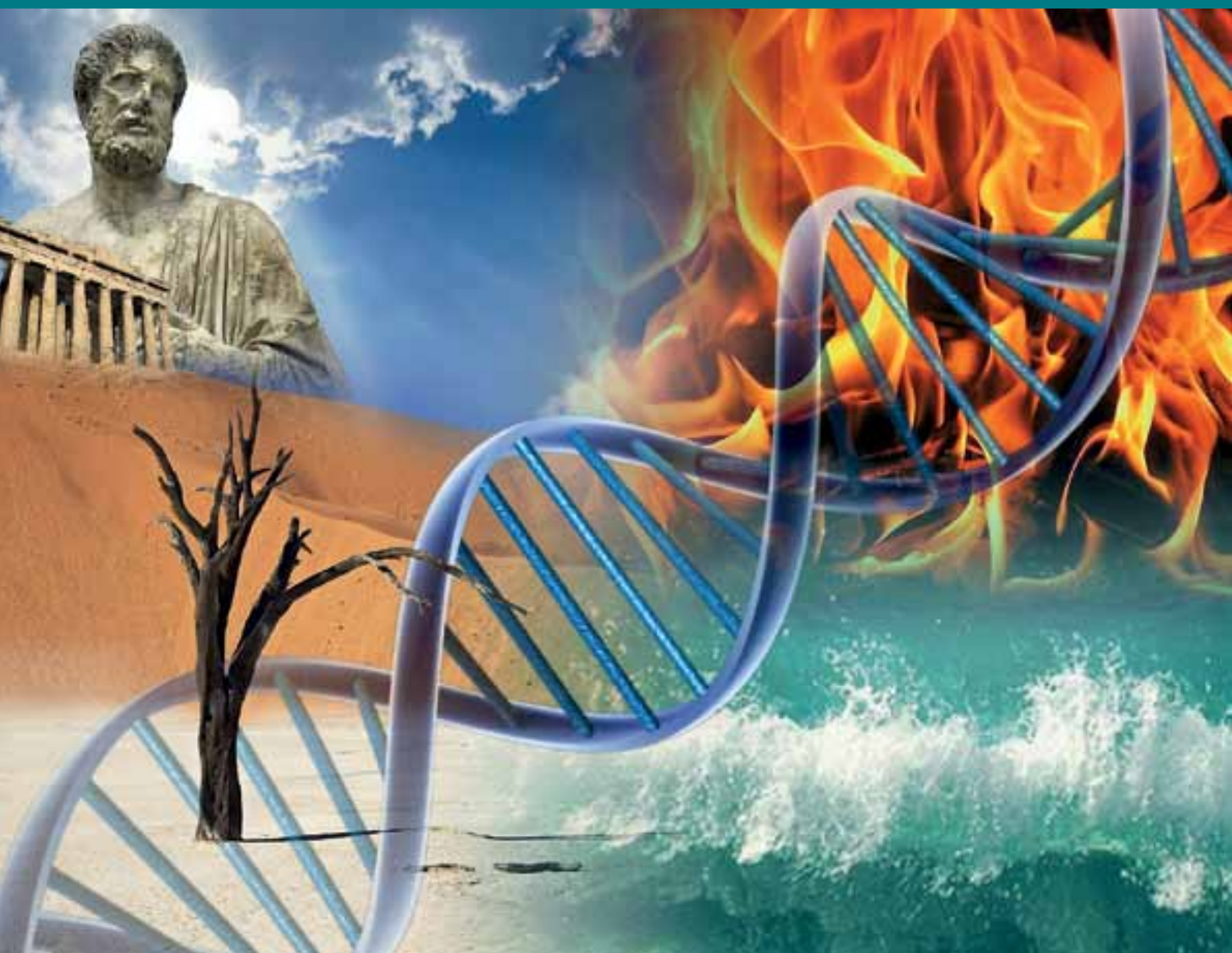


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Nieuwe ontwikkelingen in moleculair typeren

Schmallenbergvirus in herkauwers in Nederland

Aanbevelingen uit nieuwe NVMM-richtlijn
Laboratoriumdetectie BMRO

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

Hoofredactie

Dr. G. Andriess, dr. C.W. Ang
Redactie

Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,
dr. E. Boel, dr. A. Fleer,
mw. dr. E. Heikens, mw. T. Herremans,
mw. drs. M. Jager, dr. J.A. Kaan,
dr. J.S. Kalpoe, dr. J.F.G.M. Meis,
dr. M. Van Rijn, dr. C. Vink,
dr. H.F.L. Wertheim

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: € 55,- per jaar
Buiten Nederland, in Europa: 77,- per jaar
Losse nummers: 12,50
Opgave abonnementen:
Tel. (0172) 47 61 91



© 2012, 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 gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Leiden.

ISSN 0929-0176



Inhoud

| | |
|---|--------|
| Van de redactie | 5 |
| Transmissieroute | 6 |
| <i>J. Degener</i> | |
| Ingezonden | |
| Schmallenbergvirus in herkauwers in Nederland | 7 |
| <i>C. Reusken, H. van den Kerkhof, M. Koopmans</i> | |
| Recommendations of the NVMM Guideline Laboratory detection of highly resistant microorganism | 13 |
| <i>M.F.Q. Kluytmans-van den Bergh, A.T. Bernards, M.J.M. Bonten, J. Cohen-Stuart, B. Diederer, W.H.F. Goessens, H. Grundmann, J.A.J.W. Kluytmans, M.F.Q. Kluytmans-van den Bergh, M.A. Leverstein-van Hall, J.W. Mouton, N. al Naiemi, A. Troelstra, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, M.C. Vos, A. Voss</i> | |
| Totally Drug-Resistant Tuberculose in India | 51 |
| <i>E. Bowles</i> | |
| Groeten uit het buitenland | |
| Genève | 11 |
| <i>A.T.R. Tholen</i> | |
| Nieuwe ontwikkelingen in moleculair typen | |
| Microbiële typering, een kwestie van onderscheid maken | 16 |
| <i>P. Savelkoul, J. van Doorn, B. Duim, M. Figge, M. Heck, D. Melles, R. Molenkamp, L. Schouls, J. Top</i> | |
| Biofysische methoden: nieuwe klinisch-microbiologische diagnostiek | 21 |
| <i>R. te Witt, A. van Belkum, W. van Leeuwen</i> | |
| Moleculaire typering van <i>M. pneumoniae</i> | 29 |
| <i>E.B.M. Spuesens, N.G. Hartwig, A.M.C. van Rossum, C. Vink</i> | |
| Genotypering van hepatitis-C-virus ten tijde van nieuwe behandelingsmogelijkheden | 34 |
| <i>J. Schinkel, X. Thomas, R. Molenkamp</i> | |
| Moleculaire typering van norovirus | 39 |
| <i>A. Kroneman, H. Vennema, D. Baas, E. Duizer, M. Koopmans</i> | |
| De onbegrepen levensweg van Giardia: rol van dier-en-sex? | 44 |
| <i>H. Sprong, J. van der Giessen</i> | |
| Targets en tools voor typering van MRSA in uitbraaksituaties | 48 |
| <i>W. van Leeuwen</i> | |
| Samenvatting proefschrift | |
| Determinants of the Development and Evolution of HIV-1 Drug Resistance | 52 |
| <i>A. Fun</i> | |
| Personalialia, promoties, oratie, congresagenda | 53, 54 |

Foto omslag: Loes van Damme (l.h.vandamme@erasmusmc.nl) en Hans den Boer (j.denboer@erasmusmc.nl)
Erasmus MC, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten,
Postbus 2040, 3000 CA, Rotterdam.

‘Modern Times’

Geachte lezer,

Het is niet te missen dat ‘de media’ sterk in ontwikkeling zijn. De meest gerenommeerde kranten in de wereld zijn hun bestaansrecht niet meer zeker. Zelfs de *New York Times* ‘leeft’ in grote onzekerheid. In de documentaire *Page One: Inside the New York Times* van filmmaker Andrew Rossi krijgt de kijker een interessante blik op de binnenwereld van de *New York Times*. In de documentaire wordt mediacolumnist David Carr gevolgd, die het als ‘old school’ journalist moet opnemen tegen razendsnelle en vluchtige informatiestromen van Twitter, Wikileaks en de vele blogs. Het is zeker de moeite waard om deze documentaire te bekijken. Er wordt door vooraanstaande journalisten van de *New York Times* letterlijk getwijfeld aan de levensvatbaarheid van hun krant. Dit was tien jaar geleden nog volstrekt ondenkbaar.

Hoewel het NTMM geen krant is, en zeker geen lezersbereik heeft dat zich kan meten met dat van de *New York Times*, ziet de redactie zich toch met dezelfde problematiek geconfronteerd. Door de toegenomen diversiteit aan informatiestromen voor de medische microbiologie (websites, nieuwsbrieven, signaleringen, mailings, tijdschriften, etc.) en de snelheid van deze informatie, moet de NVMM zich steeds opnieuw afvragen wat de positie is van het NTMM. Om te peilen hoe u als lezer over het NTMM denkt, heeft de redactie een korte

enquête opgesteld die u binnenkort tegemoet kunt zien. De resultaten van de enquêtes zullen worden besproken met het NVMM-bestuur en kunnen bijdragen aan het vormgeven van de toekomst van het NTMM.

Eén van de gedachten is om het NTMM meer themagericht in te delen. In dit nummer vindt u reeds een kleine aanzet tot een themagerichte aanpak: typering van micro-organismen. Daarnaast wordt een samenvatting van de nieuwe NVMM-richtlijn over detectie van multiresistente micro-organismen weergegeven. Doordat de artikelen over één bepaald onderwerp minder verspreid over de diverse nummers worden gepubliceerd en door het publiceren van richtlijnen in het NTMM, zou ons tijdschrift interessanter kunnen worden als naslagwerk en blijft het ook na de publicatiedatum van waarde.

Het zal de oplettende lezer niet zijn ontgaan dat de vormgeving van het NTMM enigszins is aangepast. Meer kleur in het blad en een restyling van de cover, onder het mom van ‘verandering van spijs doet eten’.

Namens de redactie wens ik u veel leesplezier!

Gunnar Andriessse,
hoofdredacteur



Over dokters en de intensieve zorg voor mens en dier

J.E. Degener

Meer dan ooit tevoren ontstaat het bewustzijn dat er iets niet goed gaat met onze bacteriën. Denk hierbij aan de toename van opduikende resistente ziekenhuisbacteriën, een deels vertekend beeld omdat kleinere beheersbare uitbraken voorheen zelden in de publiciteit kwamen. Maar daarnaast ook aan het overstromen van resistente bacteriën vanuit de veterinaire pool naar mens en milieu. Al decennia is in ziekenhuizen, waar binnen een beperkte ruimte veel mensen intensief worden verzorgd en veel antibioticagebruik is, gewerkt aan een antibioticaregistratiesysteem, aan formularia en aan resistentiesurveillance. De laboratoria, het RIVM en de SWAB hebben dit systeem voor een ruim publiek toegankelijk weten te maken (SWAB-website, NethMap). Op het humane vlak lijkt alles redelijk op orde. Toenemende zorg is er over de resistentieontwikkeling van voor de mens relevante bacteriesoorten bij huis- en nutsdieren en effecten op de volksgezondheid. Hoe met dit laatste om te gaan?

Al in 1977 heeft de Gezondheidsraad in het “Advies inzake Het Gebruik van Antibiotica” aanbevolen het gebruik in de veehouderij te reguleren door het gebruik te verbinden uitsluitend aan het voorschrijven door de diergeneeskundige. Voor humaan gebruik geschikte middelen zouden niet langer moeten worden gebruikt als voedingsadditief. Het RIVM had waargenomen dat resistente veegerelateerde *E. coli* steeds vaker voorkwam. Met deze adviezen is geruime tijd weinig gedaan.

Onder leiding van prof. D. Mevius (CIDC-Lelystad) worden sinds 1997 jaarlijks gegevens geproduceerd over antibioticagebruik en resistentie in de diverse sectoren van de dierhouderij, pluimvee, vleeskalveren en varkens (MARAN-rapportage). In 1998 kwam een Gezondheidsraadrapport uit over antimicrobiële groeibevorderaars, waarin opnieuw werd aanbevolen het nuttief gebruik van antibiotica te staken. Dit gebruik overtrof verre het therapeutisch gebruik. Het advies kwam op het juiste moment want het onderwerp stond hoog op de agenda in Brussel, resulterend in Europese wetgeving, die nu de meeste antibiotica als groeibevorderaar verbiedt. Het verbod had helaas een averechts effect op het therapeutisch gebruik. Het totale gebruik is nu met 600 ton zelfs toegenomen, bij een afnemende veestapel. Er bestaat geen inzicht in de reden van deze ommekeer.

De diersectoren kennen formularia. Daarin komen derdegeneratiecefalosporinen en fluorochinolonen niet of slechts als derde keus voor. Deze middelen worden niettemin veel toegepast en de gevolgen daarvan worden nu merkbaar. Confrontaties met veegerelateerde MRSA- en ESBL-producerende *E. coli* blijven niet uit. Dit is het overstroomeffect vanuit een resistentiepool in het ons omringende milieu. Hierdoor gealarmeerd heeft minister Verburg uit de vorige regering een convenant gesloten met de sectoren. Afspraken zijn gemaakt over reductie, waarbij dierenartsen een spilfunctie vervullen, overeenkomstig het advies uit 1977. Door het genereren van gebruiksdata, waarbij de voorschrijfgegevens van de dierenartsen en de verbruiksgegevens per sector per diereneenheid een op een op elkaar moeten passen, zal toezicht worden gehouden. In 2010 is hiertoe de SDa, Autoriteit Diergeneesmiddelen in het leven geroepen. De SDa is een onafhankelijk instituut dat richtlijnen vaststelt voor verantwoord gebruik van antibiotica in de veehouderij, opdracht geeft voor het leveren van gebruiksdata en toezicht houdt op de kwaliteit van de data en verbeterprogramma's. Via de site kunnen per 1 juli 2011 benchmarkindicatoren worden geraadpleegd, opgesteld door een expertpanel uit veterinaire en humaan medische gelederen (dr. Johan Mouton).

Over de bedrijfsvoering in de intensieve dierhouderij is veel te doen. Besmettelijke infectieziekten hebben enorme gevolgen. De gevolgen van het ontbreken van rationeel antibioticagebruik zijn te vergelijken met die in een gesloten humane gemeenschap zoals in een ziekenhuis. Het voorschrijven van antibiotica moet daarom gebaseerd zijn op adequate diagnostiek. Terughoudend moet worden omgegaan met reservemiddelen. Om antibiotica, nu en in de toekomst, succesvol te kunnen blijven gebruiken, moeten de neuzen van dieren- en mensendokters dezelfde kant op staan.

De volgende Transmissieroute wordt ingevuld door Nathalie van Burgel, Hagaziekenhuis Den Haag.

Correspondentieadres: prof. dr. J.E. Degener, afdeling Medische Microbiologie, Universitair Medisch Centrum Groningen, Postbus 30001, 9700 RB Groningen, e-mail: j.e.degener@umcg.nl.

Schmallenbergvirus in herkauwers in Nederland: implicaties voor de volksgezondheid

C. Reusken, H. van den Kerkhof, M. Koopmans

Situatie

Het Schmallenbergvirus (SBV) werd begin november 2011 aangetroffen in sera van zieke runderen met een ziektebeeld dat met koorts gepaard ging. Het virus is vernoemd naar het dorpje Schmallenberg (Noordrijn Westfalen).¹

In augustus en september 2011 werd bij een ongewoon aantal koeien in Duitsland en Nederland koorts, verminderde melkgift en diarree waargenomen. De dieren herstelden spontaan na een paar dagen. In Nederland ging het om 80 bedrijven, waarbij aanvankelijk niet werd gedacht aan een relatie met de bevindingen in Duitsland.^{2,3} Op 18 november meldde dr. Martin Beer van het Friedrich Loeffler instituut (FLI) in Duitsland dat het om een orthobunyavirus (SBV) bleek te gaan, waarbij gebruik werd gemaakt van deep sequencing; de gevonden sequenties duiden op een niet eerder in Europa gevonden virus.¹ Omdat de virussen gedetecteerd werden bij dieren dicht bij de Nederlandse grens, omdat de etiologie van de diarree in Nederlandse koeien nog niet kon worden vastgesteld en omdat onder de orthobunyavirussen diverse humaan-pathogene virussen worden gevonden, hebben zowel het Centraal Veterinair Instituut in Lelystad (CVI) als het RIVM een protocol ontvangen van het FLI, op grond waarvan moleculaire detectie van SBV kon worden opgezet. Op 8 december 2011 werd door het CVI vastgesteld dat SBV-RNA ook aanwezig was in sera van de Nederlandse koeien met diarree.⁴

Sinds begin december werd in Nederland door de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) een ongewoon hoog aantal geboorten geregistreerd van schapenlammeren met misvormingen beschreven als artrogrypose. Deze congenitale afwijkingen kunnen optreden na infecties van herkauwers met orthobunyavirussen tijdens de dracht.⁵ Op 15 december 2011 werd in de hersenen van twee misvormde lammeren eveneens SBV aangetroffen.^{4,6} Op 23 december werd in België, op 23 januari 2012 in Groot-Brittannië en op 26 januari in Frankrijk het eerste geval van SBV bij misvormde lammeren gemeld.⁷⁻⁹ Sinds begin januari 2012 werd daarnaast een toename in het aantal meldingen van geboorten van misvormde kalveren gemeld. De geboorte van misvormde lammeren en kalveren was

waarschijnlijk het gevolg van intra-uteriene blootstelling gedurende de zomermaanden, de periode waarin het virus de meeste dieren geïnfecteerd moet hebben. Het beeld werd het eerst zichtbaar bij schapen en geiten vanwege de relatief korte draagtijd (circa vijf maanden). Op grond van dit vermoeden werd door het ministerie van Economische zaken, Landbouw en Innovatie op 20 december 2011 een meldingsplicht ingesteld voor de geboorte van afwijkende schapen- en geitenlammeren, en kalveren. Momenteel worden afwijkende dieren onderzocht met behulp van RT-PCR en indien de aanwezigheid van SBV wordt bevestigd, worden de locaties bekend gemaakt via de website van de Nederlandse Voedsel en Warenautoriteit.^{6,7}

Op 21 februari 2012 werd melding gemaakt van 394 runder-, 198 schapen- en 26 geitenbedrijven waar nakomelingen met misvormingen zijn geboren. Hiervan is op 95 schapenbedrijven, vijf geitenbedrijven en acht runderbedrijven de aanwezigheid van SBV met PCR op hersenmaterialen aangetoond. Omdat detectie van antilichamen nog niet beschikbaar is, is het uitsluiten van infectie bij de PCR-negatieve bedrijven lastig. De SBV-positieve bedrijven bevinden zich verspreid over heel Nederland.^{10,11} In misvormde kalveren is het virus tot nu toe zowel in Duitsland, België als in Nederland slechts in een enkel doodgeboren kalf aangetroffen.^{8,12,13} Mogelijk is de kans dat er nog virus in de kalveren aanwezig is kleiner omdat er bij runderen een langere periode tussen infectie en geboorte is dan bij schapen en geiten.

Schmallenbergvirus

Sequentiebepalingen van genoomfragmenten van SBV lieten verwantschap zien met het genoom van virussen behorende tot de familie van de *Bunyaviridae*, genus orthobunyavirus, Simbu-serogroep.¹ *Bunyaviridae* zijn negatief-strengs-RNA-virussen met een envelop, waarvan het genoom bestaat uit

Auteurs: H. van den Kerkhof, M. Koopmans, Centrum voor Infectieziektenbestrijding, RIVM.
Correspondentieadres: C. Reusken, Centrum voor Infectieziektenbestrijding, RIVM, Postbus 3720, BA Bilthoven,
e-mail: chantal.reusken@rivm.nl.

drie segmenten (L-, M- en S-segment). Deze virusfamilie omvat vier genera met diverse virussen van medisch belang (tabel 1). Het genus orthobunyavirus, waartoe SBV behoort, omvat meer dan 30 zoönotische virussen, waaronder Oropouche- and Iquitos-virus in dezelfde serogroep als SBV. Binnen deze serogroep is SBV het meest verwant aan niet-zoönotische virussen zoals Akabane-, Shamonda- and Aino-virus, die herkauwers infecteren.¹⁴⁻¹⁶

Orthobunyavirussen worden overgedragen door steekmuggen (*Culicidae* spp.) of knutten (*Culicoides* spp.) met vertebraten als reservoir.¹⁵⁻¹⁷ Voor zoönotische orthobunyavirussen is de mens doorgaans eindgastheer, met uitzondering van Oropouche- en Iquitos-virus, waarbij transmissie van mens tot mens tot diverse epidemieën geleid heeft. De aan SBV meest verwante virussen bij herkauwers worden voornamelijk overgedragen door knutten. Daarom wordt vermoed dat dit ook voor SBV het geval zal zijn.¹⁵⁻¹⁷

Inschatting van humaan risico

Op dit moment zijn infecties met de meest verwante orthobunyavirussen (Shamonda-, Aino-, en Akabane-virus)

alleen aangetoond in landbouwhuisdieren. Op basis van de beschikbare gegevens is een zoönotisch potentieel voor SBV echter niet met zekerheid uit te sluiten:

- SBV is een nieuwe variant orthobunyavirus dat in deze regio niet eerder werd aangetoond;
- het genus orthobunyavirus omvat meer dan 30 zoönotische virussen, ook binnen de Simbu-serogroep;^{15,16,18,19}
- reassortment is beschreven binnen serogroepen van orthobunyavirussen, wat geleid heeft tot het opduiken van nieuwe virussen, soms met verhoogde pathogeniciteit, hetgeen in principe kan leiden tot een verhoogd zoönotisch potentieel.²⁰⁻²³

Van de klinische verschijnselen van de humane virussen behorende tot de Simbu-serogroep is wel informatie beschikbaar. Oropouche- en Iquitos-virus veroorzaken bij de mens specifieke klachten met een griepachtig ziektebeeld waaronder hoofdpijn, koude rillingen, duizeligheid, spierpijn en fotofobie.²⁴

Patiënten zijn kortdurend (drie tot zes dagen na infectie) viremisch en klinisch herstel treedt op na gemiddeld twee

Tabel 1. Overzicht van een aantal Bunyavirussen (niet uitputtend).

| Genus | Serogroep | Species | Geografische verspreiding | Vector | Reservoir | Humaan pathogeen |
|-----------------|--|--|---------------------------|----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Nairovirus | Crimean-Congo haemorrhagic fever-groep | Crimean-Congo haemorrhagic fever-virus | Europa, Turkije, Afrika | Teek | mens, vee, knaagdieren, vogels | Ja |
| Phlebovirus | Phlebotomus fever-groep | Rift Valley fever-virus | Afrika, Midden-Oosten | Steekmug | Knaagdieren, vee | Ja |
| | | Toscana-virus | Europa, Azië, Afrika | Zandvlieg | Unkown | Ja |
| Hantavirus | - | Puumala-virus | Europa | - | Knaagdieren | Ja |
| Orthobunyavirus | Simbu-groep | Oropouche-virus | Zuid-Amerika | Steekmug, knut | Mens, luiaarden, marmosets | Ja |
| | | Iquitos-virus | Zuid-Amerika | Knut | Mens, onbekend | Ja |
| | | Akabane-virus | Azië, Israël, Australië | Knut | Herkauwers | Nee |
| | | Shamonda-virus | Afrika | Knut | Herkauwers | Nee |
| | | Aino-virus | Azië | Knut | Herkauwers | Neutraliserende antilichamen. |
| | | Shuni-virus | Afrika | Knut | Herkauwers | Neutraliserende antilichamen. |
| | California Encephalitis-groep | California encephalitis-virus | Noord-Amerika | Steekmug | Knaagdieren, haasachtigen | Ja |
| | | La Crosse-virus | Noord-Amerika | Steekmug | Knaagdieren, haasachtigen | Ja |
| | | Tahyna-virus | Europa | Steekmug | Vogels, haasachtigen | Ja |
| | Bunyamwera-groep | Batai-virus | Europa, Azië, Afrika | Steekmug | Vogels | Ja |
| | | Cache Valley-virus | Noord-Amerika | Steekmug | Vee, hert | Ja |

tot drie weken.^{18,25} In 38% van de gevallen van besmetting met het Iquitos-virus worden respiratoire klachten en in 75% van de gevallen gastro-intestinale symptomen (diarree, misselijkheid, overgeven) beschreven.¹⁹

Het infectierisico van mensen en dieren voor arbovirussen is waarschijnlijk nauw gerelateerd aan de aanwezigheid van hoge dichtheden geïnfecteerde arthropoden, maar de activiteit van de veronderstelde vector is op dit moment laag. Bij een eventuele directe zoönotische transmissie van SBV zou blootstelling aan geboorteproducten bij het lammeren of kalveren een infectierisico voor omstanders kunnen opleveren. Viraal RNA is aangetoond in vruchtwater, placenta en meconium (M. Beer, *pers. comm.*).

Humane respons

Op basis van de beschikbare gegevens kan infectie van de mens met SBV niet worden uitgesloten. De kans op blootstelling in de winter is minimaal, uitgaand van de aanname dat SBV via knutten wordt verspreid.^{26,27} Er wordt rekening gehouden met de mogelijkheid dat het virus in het nieuwe vectorseizoen in 2012 weer gaat circuleren. Omdat niets bekend is over de blootstellingsrisico's tijdens de geboorte van misvormde dieren is werknemers en bewoners van besmette bedrijven geadviseerd de gebruikelijke hygiënemaatregelen rondom het aflammeren en afvoeren van kadavers in acht te nemen. Zwangere vrouwen wordt ontraden om bij het aflammeren aanwezig te zijn of contact met geboorteproducten te hebben. Uit voorzorg is geadviseerd dat personen die klachten krijgen die gepaard gaan met koorts binnen 14 dagen na een mogelijke blootstelling aan SBV (met name dierenartsen en veehouders), contact dienen op te nemen met de lokale GGD. De GGD neemt bij die meldingen een korte vragenlijst af en vraagt toestemming voor het uitvoeren van diagnostiek. Er zijn sinds begin december geen bijzondere gezondheidsklachten bij de GGD gemeld.

Diagnostiek

Om aan de mogelijke vraag naar humane diagnostiek van SBV te kunnen voldoen en ter voorbereiding op een eventueel nieuw seizoen waarin SBV circuleert, is het Centrum voor Infectieziektenbestrijding van het RIVM begonnen met het opzetten van humane diagnostiek gebaseerd op RT-PCR en serologie. Het PCR-protocol is operationeel maar nog niet gevalideerd voor humane diagnostiek, zodat bij eventuele reactiviteit confirmatie door middel van sequentieanalyse en serologie nodig is. Binnen één week na het begin van de klachten is voor andere orthobunyavirussen diagnostiek mogelijk met RT-PCR op serum met hoge sensitiviteit.²⁸ Een virusisolaat van het CVI wordt gebruikt voor het ontwikkelen van IFA- en neutralisatietesten. Bij klinische verdenking (na overleg

met GGD/LCI) wordt daarom geadviseerd om in de acute fase een stolbuis af te nemen, met een tweede serum na twee tot drie weken. Het RIVM gaat met retrospectief en prospectief sero-epidemiologisch onderzoek de blootstelling van mensen aan SBV nader onderzoeken.

Referenties

1. Beer M. Undiagnosed illness, bovine- germany, Netherlands (02): new virus susp. ProMED-mail 2011; Archive. nr. 20111119.3404.
2. Mars J, Kock P, W. Pvd. Undiagnosed Illness, Bovine- Germany, Netherlands (03): Netherlands update, RFI. ProMed-mail. 2011; Archive. nr. 2011201.3498.
3. Gezondheidsdienst, voor, Dieren. Meldingen van koeien met waterdunne diarree, koorts en productiedaling. Deventer2011 [cited 2012 21]; Available from: http://www.gddeventer.com/nl/25222685-%5BLink_page%5D.html?opage_id=1031068&location=524520953556713,10744598,true.
4. Bleker H. Schmallenberg. In: Directie VDC MvEz, Landbouw en Innovatie, editor. Den Haag: Brief aan de Tweede Kamer.; 16 december 2011.
5. Kim YH, Kweon CH, Tark DS, et al. Development of inactivated trivalent vaccine for the teratogenic Aino, Akabane and Chuzan viruses. *Biologicals*. 2011 May;39(3):152-7.
6. Kock P, Poel van der W, Vellema P, Mars J. Schmallenberg virus-Netherlands (05): update. ProMED mail. 2011; Archive nr. 20112221.3653.
7. Federaal, Agentschap, voor, de, Veiligheid, Van, et al. Schmallenbergvirus. 2012 [cited 2012 21-01-2012]; Available from: <http://www.favv.be/dierengezondheid/schmallenberg/#d>.
8. Bleker H. In: Ministerie van Economische Zaken Lel, editor.: Brief aan de Tweede Kamer; 2012.
9. Anonymous. Schmallenberg virus -Europe (12): France confirmed, update. ProMED mail. 2012; Archive number 20120128.1025004.
10. nVWA. Aantallen meldingen Schmallenberg virus per provincie. 2012 [cited 2012 20-01-2012]; Available from: <http://www.vwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/schmallenbergvirus>.
11. nVWA. Overzichtskaart Nederland met bedrijven waar Schmallenberg virus is aangetoond. 2012 [cited 2012 20-01-2012]; Available from: <http://www.vwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/schmallenbergvirus>.
12. FLI. Aktuelle Informationen zum „Schmallenberg-Virus“ Stand: 20. Januar 2012 2012 [cited 2012 20-01-2012]; Available from: http://www.fli.bund.de/no_cache/de/startseite/aktuelles/tierseuchengeschehen/schmallenbergvirus.html.
13. Federaal, Agentschap, voor, de, Veiligheid, van, et al. Persbericht: Schmallenbergvirus, eerste geval bij een runderfoetus. 2012 [cited 2012 23-01-2012]; Available from: http://www.favv.be/persberichten/_documents/2012-01-19_schmallenberg-premier-cas-nl.pdf.
14. Walter CT, Barr JN. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J Gen Virol*. 2011 Nov;92(Pt 11):2467-84.
15. Hart TJ, Kohl A, Elliott RM. Role of the NSs protein in the zoonotic capacity of Orthobunyaviruses. *Zoonoses Public Health*. 2009 Aug;56(6-7):285-96.
16. Elliott RM. Emerging viruses: the Bunyaviridae. *Mol Med*. 1997 Sep;3(9):572-7.
17. Calisher CH, editor. History, classification and taxonomy of viruses in the family Bunyaviridae. New York: Plenum Press; 1996.
18. Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Ishak R, Freitas RB, Gomes ML, et al. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *Am J Trop Med Hyg*. 1981 Jan;30(1):149-60.
19. Aguilar PV, Barrett AD, Saeed MF, Watts DM, Russell K, Guevara C, et al. Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Sep;5(9):e1315.
20. Bowen MD, Trappier SG, Sanchez AJ, Meyer RF, Goldsmith CS, Zaki SR, et al. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology*. 2001 Dec 20;291(2):185-90.

21. Saeed MF, Wang H, Suderman M, Beasley DW, Travassos da Rosa A, Li L, et al. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. *Virus Res.* 2001 Sep;77(1):25-30.
22. Gerrard SR, Li L, Barrett AD, Nichol ST. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J Virol.* 2004 Aug;78(16):8922-6.
23. Briese T, Bird B, Kapoor V, Nichol ST, Lipkin WI. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J Virol.* 2006 Jun;80(11):5627-30.
24. Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuaria PC, et al. Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol.* 2009 Feb;44(2):129-33.
25. LeDuc JW, Pinheiro FP, editors. Oropouche fever. Boca Raton: CRC Press; 1989.
26. Reusken C, Koopmans M. Risk profile humaan Schmallenbergvirus. *Nota Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu.* 2011(21 december 2011).
27. ECDC. New Orthobunyavirus isolated from infected cattle and small livestock, Potential implications for human health. ECDC risk assessment. 2011.
28. Weidmann M, Rudaz V, Nunes MR, Vasconcelos PF, Hufert FT. Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. *J Clin Microbiol.* 2003 Jul;41(7):3299-305.

Genève

A.T.R. Tholen

De World Health Organization, invloedrijk, wereldwijd en ambitieus. Mijn interesse was ontstaan tijdens een tropencursus waarin mij duidelijk werd dat de richtlijnen en verspreiding van de epidemiologische gegevens van ziekten door de WHO worden bepaald.

Surfend op de WHO-site, *www.who.int*, vond ik de manier om in aanmerking te komen voor een stage. Conclusie: moeilijk om een stageplek te bemachtigen; 1500 aanvragen per jaar; en of je na allerlei procedures wel of niet wordt uitgenodigd, is onzeker. Een indrukwekkend cv en veel ervaring in het buitenland zijn een absolute must. Ondanks dat ik ervaring in het buitenland heb, gaf ik mijzelf met de 1500 aanvragen per jaar weinig kans. Maar als er iets belangrijk is bij de WHO, dan is het een netwerk. Ik bedacht dat ik in Nederland iemand moest vinden die belangrijk is in het WHO-netwerk. Met de zoekstrategie 'invloedrijk persoon binnen de infectieziekten' kwam ik bij professor Coutinho terecht. Gelukkig kreeg ik hem direct aan de telefoon en dankzij zijn netwerk ben ik uiteindelijk bij de WHO terechtgekomen.

Op 4 januari 2011 mocht ik beginnen op de afdeling *Global alert and responses* voor een stage van drie maanden. Ik was uitgenodigd om mee te helpen met de voorbereiding van een congres over Leptospirosis en een artikel te schrijven over *Yersinia pestis wereldwijd in het jaar 2010*.

Het zoeken van een stageplek, een stagevergoeding en een kamer in Genève kostte me meer tijd dan de drie maanden die de stage duurde, maar het was de moeite meer dan waard!

Als je het centrum van Genève uitrijdt en de heuvel oprijdt bij Place de Nation (plein waaraan de VN zit) tussen de bomen over de Via Appia (voor mij 'Via Uppia' toen ik op een gegeven moment met de fiets ging), kom je ten slotte bij een groot statig gebouw met het WHO-teken geprojecteerd op een van de muren. Er tegenover staat het nieuwe glimmende UN/AIDS-gebouw. Toen ik voor de eerste keer de grote marmeren entree binnenliep waar de bewaking klaar staat om je identificatie en uitnodiging te controleren, kreeg ik even het gevoel belangrijk te zijn.

Maar dat gevoel was al snel verdwenen toen ik na de prachtige ingang verstrikt raakte in een bruin gangen-

stelsel waar kamer na kamer, te midden van hoge stapels boeken en multomappen mensen achter bureaus aan het werk waren.

In mijn eerste week tijdens de nieuwjaarsvergadering waar Margeret Chan (de Director-General van de WHO) haar plannen en strategie voor het nieuwe jaar aankondigde, werd al snel duidelijk dat er bezuinigingen zouden plaatsvinden. Van een florerende economie zoals die van de afgelopen jaren, was geen sprake meer. De binnengekomen fondsen/giften (Bill Gates!) waren minder waard, mede door de hoge stand van de Zwitserse frank en de lage stand van de dollar. Waar het op neer kwam was dat er mensen ontslagen zouden worden – baanzekerheid was er niet meer in 2011. Dit merkte ik tijdens mijn stage. Reorganisaties vonden plaats, mensen waren druk bezig met wat er mogelijk zou gaan gebeuren en wie er weg zouden moeten. De alomgewaardeerde Ierse baas van de afdeling, *Environmental health in emergencies*, waarbinnen *Global alert* viel, moest aftreden. Mensen die jarenlang door de baas waren gesteund voelden de grond onder hun voeten wegzakken. Dit alles ten nadele van de WHO-projecten waar de mensen zich voor inzetten. Het was indrukwekkend welke invloed dit had op de sfeer.

Elke ochtend was er een speciale vergadering waarin het *Global alert team* samenkwam om nieuwe uitbraken van infectieziekten te bespreken en de voortgang van bepaalde ziektes te evalueren. Zo stond op een ochtend, twee jaar na de aardbeving, Haïti centraal, om de cholera-uitbraak te evalueren. De 'morning-meeting' vond elke ochtend plaats in de *Shoc room*. Deze is ontwikkeld na de SARS-uitbraak in 2004. De *Shoc room* bestaat uit twee verdiepingen. De bovenverdieping heeft een raam, zodat je naar beneden kunt kijken hoe de mensen daar aan het werk zijn. Na de tsunami in Japan in maart en de naderende problemen met kernenergie volgde een groep mensen de hele dag

Correspondentieadres: A.T.R. Tholen, AIOS Medische Microbiologie, VUmc, Postbus 7057, 1007 MB Amsterdam, a.tholen@vumc.nl.

in de *Shoc room* alle ontwikkelingen op de voet en was er voortdurend overleg over wat er ter preventie moest worden georganiseerd. Ondertussen schoten op een groot scherm beelden voorbij van de ellende in Japan.

De Promed-e-mails die ik nu nog dagelijks ontvang, herinneren mij aan de *morning meetings* en hoe vreemd het is om te kijken naar problemen op wereldniveau in plaats van, zoals tijdens mijn co-schappen, naar mevrouw Jansen of meneer Pietersen op de afdeling Interne, die een urineweginfectie heeft ontwikkeld.

Het leuke aan het hoofdkwartier van de WHO is dat er heel veel nationaliteiten samenkomen, hoewel een groot deel Zwitsers-Frans is. De diversiteit aan nationaliteiten brengt ook verschillende culturen samen, die alle met elkaar moeten samenwerken, met alle moeilijkheden en frustraties van dien. De formele Duitser, de Italiaanse allemansvriend, de correcte Engelsman en de breed-sprakige Oegandees. De Nederlandse zuinigheid viel op toen we met een groepje Nederlandse stagiaires op het gratis brood van de mensa een lekkere lik van de van huis meegenomen pindakaas smeerden.

Een taal goed beheersen en in een discussie je argumenten goed kunnen verwoorden, op een diplomatieke wijze is belangrijk om je doelen te verwezenlijken. Dat werd dat mij nogmaals duidelijk tijdens het congres over Leptospirosis in Marseille waar ik bij mocht zijn. Het doel van het congres, georganiseerd door mijn enthousiaste begeleider Eric Bertherat, was een duidelijk kader te scheppen met heldere richtlijnen voor hetgeen er moet gebeuren bij een eventuele uitbraak van Leptospirosis. Hiervoor waren experts uitgenodigd uit de hele wereld en met verschillende expertise. Zo was er iemand die veel van knaagdieren wist, iemand die veel wist over klimaatverandering en iemand met fundamentele kennis over de bacterie zelf.



De ingang van het gebouw van de WHO.



Zicht op het meer van Genève

Van een expert uit de Pasteurkliniek van New Caledonië tot een internist uit Bangkok. Allen waren overgevlogen voor dit congres en allen hadden een spreektijd van 50 minuten om hun kennis te delen.

Het doel was om gezamenlijk, op grond van alle op het congres verzamelde kennis, een protocol te ontwikkelen, maar het was zonneklaar dat degenen die de Engelse taal goed beheersten een grote voorsprong hadden. De presentatie die mij het meest bijbleef werd in perfect Engels gehouden.

Na het congres had ik een beter beeld van het doel van de WHO: het samenbrengen van de juiste experts met de juiste kennis om een bepaald probleem in kaart te brengen en een mogelijke oplossing aan te bieden. Een groot deel van de tijd zijn de WHO-ers bezig om contacten te onderhouden en nieuwe vergaderingen te organiseren waar de juiste mensen bij aanwezig zijn.

Om bij de WHO te kunnen werken heb je ervaring nodig binnen ontwikkelingssamenwerking. Want niet alleen speelt veel van de wereldwijde gezondheidsproblematiek zich af in de derdewereldlanden, ook moeten de protocollen zijn aangepast op de situatie in die landen. Daarnaast zijn diplomatieke vaardigheden om de doelen te verwezenlijken (en je baan te behouden) onmisbaar.

Al met al was deze stage een interessante en leerzame ervaring!

Nu ik mijn verhaal opschrijf, krijg ik weer zin om met Easyjet even naar Genève te vliegen en weer even te luisteren naar wat er allemaal speelt in de macrowereld, voordat ik mij weer stort op het grampreparaat onder de microscoop...

Recommendations of the NVMM Guideline Laboratory detection of highly resistant microorganisms

A.T. Bernards, M.J.M. Bonten, J. Cohen Stuart, B. Diederer, W.H.F. Goessens, H. Grundmann, J.A.J.W. Kluytmans, M.F.Q. Kluytmans-van den Bergh, M.A. Leverstein-van Hall, J.W. Mouton, N. al Naiemi, A. Troelstra, C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, M.C. Vos, A. Voss

Inleiding

Antimicrobiële resistentie neemt wereldwijd snel toe in gezondheidszorginstellingen, in de open bevolking en in de intensieve veehouderij. Niet alleen de prevalentie van antimicrobiële resistentie neemt toe, maar ook de diversiteit in onderliggende resistentiemechanismen. De toename in resistentie vormt een bedreiging voor het antimicrobiële therapeutisch arsenaal, en resulteert in een toename van morbiditeit, mortaliteit en gezondheidszorgkosten. Een nationale richtlijn ter preventie van verspreiding van bijzonder resistente micro-organismen (BRMO) binnen gezondheidszorginstellingen is in 2005 ontwikkeld door de Werkgroep InfectiePreventie (WIP). Efficiënte controle van BRMO is mede afhankelijk van adequate laboratoriumdetectie van antimicrobiële resistentie. De implementatie van snelle en accurate laboratoriumdetectiemethoden kan bijdragen aan het tijdig instellen van juiste antimicrobiële therapie en infectiepreventiemaatregelen om de verspreiding van resistente micro-organismen binnen gezondheidszorginstellingen te voorkomen. Daarnaast kan het de duur van preëemptief ingestelde isolatiemaatregelen verkorten en voorkomen dat onnodig contactonderzoek wordt ingesteld.

Deze richtlijn geeft aanbevelingen voor het juiste gebruik van de op dit moment beschikbare diagnostische laboratoriummethoden voor de snelle en accurate detectie van BRMO in patiënten en gezondheidsmedewerkers. Hiermee beoogt de richtlijn laboratoriumprocedures voor de detectie van BRMO in de Nederlands medische microbiologische laboratoria te standaardiseren en te verbeteren. De richtlijn is gericht op artsen-microbioloog, adviseurs infectiepreventie, microbiologisch analisten en medisch-microbiologische laboratoria die verantwoordelijk zijn voor de detectie van BRMO in patiënten en gezondheidszorgmedewerkers in Nederland. De richtlijn is ontwikkeld op initiatief van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) en gedeeltelijk gefinancierd

door de Stichting Kwaliteitsgelden Medisch Specialisten (SKMS). De werkgroep die de richtlijn heeft opgesteld bestaat uit artsen-microbioloog en medisch microbiologen met aangetoonde deskundigheid op het gebied van de laboratoriumdetectie van antimicrobiële resistentie. Leden van de werkgroep vertegenwoordigen zowel universitaire als niet-universitaire centra uit verschillende regio's van Nederland.

De richtlijn bestaat op dit moment uit twee hoofdstukken: 1) Enterobacteriaceae – ESBL en 2) Enterobacteriaceae – carbapenemases. Het hoofdstuk over de detectie van carbapenemases is nieuw; het hoofdstuk over de detectie van extended-spectrum bèta-lactamases (ESBL) vervangt de eerdere NVMM-richtlijn voor screening en detectie van ESBL (2008). Nieuw in deze richtlijn is dat niet alleen de laboratoriummethoden voor de detectie van resistentiemechanismen worden beschreven, maar ook methoden voor de detectie van dragerschap van BRMO, het uitvoeren van contactonderzoek en het rapporteren van antimicrobiële resistentie in het laboratorium- en patiënten informatiesysteem

M.F.Q. Kluytmans-van den Bergh, namens de werkgroep

Op de volgende pagina's volgt een overzicht van de belangrijkste aanbevelingen uit de richtlijn.

Auteurs: dr. A.T. Bernards, prof. dr. M.J.M. Bonten, dr. J. Cohen Stuart, dr. B. Diederer, dr. W.H.F. Goessens, prof. dr. H. Grundmann, prof. dr. J.A.J.W. Kluytmans, drs. M.F.Q. Kluytmans-van den Bergh, dr. M.A. Leverstein-van Hall, dr. J.W. Mouton, dr. N. al Naiemi, dr. A. Troelstra, prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, dr. M.C. Vos, prof. dr. A. Voss
Correspondentieadres: drs. M.F.Q. Kluytmans-van den Bergh, Amphia Academy Infectious Disease Foundation, Amphia Ziekenhuis, locatie Molengracht, Postbus 90158, 4800 RK Breda, e-mail: marjoleinkluytmans@gmail.com.

ENTEROBACTERIACEAE – extended-spectrum beta-lactamases

Detection of carriage

- Feces or a rectal swab are the preferred specimens for the detection of carriage with HRE.
- Dependent on the clinical signs additional clinical sites should be sampled.
- A single set of cultures is sufficient for the targeted screening for carriage of HRE.
- Patients can be considered to be no longer carrying HRE if two culture sets, collected at least 24 hours apart, and at least 48 hours after discontinuation of antibiotic therapy are negative.
- Swabs should be collected in an adequate transport medium (Stuart or Amies). The use of dry swabs is not recommended.
- Clinical specimens should be processed within 24 hours after sampling, and kept at 4-8°C until processing.

Laboratory methods

- For targeted ESBL-E screening of clinical specimens an ESBL-E screening agar should be used.
- Routine identification methods for Enterobacteriaceae should be used, as there are no indications that the identification of Enterobacteriaceae is different for susceptible or resistant isolates.
- Detection of ESBL in Enterobacteriaceae should be a two-step procedure, consisting of a screening step followed by a confirmation step.
- Methods for ESBL screening in Enterobacteriaceae are broth dilution, agar dilution, disk diffusion or an automated system.
- ESBL screening in Enterobacteriaceae should be performed with both cefotaxime (or ceftriaxone) and ceftazidime as indicator cephalosporins.
- The screening breakpoint is > 1 mg/L for both cefotaxime (or ceftriaxone) and ceftazidime.
- Phenotypic methods for ESBL confirmation are the combination disk diffusion test, the Etest ESBL, or broth microdilution.
- Phenotypic ESBL confirmation in group I Enterobacteriaceae should be performed with both cefotaxime (or ceftriaxone) and ceftazidime.
- In group I Enterobacteriaceae an additional ESBL confirmation test with cefepime as indicator cephalosporin is needed if test results for cefotaxime (or ceftriaxone) or ceftazidime are indeterminate, or when the isolate has a cefoxitin MIC \geq 16 mg/L.
- Phenotypic ESBL confirmation in group II Enterobacteriaceae should be performed with cefepime.
- Genotypic ESBL confirmation should be performed for *K. oxytoca* isolates that have a positive phenotypic ESBL confirmation test result.

- Genotypic confirmation of the presence of ESBL genes can be performed by PCR and ESBL gene sequencing or a DNA microarray based method.
- The following strains are recommended for quality control: *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL-positive); and *E. coli* ATCC 25922 (ESBL-negative).

Contact tracing

- For contact tracing it is recommended to use a (selective) medium that is optimised to detect the 'known' strain.
- ESBL-E isolates that are detected in contact patients should be compared to the isolate of the index patient by performing routine species identification and subsequent (geno)typing of strains.

Reporting

- ESBL confirmation test results should be reported in the laboratory information system as either 'ESBL-positive', 'ESBL-negative' or 'ESBL-indeterminate'.
- The antibiogram to be reported in the patient information system should be in accordance with the EUCAST clinical breakpoints. However, in case of an MIC below the clinical breakpoint for a beta-lactam antibiotic other than a carbapenem, it is recommended not to report the result for that particular antibiotic AND to provide a warning that it is unclear whether non-carbapenem beta-lactam antibiotics are effective in the treatment of serious infections caused by ESBL-E, and that treatment should be performed in consultation with a clinical microbiologist or an infectious diseases consultant.

ENTEROBACTERIACEAE – carbapenemases

Detection of carriage

- Feces or a rectal swab are the preferred specimens for the detection of carriage with HRE.
- Dependent on the clinical signs additional clinical sites should be sampled.
- A single set of cultures is sufficient for the targeted screening for carriage of HRE.
- Patients can be considered to be no longer carrying HRE if two culture sets, collected at least 24 hours apart, and at least 48 hours after discontinuation of antibiotic therapy are negative.
- Swabs should be collected in an adequate transport medium (Stuart or Amies). The use of dry swabs is not recommended.
- Clinical specimens should be processed within 24 hours after sampling, and kept at 4-8°C until processing.

Laboratory methods

- For targeted CPE screening of clinical specimens a CPE screening agar should be used. An ESBL-E screening agar may also be used, although OXA-48 producing isolates that do not produce ESBL cannot be detected.
- Routine identification methods for Enterobacteriaceae should be used, as there are no indications that the identification of Enterobacteriaceae is different for susceptible or resistant isolates.
- Detection of carbapenemase production in Enterobacteriaceae should be a two-step procedure, consisting of a screening step followed by a phenotypic and genotypic confirmation step.
- Carbapenemase screening in Enterobacteriaceae should be performed with both meropenem and imipenem. Routine screening with ertapenem is not recommended, but should be used in case of an outbreak with OXA-48 producing microorganisms.
- For all Enterobacteriaceae the MIC screening breakpoint for meropenem is > 0.25 mg/L, and the zone diameter screening breakpoint is < 24 mm.
- For *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., and *Citrobacter* spp. the MIC screening breakpoint for imipenem is > 1 mg/L, and the zone diameter screening breakpoint is < 22 mm.
- A carbapenem MIC above the screening breakpoint measured by an automated system should be confirmed with an antibiotic gradient on a strip method (e.g. Etest) on MHA (not on Iso-Sensitest).
- On the first isolate per species from a patient with a positive carbapenemase screen test, a PCR-based test should be performed to confirm the presence of carbapenemase genes.
- Phenotypic methods for CPE confirmation are the modified Hodge test and carbapenemase inhibition tests.

- The following strains are recommended for quality control: *E. coli* ATCC 25922 (carbapenemase-negative); *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC-positive); and *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (carbapenem-resistant due to other mechanisms than carbapenemase; modified Hodge test-negative).

Contact tracing

- For contact tracing it is recommended to use a (selective) medium that is optimised to detect the 'known' strain.
- CPE isolates that are detected in contact patients should be compared to the isolate of the index patient by performing routine species identification and subsequent (geno)typing of strains.

Reporting

- Genotypic carbapenemase confirmation test results should be reported in the laboratory information system as either 'carbapenemase-positive', or 'carbapenemase-negative'.
- The antibiogram to be reported in the patient information system should be in accordance with the EUCAST clinical breakpoints. However, in case of an MIC below the clinical breakpoint for a beta-lactam antibiotic, it is recommended not to report the result for that particular antibiotic AND to provide a warning that it is unclear whether beta-lactam antibiotics are effective in the treatment of serious infections caused by CPE, and that treatment should be performed in consultation with a clinical microbiologist or an infectious diseases consultant.

Microbiële typering, een kwestie van onderscheid maken

P. Savelkoul, J. van Doorn, B. Duim, M. Figge, M. Heck, D. Melles, R. Molenkamp, L. Schouls, J. Top
(namens de sectie Microbiële typering van de KNVM)

Introductie

Hippocrates onderscheidde bij de mens al 400 jaar voor Christus vier temperamenten (*figuur 1*) waar hij ook allerlei fysieke karakteristieken aan verbond: *de eerste typering*. Recente ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek hebben mogelijkheden geboden om micro-organismen, zelfs op isolaatniveau, te kunnen onderscheiden. In allerlei sectoren, zoals de voedingsmiddelenbranche, omgevingsbiologie en de gezondheidszorg wordt typering toegepast.

Binnen de medisch microbiologische diagnostiek in Nederland is het typeren van micro-organismen geen onbekend begrip. Typeren van micro-organismen wordt uitgevoerd om transmissie van met name bacteriën binnen de ziekenhuisomgeving aan te tonen. De aanleiding hiertoe is meestal de identificatie van eenzelfde bacteriesoort met een identiek resistentiepatroon bij twee of meer patiënten op een afdeling. Sommige micro-organismen worden getypeerd op landelijk of globaal niveau om de verspreiding en expansie van specifieke varianten (epidemiologie) aan te tonen in het belang van de volksgezondheid. Meestal betreft het hier het meten van de gevolgen van menselijk ingrijpen op micro-organismen

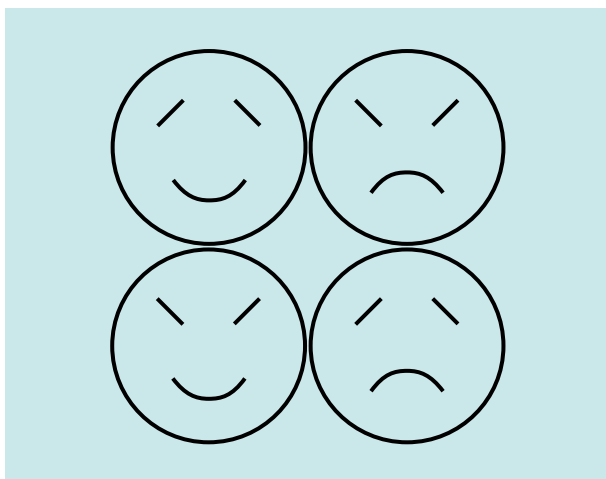
zoals vaccinatie, antibioticumgebruik en grootschalige veeteelt. Veel typering worden inmiddels uitgevoerd met moleculaire technieken, maar ook meer conventionele methoden zoals serotypering worden nog steeds volop toegepast. De aard van deze technieken verschilt en de eisen aan een techniek zijn anders binnen een ziekenhuisomgeving dan op landelijk niveau. In dit artikel geven we vanuit de sectie microbiële typering (SMT; www.microtyping.nl) een beknopt overzicht van de microbiële typering met de focus op het juiste gebruik in de juiste omgeving.

Ofschoon dit artikel zich beperkt tot de rol van typeren willen we benadrukken dat een typeringsuitslag geen enkel nut heeft wanneer er verder geen klinische data van patiënten, met epidemiologische c.q. demografische data bij betrokken kunnen worden. Een typeringsuitslag zal alleen binnen een breder kader geïnterpreteerd kunnen worden. Op basis van deze gecombineerde gegevens kan er pas sprake zijn van clusters van identieke stammen of uitbraken.

Typering van micro-organismen

Vanuit taxonomisch oogpunt betekent typeren onderscheid maken op stamniveau. Dit is onderscheid binnen eenzelfde species, onder het niveau van determinatie en identificatie. Bij determinatie en identificatie wordt onderscheid tussen species gemaakt en dit leidt tot de naamgeving aan het betreffende micro-organisme.

Figuur 1. Temperamenten van Hippocrates in streepjescode.



Auteurs: J. van Doorn, Praktijkonderzoek Plant en Omgeving Sector Bloembollen, Boomkwekerijgewassen & Fruit, Lisse, B. Duim, afdeling Klinische infectieziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Dept. Infectieziekten en immunologie, Universiteit Utrecht, Utrecht, M. Figge, NCCB, The Netherlands Culture Collection of Bacteria, CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, M. Heck, L. Schouls, Laboratorium voor Infectieziekten en Screening, Centrum Infectieziektebestrijding, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, D. Melles, afdeling Medische Microbiologie, Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam, R. Molenkamp, afdeling Medische Microbiologie Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, J. Top, afdeling Medische Microbiologie, UMCU, Utrecht. Correspondentieadres: P. Savelkoul, afdeling Medische Microbiologie & Infectiepreventie (MMI), VU medisch centrum, Amsterdam, e-mail: p.savelkoul.vumc.nl.

In het algemeen worden typeertechnieken getoetst aan: typeerbaarheid, onderscheidend vermogen, overeenkomst met andere typeermethoden en reproduceerbaarheid (tabel 1).¹ Als uitgangspunt wordt een niet al te snel veranderende merker op het genoom gekozen, omdat snel veranderende merkers die bijvoorbeeld bij doorkweken al verschillen laten zien, ongeschikt zijn om transmissie te kunnen waarnemen. Daarnaast zal elke typeringmethode zichzelf moeten bewijzen met een set aan diverse isolaten (testpanel) waarvan de epidemiologische relaties en ook de verwantschappen met andere methoden aangetoond zijn. Deze keuze is in de praktijk dus afhankelijk van de vraagstelling, het beschikbaar budget en lokale infrastructuur. Moleculaire typeermethoden kunnen grofweg in twee groepen ingedeeld worden: bandgebaseerd, bijvoorbeeld repPCR, MLVA, AFLP en sequentiegebaseerd, bijvoorbeeld MLST, SNP, whole genome sequencing. Over het algemeen zijn bandgebaseerde methoden sneller, omdat PCR de basis is van deze techniek en typering binnen een dag uitgevoerd kan worden. Een nadeel van deze methoden is dat in sommige gevallen de reproduceerbaarheid een probleem is en dat het vaak lastig is om data uit te wisselen met andere laboratoria. Bij sequentiegebaseerde methoden is dit eenduidiger, waardoor de uitwisselbaarheid van data tussen laboratoria juist een groot voordeel is. Het verkrijgen van sequenties kan echter meerdere dagen duren. Om dit probleem op te lossen zijn er momenteel veel ontwikkelingen waarbij in veel kortere tijd meerdere 'single nucleotide polymorphisms' (SNP's) kunnen worden geïdentificeerd.²

Typen in het kader van ziekenhuisepidemiologie

Recente gebeurtenissen zoals de uitbraak met de OXA-48-producerende *Klebsiella pneumoniae* in Nederland tonen aan dat snel en adequaat typeren gewenst is om de juiste hygiënemaatregelen in het ziekenhuis te nemen, waardoor verspreiding in een vroeg stadium gestopt kan worden. Hier speelt typering dus een belangrijke rol in het kader

van patiëntveiligheid. De ideale typeertechniek binnen een ziekenhuis dient snel en goedkoop te zijn, heeft een hoog onderscheidend vermogen, kan op alle voorkomende micro-organismen toegepast worden (flexibel), geeft in alle ziekenhuizen precies hetzelfde resultaat (portable en reproduceerbaar) en genereert data die elektronisch opgeslagen kunnen worden voor toekomstige vergelijkingen (comparative). Omdat deze ideale techniek (nog) niet bestaat, zullen er compromissen moeten worden gesloten.

In de ideale omstandigheid is typering van alle isolaten wenselijk om mogelijke verheffingen te identificeren. In de praktijk is dit (nog) niet haalbaar vanwege de kosten en wordt typering ingezet bij verdenking op transmissie. Voor het nemen van interventie maatregelen is het uitsluiten dat twee isolaten identiek zijn net zo belangrijk als het bepalen dat de isolaten hetzelfde zijn. Zo kan vastgesteld worden welke isolaten wel en welke niet bij overdracht betrokken zijn. Uit typering van isolaten van een volgende contactonderzoek kan dan vastgesteld worden hoever de betreffende verspreiding heeft plaatsgevonden. Mede op basis van de typeringsdata kunnen dan infectiepreventie maatregelen alleen op die afdelingen worden genomen waar verspreiding is geconstateerd. Bij dit prospectief typeren worden zodoende alleen bewezen betrokken afdelingen gesloten en als er snel actie wordt ondernomen is er wellicht geen sluiting van andere afdelingen nodig. Als zodanig speelt prospectief typeren binnen een ziekenhuisomgeving een belangrijke rol in het kader van patiëntveiligheid. Hoewel de kosten die gemoeid zijn met routinematig moleculair typeren als hoog worden beschouwd is dit argument niet langer houdbaar als alle infectiepreventiefacetten in ogenschouw worden genomen. De kosten die gemoeid zijn met het sluiten van een afdeling, inclusief alle persoonlijke gevolgen hiervan, zijn van een zodanige orde, dat de kosten van laagdrempelig typeren in het niet vallen. Illustratief hierbij is een calculatie, beschreven in een overzichtsartikel, waarbij in de Verenigde Staten werd aangetoond dat voor elke dollar die wordt uitgegeven aan typeren er 5 dollar bespaard wordt binnen het ziekenhuis.³ Nu is de situatie in de Verenigde Staten op dit gebied natuurlijk niet geheel vergelijkbaar met die in Nederland, maar het geeft wel aan dat typeren op ziekenhuisniveau besparend kan werken en ook in het belang is van de patiënt en zijn omgeving.

In het verleden werden typeringmethoden vooral ingezet om een uitbraak achteraf te bewijzen (retrospectief typeren). Hier zijn de afdeling en de patiënten vaak niet meer bij gebaat. Epidemiologisch is dit wel van belang om specifieke verspreidingsroutes en bronnen van infectie te identificeren. Als zodanig is retrospectief typeren dus van belang voor het nemen van toekomstige maatregelen betreffende ziekenhuishygiëne. Omdat er over het algemeen geen directe tijdsdruk meer is, zal de focus

Tabel 1

| Terminologie |
|---|
| Typeerbaarheid (Typeability): de bruikbaarheid van een methode om tot een type aanduiding te leiden (= % typeerbare stammen) |
| Onderscheidend vermogen (Discriminatory power): de resolutie van de methoden om onafhankelijke stammen te onderscheiden |
| Overeenkomst met andere typeermethoden (Concordance): de mate van overeenkomst met epidemiologische waarnemingen |
| Reproduceerbaarheid (Reproducibility): reproduceerbaarheid van de methode onafhankelijk van de tijd. |
| Toepasbaarheid (Flexibility): het aantal verschillende species dat met de methode getypeerd kan worden |

vooral op een goede resolutie van de typeringstechniek liggen.

Samenvattend zou gesteld kunnen worden dat typeren van micro-organismen binnen ziekenhuizen meer tot microbiologische routinediagnostiek zou kunnen behoren. Uitgangspunt hierbij is dat de uitslag zo spoedig mogelijk (lieft binnen 24 uur) bekend is en dat er een techniek met hoge resolutie wordt gebruikt waarmee transmissie kan worden aangetoond, niet alleen van de landelijk bekende MRSA, maar ook van reguliere bacteriespecies zoals *Escherichia coli* en bacteriën uit de genera *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter* en *Serratia*.

Verspreiding van antibioticumresistentiegenen

Waar de afgelopen jaren de analyse van uitbraken ophield bij het karakteriseren van het isolaat weten we inmiddels dat er ook verder gekeken moet worden naar zogenoemde 'jumping genes' (mobiel DNA), omdat deze vaak antibioticumresistentiegenen bevatten. Deze genen coderen voor resistentie tegen bijvoorbeeld vancomycine en meticilline en vormen ook de bron voor extended spectrum bètalactamase (ESBL)-fenotypen. Dit is gebleken uit onderzoek van stammen die met een verschillende genetische achtergrond, overeenkomstige plasmiden of andere mobiele elementen hadden.^{4,5} Uit de literatuur is al langer bekend dat er uitbraken van plasmiden voorkomen en met het toenemende probleem van resistentie-ontwikkeling zullen we dit ongetwijfeld ook binnen Nederland meer gaan vinden.^{6,7} In praktijk zal dit betekenen dat typering van het genoom van een isolaat niet meer altijd afdoende is om transmissie aan te tonen. Er zal daarnaast voor een aantal species een verdere karakterisering van specifieke additionele kenmerken moeten plaatsvinden zoals de aanwezigheid van mobiele DNA-fragmenten als plasmiden, integronen of transposons met daarin specifieke resistentiemerkers en/of virulentiemerkers. Verreweg het meest bekende voorbeeld is momenteel ongetwijfeld de verspreiding van ESBL-plasmiden, die zowel worden overgedragen binnen één bacteriesoort als tussen verschillende soorten. Hiermee dient bij mogelijke isolatiemaatregelen ook rekening te worden gehouden.

De techniekontwikkeling voor deze analyses is nog niet gestandaardiseerd. Diverse nieuwe technieken komen ter beschikking (zoals microarray) en vele technieken worden 'in house' ontwikkeld (zoals multiplex PCR). Niettemin kan het heel goed zijn om aan de hand van het antibioticaresistentieprofiel te bezien of er een bepaald mobiel DNA-element hierbij een rol kan spelen. Ook hierbij geldt dat een snelle analyse belangrijk is.

Openbare gezondheidszorg

Het uitvoeren van typeren in het kader van de openbare gezondheidszorg stelt enigszins andere eisen aan de typeringstechnieken. Hierbij gaat het niet meer om de

individuele patiënt of een afdeling binnen een ziekenhuis, maar op de schaal van volksgezondheid. In het algemeen kunnen hierbij twee invalshoeken worden onderscheiden: *bronopsporing* en *surveillance*. In het eerste geval is er sprake van tijdsdruk, zoals bij de recente uitbraak van de EHEC-bacterie in Duitsland.⁸ Het gebruik van een snelle typeermethode was uiterst bruikbaar geweest voor snelle bronopsporing. Andere voorbeelden waarbij typering en bronopsporing van belang zijn, zijn *Legionella*-infecties en tuberculose. Bij surveillance wordt er vaak getypeerd om de effecten van menselijk ingrijpen in kaart te brengen. Veelal vindt dit plaats in het kader van surveillanceactiviteiten waarbij vaak gedurende meerdere jaren isolaten van pathogenen verzameld en gekarakteriseerd worden. Het betreft hier meestal meldingsplichtige ziekten. Voorbeelden hiervan zijn surveillanceprojecten waarbij onderzocht wordt i) wat de impact van grootschalige vaccinatie zoals het Rijksvaccinatieprogramma is (bijvoorbeeld *Bordetella*), ii) projecten waarbij trends in de verspreiding van resistente micro-organismen wordt onderzocht (bijvoorbeeld MRSA) en iii) projecten waarin onderzocht wordt wat de impact van grootschalige veeteelt in dichtbevolkte gebieden is (bijvoorbeeld Q-koorts). De eisen aan de typeersystemen voor surveillancedoeleinden zijn anders dan die voor de ziekenhuisepidemiologie en bronopsporing. Bij typering voor surveillance is er minder tijdsdruk, maar moeten de pathogenen op zowel stam- als populatieniveau gekarakteriseerd worden. Bij een typeersysteem met hoge resolutie veranderen de gebruikte merkers vaak te snel om nog groepen op populatieniveau te kunnen waarnemen. Daardoor wordt het vrijwel onmogelijk om verschuivingen in de pathogeen populatie zichtbaar te maken. De ideale typeermethode zou voor zowel populatie- als transmissiestudies geschikt moeten zijn. De keuze van de merkers is daarbij essentieel en een mix van stabiele en mindere stabiele merkers, zoals in de MLVA van MRSA, zou een aanvaardbaar compromis kunnen zijn.⁹ Verder wordt er voor surveillance ook vaak gedetailleerd gekeken naar de specifieke eigenschappen van de pathogeen zoals die van de genen die coderen voor de componenten in vaccins of de samenstelling van bepaalde resistentiegenen.

Taxonomie

Op basis van identificatie op speciesniveau wordt de meest geschikte typeringstechniek gekozen zodanig dat er onderscheid tussen isolaten van dezelfde soort gemaakt kan worden. Vaak bevatten de commercieel verkrijgbare identificatiesystemen alleen de namen van de meest frequent voorkomende veroorzakers van infecties. Wanneer een infectie wordt veroorzaakt door een soort die niet in een van databases voorkomt of niet sterk is gerelateerd aan bekende soorten kan er aanvullend taxonomisch onderzoek worden gedaan zoals 16S rRNA-analyse,

Multilocus Sequence analysis, DNA GC-gehalte, fenotypische testen, vetzuuranalyse en DNA/DNA-hybridisatie. De taxonomie houdt zich bezig met de karakterisering, classificatie en nomenclatuur van micro-organismen. Een recent artikel van Tindall et al. beschrijft hoe prokaryoten tegenwoordig worden gekarakteriseerd en geclassificeerd.¹⁰ Daarnaast publiceert de Bergey's Manual Trust <http://www.bergeys.org/trust.html> sinds 1923 veel op het gebied van karakterisering en classificatie van prokaryoten en wordt taxonomisch onderzoek gepubliceerd in wetenschappelijke tijdschriften. Het grootste deel van de nieuwe bacteriesoorten wordt gepubliceerd in het *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. Sinds 2000 worden elk jaar ongeveer 750 nieuwe bacteriesoorten beschreven. Het toewijzen van namen aan micro-organismen speelt een belangrijke rol in de wetenschappelijke, medische en technische literatuur en dient als primaire aanmelding

('primary entry point') in de centrale databases waarop de wetenschappelijke gemeenschap en andere gebruikers vertrouwen. Daarom is de naamgeving (nomenclatuur) van prokaryoten geregeld in de bacteriologische code <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8817/>, terwijl de naamgeving van eukaryoten is geregeld in de botanische code <http://ibot.sav.sk/icbn/main.htm>. Voor naamgeving van virussen is 'The International Committee of Taxonomy on Viruses ICTV' <http://ictvonline.org/> verantwoordelijk. In deze codes staan de regels, richtlijnen en aanbevelingen voor de naamgeving met als doel stabiliteit te bevorderen en daarnaast het voorkomen van zinloos gebruik van namen en het voorkomen en afwijzen van namen die verwarring veroorzaken.

De code heeft alleen betrekking op de naamgeving en omvat niet de biologische classificatie of identificatie van micro-organismen.

Alle officieel gepubliceerde namen van bacteriesoorten en eventuele naamsveranderingen zijn terug te vinden in de bacterie nomenclatuur <http://www.bacterio.cict.fr/ac.html>. Dit is een lijst met gevalideerde namen die een status in de taxonomie hebben. Van elke soort wordt een stam aangewezen als de type stam. Meer informatie over de nomenclatuur van schimmels en gisten is te vinden in mycobank <http://www.mycobank.org/>. Informatie over virusnomenclatuur is te vinden op de website van de ICTV. Sinds augustus 2002 moet de type stam van elke nieuw beschreven bacteriesoort in twee verschillende cultuurcollecties worden gedeponereerd. Dit is om te zorgen dat een type stam beschikbaar is en blijft voor onderzoek. Voor micro-organismen die nog niet opgekweekt kunnen worden maar wel gekarakteriseerd zijn, bestaat de mogelijkheid deze een 'candidatusstatus' te geven.

Figuur 2. Schematisch overzicht van huidige moleculaire identificatie/typeer methoden.

| Genus | Species | Subspec. | Stam | Tijd | Gemak | Platf. | Typ. | Flex. | € |
|-----------------------|---------|----------|------|-------|-------|--------|--------|-------|-----|
| DNA-DNA reassociation | | | | >>24h | - | n.a. | n.a./I | H | ↑↑ |
| 16S rDNA sequencing | | | | 24h | + | S | D/I | H | ↑ |
| RAPD | | | | 8h | +++ | A | T | H | ↓ |
| PFGE | | | | 48h | ++ | A | D/IT | H | ↑↑ |
| Diversilab (rep-PCR) | | | | 24h | +++ | A | D/T | SS | ↑↑ |
| AFLP | | | | 24h | +++ | A/S | D/IT | H | ↑ |
| MLST | | | | 48h | ++ | S | D/IT | SS | ↑↑ |
| MLVA | | | | 24h | +++ | A/S | D/T | SS | ↑ |
| Raman Spectrometry | | | | 48h | +++ | n.a. | D/IT | SS | ↑↑ |
| Optical mapping | | | | 48h | + | n.a. | D/IT | H | ↑↑↑ |
| SNP analyse | | | | 24h | + | S | DT | SS | ↑↑ |

In het linker deel van de figuur is het discriminerend vermogen weergegeven. In het rechter deel van de figuur staan enkele karakteristieken per methode weergegeven.
Tijd: doorlooptijd gerekend vanaf gekweekte bacterie uit patiënten materiaal; *Gemak:* gebruiksgemak; *Platf.:* scheidingsplatform; *Typ.:* gebruik typering; *Flex.:* flexibiliteit van de methode; *€:* relatieve indicatie kostprijs op basis van huidige beschikbaarheid (pijl omhoog = duurder; pijl omlaag= goedkoper). Bij deze indicatie is uitgegaan van een praktijksituatie met lage aantallen verschillende bacteriële species (geen uitbraaksituatie).

P= polyacrylamide; A= agarose; D= geschikt voor database; I= geschikt voor identificatie; T= geschikt voor typeren; H= hoge flexibiliteit; SS= species specifiek.

Nieuwe ontwikkelingen

Het zal niemand ontgaan zijn dat de ontwikkelingen op het gebied van moleculaire technieken zeer snel gaan. Dit betekent dat ook op het gebied van typeren nieuwe methoden te verwachten zijn. Waar we enkele jaren geleden nog tevreden waren met een PFGE-uitslag na ongeveer een week, kunnen we dit nu met bijvoorbeeld MLVA en AFLP binnen 24 uur realiseren. De nieuwste methoden gaan steeds meer uit van 'whole-genome sequencing'-resultaten.¹¹ Op basis van het snel toenemend aantal whole genome-data kunnen specifieke SNP's geïdentificeerd worden die epidemiologisch van belang zijn. Naast het whole genome sequencing zijn er ook genoombrede analyses zoals Optical mapping, die op een relatief eenvoudige wijze een vrijwel compleet A-tot-Z-overzicht van het genoom zichtbaar maken.¹² Niettemin worden de ontwikkelingen momenteel zonder twijfel aangevoerd door 'next generation sequencing'. De stormachtige ontwikkeling die hier gaande is, zorgt ervoor dat op moleculair-technisch niveau een genoom van een bacterie nu al in

één uur bepaald kan worden (zonder voorbereidingstijd en data-analysetijd). De technische voorbereidingen zijn ook redelijk goed onder controle; het grootste probleem schuilt momenteel echter in de data-analyse. Niettemin zal deze techniek zijn intrede doen, mogelijk als typeringstechniek of referentiemethode. Deze is feitelijk recent al min of meer toegepast bij de EHEC-uitbraak in Duitsland waar met behulp van whole-genome sequencing op relatief zeer korte tijd de precieze samenstelling van het genoom van de betreffende stam geheel gekarakteriseerd is. Ook de analyse van de Mexicaanse griep is een schoolvoorbeeld gebleken van snelle viruskarakterisering; de daaruit resulterende genetische informatie werd binnen korte tijd voor de hele wereld beschikbaar. Hierbij spelen factoren zoals de kleinere genoomgrootte en grotere genoomvariabiliteit uiteraard een belangrijke rol, wat ook specifieke eisen aan de sequence-analyse stelt. De vraag is of deze whole-genome sequence-techniek ook geschikt is binnen ziekenhuisomgevingen en vooral of deze mate van resolutie nodig is. Ook met de huidige (eenvoudige) moleculaire technieken kunnen we al heel goed transmissie van micro-organismen aantonen. Daarmee zou het dus zeer wel kunnen dat met name voor specifieke uitbraakstammen een whole-genome sequencing-analyse (zonder tijdsdruk) plaats kan vinden terwijl ondertussen het ziekenhuis op basis van snelle testen al maatregelen treft. Het voordeel van whole-genome sequencing is onmiskenbaar het aantonen van allerlei mogelijke genen en mutaties in genen die leiden tot resistentie en eventuele virulentie. Bij de huidige typeringsmethoden is dit niet mogelijk. Daarvoor moeten nog andere testen als microarray voor ESBL worden ingezet. De gegevens uit whole genome sequence-data zullen leiden tot identificatie van meer specifieke merkers welke dan weer tot een versnelling van integratie van resistentie merker testen in huidige typeringsmethoden zou kunnen leiden welke een zeer zinvolle toevoeging zou zijn. Kortom, genoomanalyse zal zeker een belangrijke rol gaan spelen mogelijk als typeringstechniek maar zeker als referentiemethode. Binnen het terrein van infectiepreventie zou volstaan kunnen worden met de huidige methoden mits die nog wat in snelheid toenemen en mits er resistentiebepaling aan toegevoegd kan worden.

Tot slot dien opgemerkt te worden dat hetgeen hier beschreven is, verre van volledig is; er bestaan zeker nog meer bruikbare typeringstechnieken. Voor informatie hierover verwijzen we graag naar onze website: www.microtyping.nl, waar vanaf nu steeds meer uitgebreide protocollen worden gepubliceerd.

Referenties

1. Belkum A van, Tasios PT, Dijkshoorn L, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *CMI*. 2007;13:1-46.
2. Huijsmans CJ, Schellekens JJ, Wever PC, et al. Single-nucleotide-polymorphism genotyping of *Coxiella burnetii* during a Q fever outbreak in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol*. 2011 Mar;77(6):2051-7. Epub 2011 Jan 21.
3. Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin. Microbiol.* 2006;Rev. 19(3):512-30.
4. Mooij MJ, Willemsen I, Lobbrecht M, et al. Integron class 1 reservoir among highly resistant gram-negative microorganisms recovered at a Dutch teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30:1015-8.
5. Al Naiemi N, Duim B, Savelkoul P, et al. Widespread transfer of resistance genes between bacterial species on an Intensive Care Unit: implications for hospital epidemiology. *J. Clin. Microbiol*, 2005;43:4862-4.
6. Salzman TC, Scher CD, Moss R. Shigellae with transferable drug resistance: outbreak in a nursery for premature infants. *J Pediatr*. 1967;71(1):21-6.
7. Thomas FE, Jackson RT, Melly A, Alford RH. Sequential hospitalwide outbreaks of resistant *Serratia* and *Klebsiella* infections. *Arch Intern Med*. 1977;137(5):581-4.
8. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One*. 2011;6(7).
9. Schouls LM, Spalburg EC, Luit M van, et al. Multiple-locus variable number tandem repeat analysis of *Staphylococcus aureus*: comparison with pulsed-field gel electrophoresis and spa-typing. *PLoS One*. 2009;4(4):e5082. Epub 2009 Apr 3.
10. Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse H-J, et al. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2010;60:249-66.
11. MacLean D, Jones JD, Studholme DJ. Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(4):287-96.
12. Schwan WR, Briska A, Stahl B, et al. Use of optical mapping to sort uropathogenic *Escherichia coli* strains into distinct subgroups. *Microbiology*. 2010;156(Pt 7):2124-35. Epub 2010 Apr .

Biofysische methoden: nieuwe klinisch microbiologische diagnostiek

R. te Witt, A. van Belkum, W. van Leeuwen

Samenvatting

De huidige klinisch microbiologische diagnostiek is voor een belangrijk deel gebaseerd op microscopie en kweek. Laboratoria kunnen met behulp van goedkope kweekmedia en relatief simpele technieken grote aantallen klinische monsters verwerken. Bovendien levert deze strategie bacteriële isolaten op, die verder kunnen worden gekarakteriseerd, zoals meer gedetailleerde speciesidentificatie, antibioticumgevoeligheidsprofiel en, in speciale gevallen, epidemiologische typering voor uitbraakanalyse. In de afgelopen jaren zijn er diverse nieuwe diagnostische technieken ontwikkeld met als doel tijdbesparing en hogere nauwkeurigheid. Naast de verschillende varianten van nucleïnezuuramplificatietechnieken is er een duidelijke ontwikkeling in de diagnostische toepassing van biofysische methoden. In dit overzicht worden enkele voorbeelden besproken; matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight massa spectrometrie (MALDI-TOF MS), de 'elektronische neus' en Ramanspectroscopie.

Moleculaire diagnostiek

Introductie

In de dagelijkse routine van een klinisch microbiologisch laboratorium kunnen pathogenen op verschillende manieren worden aangetoond. De meest gebruikte methoden zijn kweek, microscopie en indirecte (antigeen- en antilichaam) detectie. Moleculaire diagnostiek is een belangrijke aanvulling binnen het klinisch microbiologisch laboratorium. Met behulp van moleculaire technieken kunnen pathogenen gedetecteerd en geïdentificeerd worden op basis van species-unique nucleïnezuur targets. Polymerase Chain Reaction (PCR) is hierin de meest toegepaste techniek.¹ Real-time PCR mag worden beschouwd als de belangrijkste innovatie binnen de (moleculaire) diagnostiek.²⁻⁴ Deze techniek combineert targetamplificatie met detectie van het product door middel van een fluorescerende probe in een gesloten systeem. Dankzij dit gesloten systeem is het risico op contaminatie bij real-time PCR verwaarloosbaar. Amplificatie en detectie vinden plaats binnen 1 á 2 uur, wat beduidend sneller is dan conventionele PCR met bijbehorende post-amplificatiestappen. Daarnaast vereist het uitvoeren van real-time PCR duidelijk minder hands-on-time en expertise.

Door deze combinatie van excellente sensitiviteit en specificiteit, het lage contaminatierisico, het gemak van uitvoering en de snelheid, heeft real-time PCR een zeer belangrijke positie ingenomen in de diagnostiek van infectieziekten.

Naast deze voordelen zijn er uiteraard ook nadelen van PCR. Er bestaat een kans op foutpositieve (specificiteitsproblemen, toch contaminatie) of foutnegatieve (lage sensitiviteit, variabiliteit in het target, remming) resultaten. Tevens levert PCR geen bacteriële isolaten op, waarmee bepaalde vervolgonderzoeken worden uitgesloten.

Typeren van bacteriën

Na klassieke detectie en identificatie van (antibioticumresistente) bacteriën, kan het noodzakelijk zijn om klonale verwantschappen tussen deze bacteriën vast te stellen (ook wel subtyperen genoemd). Hierdoor kan mogelijke transmissie worden opgespoord en worden bepaald of het instellen van infectiepreventiemaatregelen nodig is. Daarnaast kan subtyperen worden ingezet voor visualisatie van (inter)nationale verspreiding van bacteriële (multidrugresistente) kloons. Tegenwoordig wordt in het microbiologische laboratorium een aantal genotypeertechnieken gebruikt, zoals pulsed-field gel electroforese (PFGE) van restrictiefragmenten van genomisch DNA, multilocus variable number of tandem repeat analyse (MLVA) en op sequentie gebaseerde benaderingen (*spa*-sequence typing en multilocus sequence typing; MLST) (tabel 1). Doordat deze technieken complex, kostbaar en/of bewerkelijk zijn, wordt typering voornamelijk pas uitgevoerd wanneer er voldoende aantallen zijn (bijvoorbeeld stammen van ≥ 5 patiënten).

Auteurs: A. van Belkum, Microbiology Research Unit, bioMérieux, La Balme les Grottes, Frankrijk, W. van Leeuwen, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Rotterdam. Correspondentieadres: R. te Witt, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Rotterdam, s Gravendijkwal 230, 3015 CE Rotterdam, e-mail: r.tewitt@erasmusmc.nl.

Tabel 1. Vergelijking van de huidig beschikbare moleculaire typeringstechnieken.

| Methodie | Principe/target | Voor | Tegen |
|--|---|--|---|
| Pulsed-field gel electroforese (PFGE) | Restrictie polymorfisme van het complete genoom | - Hoog onderscheidend vermogen | - Moeilijk - Traag - Beperkte portabiliteit - Geen standaard nomenclatuur |
| Multilocus sequence typing (MLST) | Sequentie bepaling van allelvarianten van huishoudgenen | - Fylogenetische structuur van het kerngenoom - Portabiliteit - Standaard nomenclatuur | - Beperkt onderscheidend vermogen - Lage capaciteit - Duur |
| Spa-sequence typing (alleen voor <i>Staphylococcus aureus</i> -typering) | Polymorfisme in aantal en sequentie van repeat elementen van het hypervariabel deel van het <i>spa</i> -gen | - Snel - Grote capaciteit - Portabiliteit - Standaard nomenclatuur | - Matig onderscheidend vermogen - Misclassificatie van STs* dankzij recombinatie - Homoplasierisico |
| Rep-PCR typing | Polymorfisme in chromosomale inter-repeat element spacers | - Snel - Grote capaciteit | - Beperkt onderscheidend vermogen - Geen gevalideerde interpretatiecriteria - Geen standaard nomenclatuur |
| Multilocus VNTR-analyse (MLVA) | Polymorfisme in aantal chromosomale VNTR** elementen | - Snel - Grote capaciteit - Standaard nomenclatuur | - Beperkt onderscheidend vermogen - Homoplasie risico |

* ST: sequence type

** VNTR: variable number of tandem repeats

Nieuwe diagnostiek

In het afgelopen decennium zijn er diverse nieuwe diagnostische technieken voor identificatie of typering van micro-organismen ontwikkeld. Naast diverse nucleïnezuuramplificatietechnieken, is er een groeiende interesse in biofysische toepassingen. Deze analytische platformen worden steeds vaker ingezet voor het identificeren of typeren van bacteriën. Het belangrijkste voorbeeld van een dergelijke methode is matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Hierbij worden micro-organismen op basis van het proteoom geïdentificeerd. Een ander voorbeeld met mogelijkheden binnen de microbiologie is de 'elektronische neus'; biosensoren die specifieke geurpatronen van het micro-organisme herkennen en op deze wijze het micro-organisme identificeren. Tot slot wordt in dit artikel Ramanspectroscopie besproken. Hiermee is het mogelijk om bacteriën, maar ook gisten en schimmels, te typeren.

MALDI-TOF MS

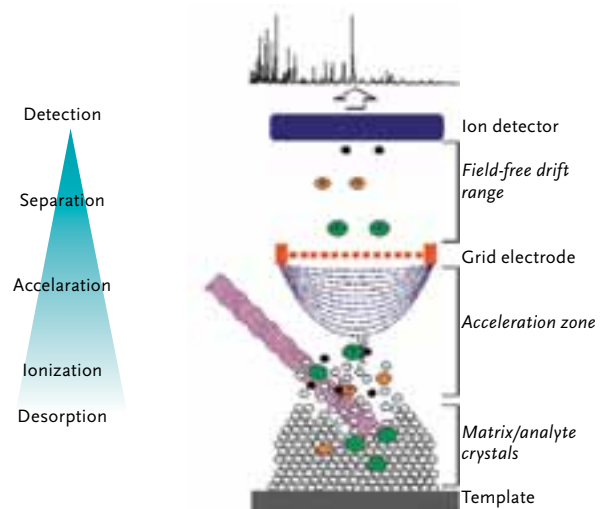
Introductie

MALDI-TOF MS is een relatief nieuwe technologie binnen de microbiologie.^{5,6} De meest voorkomende bacteriële pathogenen en gisten die momenteel worden geïsoleerd in een klinisch microbiologisch laboratorium kunnen met behulp van MALDI-TOF MS worden geïdentificeerd (denk aan *Enterobacteriaceae*, stafylokokken, streptokokken en *Nocardia* spp).⁷⁻⁹ Bovendien zijn er ook veelbelovende resultaten gepubliceerd voor de identificatie van schimmels, *Mycobacterium* spp. en anaerobe bacteriën.⁹⁻¹⁴ De praktische procedure van MALDI-TOF MS is simpel en robuust. Het monster wordt met behulp van een entooop op

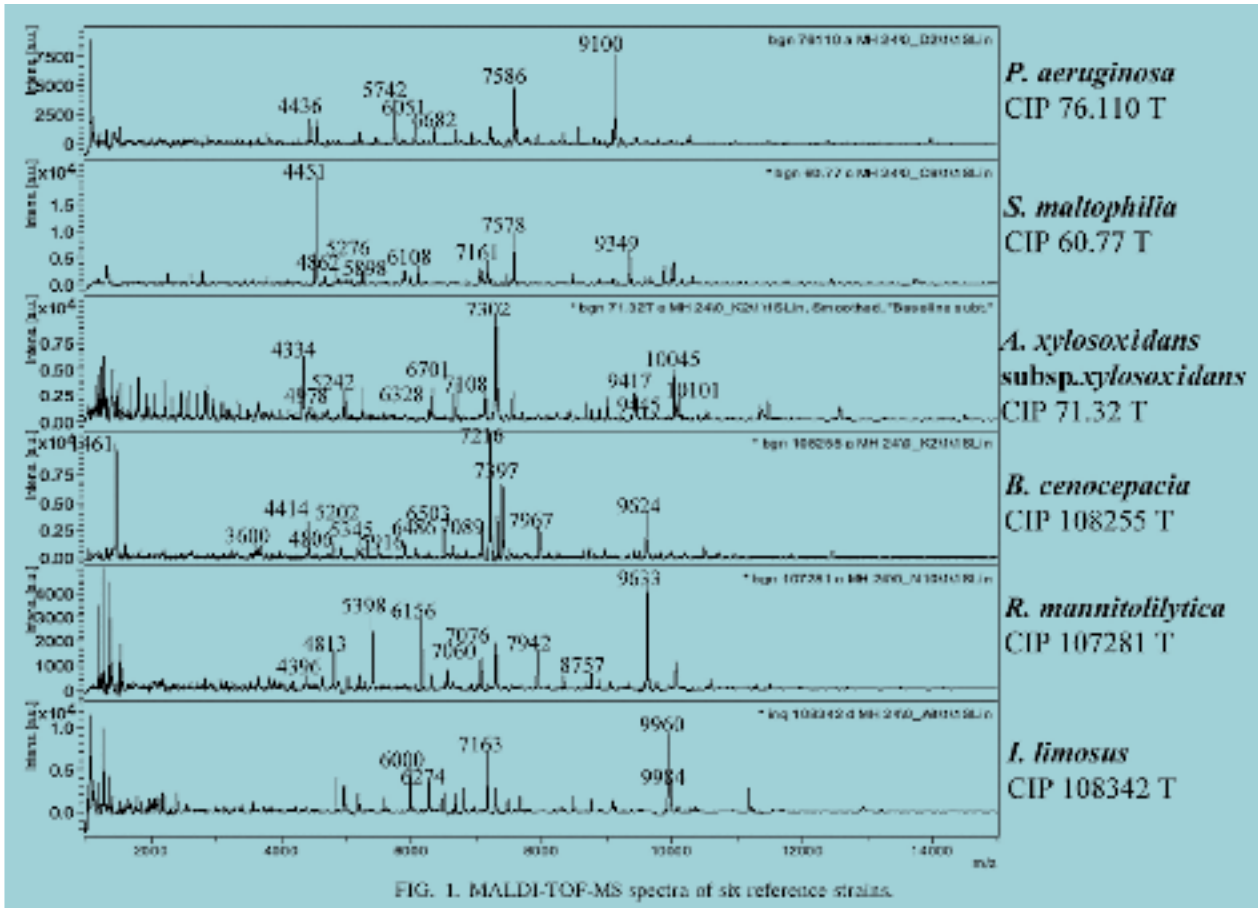
een metalen drager gebracht. De cellen worden vervolgens 'ingebod' in een organische oplossing, de matrix. In *figuur 1* is het principe van de analyse geïllustreerd.

De matrix is om twee redenen noodzakelijk. Allereerst moet het de energie van de laser absorberen en ten tweede stimuleert de matrix efficiënte ionisatie van de bacteriële fragmenten na laserexcitatie. De hierbij ontstane ionen worden in een elektromagnetisch veld tussen het preparaat en een elektrode versneld. Na het passeren van de elektrode komen de ionen in een vacuümbuis, die aan het einde voorzien is van een detector. De 'time-of-flight' van de ionen in deze buis is omgekeerd evenredig met

Figuur 1. Principe van MALDI-TOF MS (met dank aan en toestemming van bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk).



Figuur 2. Voorbeeld van met MALDI-TOF MS gegenereerde spectra. Het onderscheid tussen de verschillende, gerelateerde species is duidelijk te zien (met dank aan en toestemming van Agnès Ferroni, Parijs, Frankrijk¹⁵).



de massa/ladingverhouding (m/z-ratio) van de ionen. Een volledige meetcyclus bestaat uit desorptie, ionisatie, versnelling, scheiding en detectie. Afhankelijk van het soort micro-organisme wordt het monster in 40 tot 100-voud doorgemeten om een gemiddeld massaspectrum te accumuleren. Zoals in *figuur 2* te zien is, leveren verschillende species zeer verschillende spectra.

Bepaalde bacteriesoorten en gisten zijn moeilijk te identificeren met MALDI-TOF MS zoals hierboven beschreven. Voor deze species zijn speciale protocollen ontwikkeld om de kwaliteit van de spectra te verbeteren. Deze protocollen gebruiken chemicaliën om de celwand af te breken, zodat intracellulaire eiwitten vrijkomen. Dit leidt tot een enorme verbetering in de identificatie van deze species.^{8,16} De belangrijkste fase in speciesidentificatie is de vergelijking van het onbekende massaspectrum met een referentiedatabase. Uiteraard zijn de kwaliteit en volledigheid van deze database cruciaal voor een goed prestatievermogen. De database zal referentiespectra van alle klinische belangrijke species moeten bevatten. Daarnaast zal elk species vertegenwoordigd moeten zijn door meerdere referentiestammen per species.

Gedurende de afgelopen jaren zijn er voor routine-diagnostiek twee commerciële systemen met uitgebreide databases en gebruiksvriendelijke software ontwikkeld, MALDI Biotyper van de firma Bruker en Vitek MS van bioMérieux.^{16,17} Hiermee kunnen batches van 100 monsters in iets meer dan een uur worden geanalyseerd. De capaciteit kan mogelijk nog verder worden verhoogd door automatisering van het monstervoorbereidingsproces.

Mogelijke beperkingen

Vanzelfsprekend heeft op MALDI-TOF MS gebaseerde identificatie van micro-organismen ook beperkingen. Sommigen zijn van technische aard, zoals bijvoorbeeld de hoeveelheid cellen die nodig is om tot een betrouwbaar resultaat te komen (10^4 - 10^5 cellen). Hierdoor moet er altijd worden uitgegaan van een geïncubeerde reincultuur, wat een flinke vertraging oplevert in de totale diagnostietijd. Andere beperkingen zijn van biologische aard en leiden tot een beperkte taxonomische resolutie. Voorbeelden hiervan zijn het onvermogen om onderscheid te kunnen maken tussen *E. coli* en *Shigella* spp. en problemen om species binnen het *Streptococcus mitis* complex te kunnen differentiëren.^{17,18} Enerzijds leveren de gemeten ribosomale

eiwitten onvoldoende onderscheidend vermogen, anderzijds is de oorzaak een incomplete database. Verder is in deze gevallen de taxonomische support ook niet volledig en zitten veel taxonomen met deze matige differentiatie in de maag. Anderzijds is massaspectrometrie wel DE methode om dit soort taxonomische problemen te helpen oplossen.

Bovendien zullen in de nabije toekomst de hierboven beschreven tekortkomingen worden opgelost en zal het potentieel van MS voor microbiologische diagnostiek verder worden onderzocht. Een aantal studies heeft de mogelijkheid geëvalueerd om antibioticumresistente stammen te kunnen onderscheiden van gevoelige stammen van hetzelfde species, zoals methicillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en methicillinesensitieve *S. aureus* (MSSA).^{19,20} Tevens zijn er meerdere benaderingen voor de detectie van enzymen die verantwoordelijk zijn voor antibioticaresistentie, zoals β -lactamase, en de snelle detectie van carbapenemresistentie gepubliceerd.²¹⁻²⁴ Verder onderzoek zal moeten uitwijzen of MALDI-TOF MS echt geschikt zal blijken voor snelle, routinematige resistentiebepalingen.

Diverse studies hebben de analyse van mengcultures met MALDI-TOF MS geëvalueerd.^{25,26} Ondanks dat twee of drie bacteriële species simultaan kunnen worden onderscheiden en geïdentificeerd, is het discriminerend vermogen van MALDI-TOF MS tot nu toe te beperkt wanneer één species in het mengsel domineert.^{25,26}

Bij metingen direct in klinische monsters hindert de achtergrond van gastheerfactoren en commensale bacteriën de detectie van potentiële pathogenen. Voor urineweginfecties (UWI), waarin over het algemeen een enkel species domineert, is betrouwbare identificatie van de veroorzaker van UWI wel beschreven.²⁷ Identificatie van pathogenen direct uit patiëntenbloed is lastig vanwege de lage bacteriedichtheid. Hierdoor is er te weinig biomassa om een (betrouwbaar) spectrum te genereren. Wel is het recentelijk gelukt om pathogenen direct vanuit positieve bloedkweken te identificeren.²⁸

Momenteel zijn de mogelijkheden om met MALDI-TOF MS te typeren beperkt. Vooruitgang in monstervoorbereiding en nieuwe benaderingen van data analyse zullen het discriminerend vermogen van MALDI-TOF MS wellicht kunnen verhogen.²⁹

Conclusie

MALDI-TOF MS zorgt momenteel voor een revolutie binnen de medisch microbiologische diagnostiek. Dit blijkt uit de significante toename van het aantal wetenschappelijke publicaties en presentaties tijdens medisch microbiologische congressen. In de komende 5 tot 10 jaar zullen biochemische identificatietechnieken worden vervangen door biofysische methoden, bijvoorbeeld via een combinatie van MALDI-TOF MS en geautomatiseerde

antibioticumgevoeligheidstesten, zoals Vitek (bioMérieux) of Phoenix (BD Diagnostics). De toevoeging van geautomatiseerde monstervoorbereiding zal MALDI-TOF MS tot een (voorlopig) niet meer weg te denken identificatieplatform maken.

Elektronische neus

Introductie

Eén van de praktische deelaspecten in de conventionele bacteriologische diagnostiek is de specifieke geur van sommige bacteriesoorten, zoals *Clostridium difficile* (ruikt naar een 'paardenstal'), *Haemophilus influenzae* ('verbrande karamel') en *Pseudomonas aeruginosa* ('bloesem'). Gezien de eenvoud en het gemak van diagnostiek op basis van geur zou dit een aantrekkelijk alternatief kunnen zijn voor de snelle identificatie van micro-organismen.

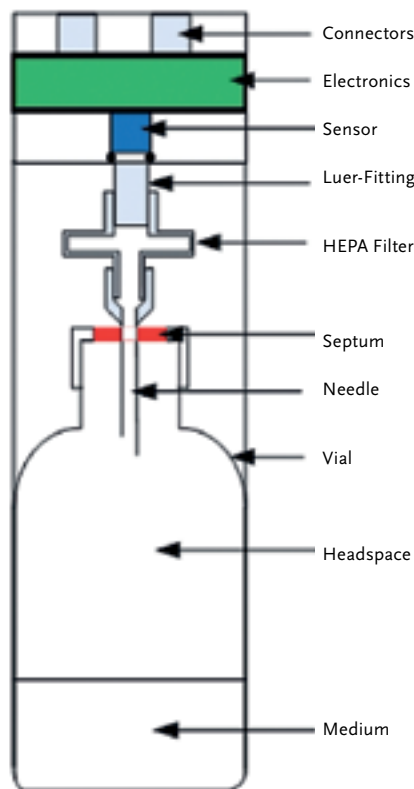
Het concept van een elektronische neus ontstond in de jaren zeventig van de vorige eeuw. De beschikbaarheid van computers maakte het mogelijk om, analoog aan de manier waarop mensen karakteristieke geuren herkennen, met behulp van biosensoren patronen te herkennen in metingen uit complexe mengsels van bekende vluchtige stoffen. Vandaar de naam 'elektronische neus'. Micro-organismen produceren tijdens de groei een breed scala aan vluchtige verbindingen. Het metabolisme van micro-organismen verloopt via verschillende routes, die worden bepaald door de (genetische) mogelijkheden van een micro-organisme en door de beschikbare nutriënten uit de omgeving. Door middel van het meten van vrijgekomen vluchtige organische stoffen (VOS), kan de analyse van de metabole activiteit leiden tot de ontwikkeling van een snel identificatiesysteem.

E-nose

Waarbij alle andere beschreven elektronische neuzen gebruik maken van een statische meting door middel van één enkele meetsensor, is door het bedrijf C-it uit Zutphen een elektronische neus, de MonoNose, ontwikkeld waarin de complexe bacteriologische VOS-signalen dynamisch worden gemeten met meerdere metaaloxidesensoren, de E-nose.³⁰ De E-nose is een breed inzetbaar, goedkoop systeem, dat real-time VOS-patroonanalyses uitvoert (figuur 3).

Vervolgens worden de gevonden patronen vergeleken met een referentiedatabase, waardoor bacteriën kunnen worden geïdentificeerd. In de eerdergenoemde studie zijn elf verschillende, klinisch relevante bacteriesoorten getest.³⁰ In totaal zijn 52 verschillende stammen gemeten, waarbij een diagnostische specificiteit is gevonden van 100% voor *Clostridium difficile* tot 67% voor *Enterobacter cloacae*, met een overall-gemiddelde van alle geteste species van 87%. Dankzij een continu meetproces kan betrouwbare identificatie worden bewerkstelligd in vier tot acht uur. Dit

Figuur 3. Samenstelling van de MonoNose (met dank aan en toestemming van Marcel Bruins, C-it, Zutphen).



onderzoek ging uit van een reïncultuur en niet van direct klinisch materiaal, zodat een extra kweekstap noodzakelijk is bij de identificatie van de potentiële verwekker. Diverse klinische materialen, zoals urine en bloed, zullen moeten worden getest om de invloed van het monster en de mogelijkheden en beperkingen van direct meten te bepalen.

Mogelijke beperkingen

Vanzelfsprekend heeft ook de identificatie van micro-organismen op basis van VOS beperkingen. De in het medium aanwezige voedingsstoffen zullen sneller uitgeput zijn bij een hoog startinoculum. Hierdoor ontstaat de noodzaak om te wisselen van metabole route, wat de analyse(tijd) van de MonoNose zal veranderen. Op dit moment is de diagnostische reproduceerbaarheid nog onvoldoende in kaart gebracht; met name de invloed van humane componenten in de directe monsters is een potentieel obstakel.

De relatie tussen incubatietemperatuur en replicatiesnelheid is bekend. Veranderingen in incubatietemperatuur zullen hierdoor leiden tot een gewijzigd geurpatroon. Daarnaast is het geurpatroon afhankelijk van de concentratie van nutriënten aanwezig in het medium. Bovendien zijn alle hierbovengenoemde invloeden organisme-afhankelijk. Dit alles maakt het creëren van een referentiedatabase lastig.

Conclusie

Het beperken van de invloed van bovengenoemde factoren is cruciaal voor de bruikbaarheid van elektronische neuzen voor de (directe) identificatie van micro-organismen. Directe real-time identificatie van pathogene bacteriën uit klinisch materiaal zou een echte point-of-care test kunnen zijn. Denk hierbij bijvoorbeeld aan een wondverband met geïntegreerde MonoNose. In het geval van een wondinfectie kan de MonoNose een signaal geven ruim voor er klinische symptomen kunnen worden waargenomen door de arts of verpleging. Daarnaast kan men denken aan de directe analyse van uitademingsgassen voor de diagnostiek van pneumonie of tuberculose.

Ramanspectroscopie

Introductie

Het Centrum voor Optische Diagnostiek & Therapie (CODT) van het Erasmus MC in Rotterdam ontwikkelt analytische en therapeutische toepassingsmogelijkheden die gebaseerd zijn op Ramanspectroscopie. De afdeling werkt hierbij nauw samen met de afdelingen pathologie en urologie (gezond en ziek weefsel verschillen in moleculaire samenstelling), dermatologie (diagnose en classificatie van huidtumoren en diverse huidziekten) en medische microbiologie (moleculaire samenstelling van microbiële monsters, species-identificatie en typering van bacteriën).³¹⁻³³

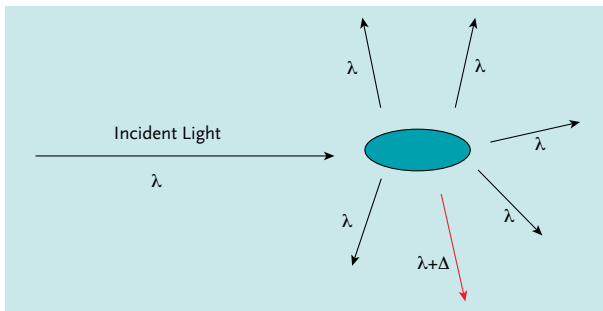
Ramanspectroscopie is genoemd naar zijn ontdekker, de Indiase natuurkundige Chandrasekhara Venkata Raman. In 1928 vond Raman als eerste experimenteel bewijs voor in-elastische verstrooiing van licht door materie.³⁴ Voor deze ontdekking "of extraordinary great importance for our knowledge of the structure of molecules" ontving Raman in 1930 de Nobelprijs voor de natuurkunde.

Principe van Ramanspectroscopie

Wanneer materie in het algemeen of een molecuul in het bijzonder wordt aangestraald met (monochromatisch) licht, zullen de meeste opvallende fotonen worden verstrooid met dezelfde, identieke golflengte. Dit proces wordt elastische verstrooiing genoemd. Echter, een zeer klein gedeelte van het licht zal in-elastisch worden verstrooid en zal, door het energieverlies, in golflengte afwijken van het opvallende licht. Dit proces wordt Ramanverstrooiing genoemd (figuur 4).

Atomen in een molecuul vibreren rond een evenwichtstoestand. Wanneer er Ramanverstrooiing plaatsvindt, zal een opvallend foton iets van zijn energie overdragen op het molecuul. Dit resulteert enerzijds in verhoogde vibratie(s) tussen de atomen van het molecuul en anderzijds in een foton met lagere energie. Deze lagere energie leidt tot een verandering in golflengte die wordt gemeten met behulp van de detector van de Ramanspectrometer.

Figuur 4. Ramanverstrooiing. Het opvallende licht (incident light λ) wordt via het molecuul verstrooid, wat resulteert in licht met dezelfde golflengte (λ), en voor een zeer klein gedeelte in licht met een verandering in golflengte ($\lambda+\Delta$) (met dank aan en toestemming van Kees Maquelin).



De hoeveelheid energie die nodig is om te zorgen voor vibratie van het molecuul is afhankelijk van de massa van de atomen, hun chemische verbindingen, de moleculaire structuur, de micro-omgeving (zoals pH) en de interacties van het molecuul met de omgeving. Op deze manier heeft elk soort molecuul een uniek Ramanspectrum en dragen alle moleculen van een monster (bijvoorbeeld een bacteriecel) bij aan het totale Ramanspectrum, waarbij de intensiteit van het Ramansignaal afhankelijk is van de concentratie. Dit alles verklaart de moleculaire specificiteit van Ramanspectra.

Om zeer precies de golflengteverschillen tussen opvallend en verstrooid licht te kunnen bepalen, wordt er gebruik gemaakt van monochromatisch licht en een zeer nauwkeurige en gevoelige detector om een Ramanspectrum van een monster te verkrijgen.

Instrument

Tegenwoordig is een Ramanspectroscopie relatief simpel en samengesteld uit vier basiscomponenten: een laser (monochromatisch licht), een monsterplaats (aanstralen van het monster), een spectrometer (detectie van het verstrooid licht) en een computer (analyse van de verzamelde spectra).

Aangezien Ramanspectroscopie geen gebruik maakt van signaalversterkende stoffen zoals labels of kleurstoffen, is het noodzakelijk dat het monster zeer zuiver is. Iedere vorm van contaminatie draagt bij aan het Ramanspectrum en zal interfereren met (het resultaat van) de analyse.

Een hoge reproduceerbaarheid is van groot belang om de variatie binnen één groep kleiner te houden dan de variatie tussen twee groepen. Alleen dan kan er onderscheid worden gemaakt tussen twee nauw verwante stoffen of bacteriën.

Aangezien monsters (bijna) altijd worden gemeten op een ondergrond dient deze een reproduceerbare samenstelling te hebben en minimaal bij te dragen aan het Ramanspectrum. Indien dit niet het geval is, zal deze achtergrond interfereren met (het resultaat van) de analyse.

Bacterieel typeren

Ramanonderzoek binnen het CODT heeft in 2009 geleid tot de introductie van een commercieel typeringssysteem, de SpectraCellRA (SCRA) (River Diagnostics, Rotterdam). Dit systeem analyseert de klonale verwantschap tussen bacteriestammen. De workflow is simpel, met weinig hands-on-time. In het kort: isolaten worden 20 uur geïncubeerd op Trypticase Soy Agar (TSA). Biomassa wordt van deze platen gehaald en gesuspenseerd in water. Deze suspensie wordt overgebracht op een MicroSlide (een objectglas van kwarts). Het glaasje wordt aan de lucht gedroogd en de Ramanspectra kunnen worden gemeten (figuur 5).

Wanneer alle metingen zijn uitgevoerd, worden de Ramanspectra in silico met elkaar (en eventueel met een database) vergeleken. Vervolgens worden correlatiecoëfficiënten tussen de monsters berekend waarmee de verwantschappen tussen de verschillende monsters worden weergegeven.

Mogelijke beperkingen

Ondanks het enorme potentieel aan mogelijkheden, zijn er ook beperkingen aan Ramanspectroscopie. Ramanspectroscopie is een fenotypische methode, waarbij verschillen in kweekmedium, incubatietemperatuur of -tijd in theorie voor verschillen kunnen zorgen in Ramanspectra. Dit soort problemen kan alleen worden ondervangen door het gebruik van kweekmedia van constante kwaliteit en het aanhouden van strikte incubatietijden. Daarnaast is er nog geen standaard nomenclatuur, wat ervoor zorgt dat de overdraagbaarheid van resultaten niet optimaal is; er is (nog) geen gouden standaard, dus kan een gevonden Ramantype overal anders genoemd worden.

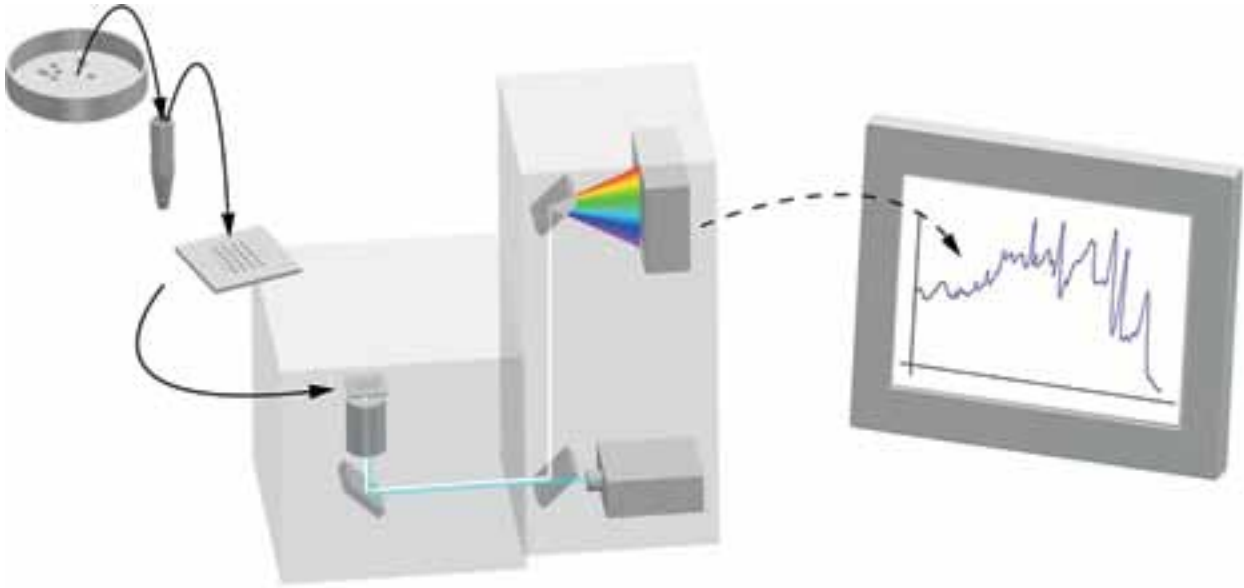
Conclusie

Ramanspectroscopie is bruikbaar binnen de medisch microbiologische diagnostiek dankzij de eenvoud, reproduceerbaarheid en het hoge discriminerende vermogen. Met weinig biomassa kan gemakkelijk worden bepaald of twee (of meer) individuen met dezelfde bacteriestam zijn gekoloniseerd of geïnfecteerd. Gedetailleerde analyse van de toepasbaarheid van Ramanspectroscopie in het veld van antibioticumresistentiebepaling is tot op heden nog nauwelijks uitgevoerd.

Conclusie

We kunnen stellen dat conventionele diagnostiek nog altijd aanwezig is en de komende jaren aanwezig zal blijven in de klinische microbiologie. Moleculaire diagnostiek vormt hierop een prima toevoeging, maar met beperkingen. MALDI-TOF MS is uitermate geschikt voor high-throughput en snelle identificatie van veel klinisch relevante bacteriën en gisten. De MonoNose heeft de potentie om ontwikkeld te worden voor directe detectie en

Figuur 5. Workflow voor de SpectraCellRA analyzer (met dank aan en toestemming van Kees Maquelin).



identificatie van micro-organismen (bed-sitetest) voor de diagnostiek van infectieziekten. Op het gebied van typeren is Ramanspectroscopie een kandidaat voor snelle typering in grote en kleine routinelaboratoria.

Abstract

Current diagnostics of infectious diseases is primarily based on conventional microscopy and culture. Essentially, laboratories can perform simple tests on a large number of clinical samples on a daily basis, using inexpensive culture media and simple techniques. This strategy also provides bacterial isolates, which can be further characterized with respect to detailed identification of the species, antibiotic susceptibility and, in special cases, epidemiological typing for outbreak analysis. Many new diagnostic techniques have been developed during the past two decades, all with the objective to save time and to improve accuracy. Next to nucleic acid amplification techniques, there is a trend towards the use of biophysical technologies, such as matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), the “electronic nose” and Raman spectroscopy. These platforms will be discussed in this overview.

Referenties

- Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
- UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* 1996;6:995-1001.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996;6:986-94.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:276-80.
- Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB. The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol.* 1996;14:1584-6.
- Pielele U, Zurcher W, Schar M, Moser HE. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for the mass and sequence analysis of natural and modified oligonucleotides. *Nucleic Acid Res.* 1993;21:3191-6.
- Bizzini A, Durussel C, Bille J, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 549-54.
- van Veen SQ, Claas EC, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. *J Clin Microbiol.* 2010;48:900-7.
- Dupont C, Sivadon-Tardy V, et al. Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:998-1004.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect.* 2011; Epub ahead of print.
- Justesen US, Holm A, Knudsen E, et al. Species Identification of Clinical Isolates of Anaerobic Bacteria: a Comparison of Two Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems. *J Clin Microbiol.* 2011; Epub ahead of print.
- Pignone M, Greth KM, Cooper J, et al. Identification of mycobacteria by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2006;44:1963-70.
- Saleeb PG, Drake SK, Murray PR, Zelazny AM. Identification of mycobacteria in solid-culture media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:1790-4.
- Veloo AC, Knoester M, Degener JE, Kuijper EJ. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:1501-6.
- Degand N, Carbonelle E, Dauphin B, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3361-7.
- Cherkaoui, A, Hibbs, J, Emonet, S, et al. Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

- methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J Clin Microbiol.* 2010;48: 1169-75.
17. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1614-9.
 18. Welker M, Moore ER. Applications of whole-cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systemic microbiology. *Syst Appl Microbiol.* 2011;34:2-11.
 19. Du Z, Yang R, Guo Z, et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;74:5487-91.
 20. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ, et al. Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol.* 2000;49:295-300.
 21. Camara JE, Hays FA. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2007;389: 633-8.
 22. Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ, et al. Characterization of beta-lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 2011;Epub ahead of print.
 23. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3321-4.
 24. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3222-7.
 25. Wahl KL, Wunschel SC, Jarman KH, et al. Analysis of microbial mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem.* 2002;74:6191-9.
 26. Warscheid B, Fenselau C. A targeted proteomics approach to the rapid identification of bacterial cell mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proteomics* 2004;4:2877-92.
 27. Ferreira L, Sanchez-Juanes F, Gonzalez-Avila M, et al. Direct identification of urinary tract pathogens from urine samples by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2010;48:2110-5.
 28. Drancourt M. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16: 1620-5.
 29. Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol. Rev* 2011; Epub ahead of print.
 30. M, Bos A, Petit PL, Eadie K, et al. Device-independent, real-time identification of bacterial pathogens with a metal-oxide-based olfactory sensor. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28: 775-80.
 31. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods.* 2002;51:255-71.
 32. Willems-Erix DF, Scholtes-Timmerman MJ, Jachtenberg JW, et al. Optical fingerprinting in bacterial epidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method. *J Clin Microbiol.* 2009;47:652-9.
 33. Willems-Erix DF, Jachtenberg JW, Schut TB, et al. Towards Raman-based epidemiological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biophotonics.* 2010;3:506-11.
 34. Raman CV. A new type of radiation. *Nature* 1928;121:501-2.

Moleculaire typering van *M. pneumoniae*

E.B.M. Spuesens, N.G. Hartwig, A.M.C. van Rossum, C. Vink

Samenvatting

De luchtwegpathogeen *Mycoplasma pneumoniae* wordt traditioneel beschouwd als een genetisch stabiele bacterie. Naast de twee dominante subtypes van *M. pneumoniae* (subtype 1 en subtype 2), kunnen echter een groot aantal genetische varianten van de bacterie worden onderscheiden. Deze varianten verschillen van elkaar in de sequentie van het MPN₁₄₁-gen dat codeert voor een belangrijk oppervlakte eiwit (het P1-eiwit). In dit artikel worden de beschikbare moleculaire typeringstechnieken beschreven waarmee de verschillende varianten van *M. pneumoniae* kunnen worden onderscheiden.

Trefwoorden

Mycoplasma pneumoniae, genetische variatie, DNA-recombinatie

Inleiding

Mycoplasma pneumoniae is een humaan luchtwegpathogeen dat tot de klasse van de *Mollicutes* behoort. De bacteriën uit deze klasse, waarvan gedacht wordt dat ze geëvolueerd zijn uit een grampositieve voorouder, hebben geen celwand, en vertegenwoordigen de kleinste micro-organismen die in staat zijn tot autonome replicatie. In overeenstemming met hun cellulaire dimensies, is ook het genoom van deze bacteriën relatief klein. Ter illustratie, het genoom van *M. pneumoniae* (stam M129) heeft een lengte van 816.394 baseparen (bp), hetgeen ongeveer zes maal kleiner is dan het genoom van *Escherichia coli*.¹

M. pneumoniae is een veroorzaker van een verscheidenheid aan luchtweginfecties, zoals tracheobronchitis, faryngitis en pneumonie. Ongeveer 40% van alle gevallen van 'community-acquired pneumonia' wordt veroorzaakt door *M. pneumoniae* en verreweg de meeste van deze gevallen (80-85%) komen voor op de kindereleeftijd.¹ Enkele internationale studies hebben laten zien dat *M. pneumoniae*-infecties in de populatie een golfpatroon vertonen, waarbij ongeveer elke 10 jaar een dominerend type bacterie wordt vervangen door een ander type.² Een gevolg hiervan is dat de frequentie van infecties met *M. pneumoniae* van jaar tot jaar sterk kan verschillen. Uit de recente 'virologische weekstaten' (<http://www.rivm.nl>) is op te maken dat er ten opzichte van voorgaande jaren in de laatste maanden van 2011 een sterke stijging is geweest in het aantal gerap-

porteerde *M. pneumoniae*-gevallen in Nederland. Dit suggereert dat er in deze periode dus een verschuiving heeft plaatsgevonden in het heersende bacteriële genotype. Typeringsonderzoek in de komende maanden zal moeten uitwijzen of dit inderdaad het geval is geweest. Het is evident dat moleculaire typering dus een belangrijke rol kan spelen in het vervolgen van de verspreiding van specifieke varianten van *M. pneumoniae* en het begrijpen van de epidemiologie van infecties met deze bacterie. Daarnaast is moleculaire typering ook belangrijk voor het vaststellen van een relatie tussen genotypes van *M. pneumoniae* en klinische parameters, waaronder de ernst en aard van de infecties veroorzaakt door deze bacterie. Op dit gebied is echter nog zeer weinig bekend. Eén van de oorzaken hiervoor is dat er nog geen gouden standaard bestaat voor de typering van *M. pneumoniae*-isolaten. In dit artikel zullen we de belangrijkste typeringsmethoden bespreken die voor deze bacteriesoort in de literatuur beschreven staan. Een belangrijk uitgangspunt hierbij is een grondige kennis over de genetische variabiliteit van *M. pneumoniae*. Deze variabiliteit zal daarom eerst worden geïntroduceerd.

Genetische variatie

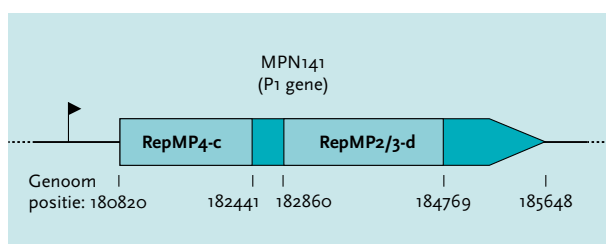
Op dit moment zijn de volledige genoomsequenties bepaald van twee *M. pneumoniae*-stammen (M129 en FH). Deze stammen vertegenwoordigen de twee dominante subtypes van *M. pneumoniae* (subtype 1 en subtype 2) die van elkaar verschillen in basesubstituties en kleine inserties/deleties die door het gehele genoom aanwezig zijn.³⁻⁹ Ook de lengte van het genoom verschilt tussen beide stammen: het genoom van stam M129 is ongeveer 5 kb kleiner dan dat van stam FH. Hoewel er dus vele verschillen zijn tussen de genoomsequenties van deze stammen, werd *M. pneumoniae* tot voor kort beschouwd als een genetisch stabiel micro-organisme. Het gegeven dat

Auteurs: drs. E.B.M. Spuesens, kinderarts in opleiding, dr. N.G. Hartwig, kinderarts, dr. A.M.C. van Rossum, kinderarts, afdeling Kindergeneeskunde, subafdeling Infectieziekten en Immunologie, Erasmus MC - Sophia Kinderziekenhuis.
Correspondentieadres: dr. C. Vink, moleculair microbioloog, Laboratorium Kindergeneeskunde, Erasmus MC, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam, e-mail: c.vink@erasmusmc.nl

er geen stammen bestaan die hybride subtype 1-/subtype 2-DNA-sequenties bevatten, duidt er overigens wel op dat beide subtypes gescheiden evolutionaire lijnen vertegenwoordigen die niet in staat lijken te zijn tot horizontale DNA-overdracht.

Naast de hierboven beschreven verschillen tussen de twee subtypes van *M. pneumoniae*, bestaat er ook sequentievariatie in het gen dat codeert voor het essentiële bacteriële oppervlakte-eiwit P1. Dit gen (MPN141) kan sequentievariatie (antigene variatie) ondergaan als gevolg van homologe DNA-recombinatie tussen het gen en DNA-sequenties die zich elders in het genoom van *M. pneumoniae* bevinden. Deze variatie kan zich zowel in subtype 1- als in subtype 2-stammen voordoen. De recombinatie kan uitsluitend plaatsvinden in twee variabele delen van MPN141, die worden aangeduid met 'RepMP4' (repeated element in *M. pneumoniae*-type 4) en 'RepMP2/3' (figuur 1). Het RepMP4-element kan recombineren met in totaal zeven andere RepMP4(-achtige) elementen die verspreid liggen binnen het genoom van *M. pneumoniae*. Deze elementen hebben sequentiehomologie met (maar zijn niet identiek aan) het RepMP4-element in het MPN141-gen. Ten gevolge van homologe recombinatie tussen dit RepMP4-element en een ander RepMP4-element in het bacteriële genoom, kan de sequentie van het MPN141-gen veranderen. Op soortgelijke wijze kan de DNA-sequentie van MPN141 ook veranderen door variatie van het RepMP2/3-element (figuur 1). Van dit RepMP2/3-element zijn elders in het *M. pneumoniae*-genoom negen sequentievarianten aanwezig. De veranderingen in de RepMP4 en RepMP2/3-elementen van het MPN141-gen kunnen leiden tot veranderingen in de aminozuurvolgorde van het P1-eiwit op het oppervlak van de bacterie. Aangezien P1 zeer immunogeen is, kan een verandering in de aminozuurvolgorde van dit eiwit (antigene variatie)

Figuur 1. Schematische weergave van de primaire structuur van het MPN141-gen van *M. pneumoniae*-stam M129. Het MPN141 of P1-gen bevat twee variabele delen (RepMP4-c en RepMP2/3-d) die kunnen veranderen ten gevolge van homologe recombinatie met RepMP4 en RepMP2/3-elementen die zich op andere plekken in het bacteriële genoom bevinden. De posities van de verschillende DNA-elementen in het genoom van stam M129 is onderaan de figuur weergegeven (in baseparen).



leiden tot het (tijdelijk) ontsnappen van de bacterie aan het immuunsysteem. Tot nu toe zijn er verschillende varianten van het MPN141-gen gevonden die het resultaat zijn van homologe DNA-recombinatie.¹⁰⁻¹⁷

Met betrekking tot de recombinatie tussen RepM-elementen in het genoom van *M. pneumoniae* zijn twee belangrijke opmerkingen te maken. Ten eerste is er tot nu toe bij elk recombinatieproces sprake van 'eenrichtingsverkeer', waarbij de sequentie van een bepaald element (de donor-sequentie) de plaats inneemt van een ander element (de ontvanger), zonder dat de sequentie van de donor op zijn originele locatie verandert. Dit mechanisme van 'unidirectionele' homologe DNA-recombinatie wordt genconversie genoemd.^{11,12,18} Ten tweede wordt altijd slechts een deel van het donorelement overgedragen tijdens recombinatie en verandert dus ook slechts een gedeelte van een RepMP-element binnen het MPN141-gen. De lengte van de sequentie die wordt overgebracht kan zeer variabel zijn en varieert van tientallen tot enkele honderden nucleotiden. Omdat er vanuit elk RepMP2/3 en elk RepMP4-element meerdere, kleinere sequenties kunnen worden overgedragen naar het MPN141-gen, is het aantal mogelijke recombinatiegebeurtenissen in theorie zeer groot en kunnen dus een groot aantal verschillende 'MPN141-types' gegenereerd worden.

Moleculaire typering van *M. pneumoniae*

Op basis van de hierboven beschreven genetische variatie van *M. pneumoniae*, kan de moleculaire typering van deze bacterie worden onderverdeeld in: (i) het bepalen van het subtype, en (ii) het bepalen van het 'MPN141-type'. In de afgelopen jaren zijn er verschillende methoden gepubliceerd waarmee *M. pneumoniae* getypeerd kan worden, zoals 'pyrosequencing', real-time PCR met 'high resolution melt analysis' (HRM), multilocus sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) en DNA-sequentie-analyse (tabel 1).^{2,11-13,15,17-24} Een aantal van de belangrijkste technieken zal hieronder worden behandeld.

Subtypering door middel van 'pyrosequencing'

Aangezien de *M. pneumoniae* subtypespecifieke sequenties door het gehele genoom van de bacterie voorkomen, is het niet noodzakelijk om voor het bepalen van het subtype van een isolaat de sequentie te bepalen van grote delen van het genoom. In plaats daarvan kan worden volstaan met het bepalen van een enkele 'single-nucleotide polymorphism' (SNP) in bijvoorbeeld het MPN141 of het MPN528a-gen. Een techniek die hiervoor zeer geschikt is, is 'pyrosequencing'. Dit is een zogenaamde 'real-time sequencing-by-synthesis'-techniek, waarmee relatief korte DNA-sequenties (met een lengte van ongeveer 10 nucleotiden) kunnen worden bepaald.

Tabel 1. Samenvatting van de sinds 2000 gepubliceerde methodes voor het typeren van *M. pneumoniae*.

| Doelwit DNA | Moleculaire techniek | Soort typering | Referentie |
|-------------------------|---|--------------------------|----------------------------|
| Deel van MPN141/MPN528a | Pyrosequencing | Subtypering ^Λ | Spuesens et al., 2010 |
| MPN142/RepMP5 | PCR en sequentie-analyse | Subtypering en MPN142 | Spuesens et al., 2010 |
| Deel van MPN141 | Real-time PCR met HRM [#] | MPN141 | Schwartz et al., 2009 |
| Deel van MPN141 | Real-time PCR met HRM [#] | Subtypering | Schwartz et al., 2009 |
| MPN141/RepMP4/RepMP2/3 | PCR en sequentie-analyse | Subtypering en MPN141 | Spuesens et al., 2009 |
| Tandem repeats | MLVA [§] | Subtypering | Dégrange et al., 2009 |
| MPN141 | PCR-RFLP [®] en sequentieanalyse | MPN141 | Kenri et al., 2008 |
| MPN141 | PCR-RFLP [®] en sequentieanalyse | MPN141 | Pereyre et al., 2007 |
| Huishoudgenen/MPN141 | MLST [¶] en RFLP [®] | Subtypering | Dumke et al., 2003 |
| MPN141 en genoom | RFLP [®] en PFGE [†] | Subtypering | Cousin-Allery et al., 2000 |
| MPN141 | PCR-RFLP [®] | MPN141 | Dorigo-Zetsma et al., 2000 |

[#]HRM: 'high-resolution melt analysis'; [§]MLVA: 'multilocus variable number tandem repeat analysis'; [®]RFLP: 'restriction fragment length polymorphism'; [¶]MLST: 'multilocus sequence typing'; [†]PFGE: 'pulsed-field gel electrophoresis'; ^ΛSubtypering' is het bepalen van het subtype (1 of 2) van een *M. pneumoniae*-isolaat.

Recent zijn twee pyrosequencing assays beschreven voor de subtypering van *M. pneumoniae*.¹³ De belangrijkste voordelen van deze assays zijn dat ze direct toegepast kunnen worden op patiëntenmateriaal en dat ze relatief eenvoudig en snel zijn.¹³ Hoewel de hierbovenvermelde HRM-techniek ook gebruikt kan worden voor subtypebepaling, is de interpretatie van de resultaten van deze methode (waarbij gediscrimineerd moet worden tussen verschillende DNA-smeltcurves) veel moeilijker dan bij pyrosequencing.

MLVA-typering

Een andere veelbelovende methode voor het typeren van *M. pneumoniae*-isolaten is 'multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis' (MLVA).²³ Deze techniek is gebaseerd op de genoomsequentie van *M. pneumoniae*-stam M129, die 17 verschillende VNTR's herbergt. In de MLVA-typeringsassay wordt het aantal kopieën bepaald van vijf van deze VNTR's; dit aantal kan van stam tot stam

variëren. In totaal konden met deze test 26 verschillende MLVA-types (type A tot Z) van *M. pneumoniae* worden onderscheiden. Deze types konden in twee groepen worden onderverdeeld: een subtype 1- en een subtype 2-groep.²³ MLVA kan dus ook gebruikt worden voor het bepalen van het subtype van een isolaat. Inmiddels is deze techniek, die zeer betrouwbaar en reproduceerbaar lijkt te zijn, dusdanig gemodificeerd dat deze ook direct toegepast kan worden op patiëntenmateriaal.²¹

Bepaling van het 'MPN141-type'

Traditioneel zijn de meeste typeringstechnieken voor *M. pneumoniae* gericht op het MPN141-gen. Het probleem bij de analyse van dit gen als doelwit voor typering is echter, zoals hierboven reeds is aangegeven, dat het aantal varianten van dit gen dat theoretisch gevormd kan worden (door middel van homologe DNA-recombinatie), zeer groot is. De typering van MPN141 door middel van PCR-gebaseerde technieken kan daarom soms dubbelzinnige resultaten opleveren. Een voorbeeld hiervan is een methode die gebaseerd op real-time PCR in combinatie met HRM.^{19,20} Eenduidige resultaten kunnen echter wel worden verkregen door beide variabele delen van het MPN141-gen (het RepMP2/3- en het RepMP4-element) geheel te amplificeren en aan DNA-sequentiebepaling te onderwerpen.^{11,12} Vervolgens is het van groot belang de verkregen DNA-sequenties op een systematische wijze te vergelijken en te classificeren. Hiervoor hebben wij in 2009 een classificatiesysteem opgezet, waarmee zowel bekende als nieuwe variaties in MPN141 op een structurele manier kunnen worden beschreven.^{3,4,11,12} In dit classificatie systeem wordt van elke stam niet alleen aangegeven tot welk subtype deze behoort, maar ook welke RepMP4- en RepMP2/3-varianten in het MPN141-gen voorkomen. Hiertoe heeft elk RepMP4- en RepMP2/3-element in het *M. pneumoniae*-genoom een lettercodering gekregen die gebaseerd is op de volgorde waarin ze in het genoom voorkomen (RepMP4-a tot en met -h, en RepMP2/3-a tot en met -j). Een 'normale' (M129-achtige) subtype 1-stam krijgt in deze classificatie de codering: 1-P1(4-c, 2/3-d). De eerste '1' geeft het subtype van de stam aan. Dit wordt gevolgd door 'P1', hetgeen betrekking heeft op het P1-operon waarin het MPN141-gen is gelegen. Vervolgens wordt tussen haakjes de volgorde van de verschillende RepMP-elementen in de twee genen aangegeven. Een subtype 1-stam met een recombinatie tussen het RepMP4-c en het RepMP4-h-element kan als volgt worden aangeduid: 1-P1(4-c[h]c, 2/3-d). De term '4-c[h]c' geeft aan dat het originele 4-c-element ten dele is vervangen door het RepMP4-h-element. Deze term kan eventueel worden aangevuld met de genoomposities van de verschillende elementen, zodat ook duidelijk wordt welke sequenties precies zijn overgedragen naar het RepMP4-c-element in het MPN141-gen.

Ten slotte kan de vraag worden gesteld wat de epidemiologische en evolutionaire waarde is van het bepalen van het MPN141-type. Immers, gedurende elke bacteriegeneratie kan de sequentie van het P1-gen via homologe DNA-recombinatie drastisch veranderen. Een dergelijke verandering kan weliswaar grote gevolgen hebben voor het P1-gen, maar deze verandering heeft geen invloed op de rest van het bacteriële genoom. Hierdoor kunnen bacteriën uit dezelfde klonale bacterielijn dus sterk verschillende P1-sequenties hebben en getypeerd worden als isolaten die geen directe verwantschap hebben. Conclusies over verwantschap kunnen daarom alleen getrokken worden wanneer *M. pneumoniae*-isolaten hetzelfde MPN141-type hebben.

Conclusies

In dit artikel hebben we aan de hand van de genetische variabiliteit van *M. pneumoniae* de actuele moleculaire typeringstechnieken voor deze bacterie beschreven. De belangrijkste uitkomsten hiervan zijn dat: (i) de genetische variabiliteit van *M. pneumoniae* relatief groot is; (ii) *M. pneumoniae*-stammen kunnen worden onderverdeeld in twee genetische subtypes (subtype 1 en subtype 2); (iii) de *M. pneumoniae*-subtypes kunnen worden onderscheiden met behulp van verschillende typeringsmethodes; en (iv) het bepalen van de variatie in het MPN141-gen van beperkte betekenis is voor het vaststellen van de epidemiologische of evolutionaire verwantschap tussen *M. pneumoniae*-stammen.

Ten slotte is op dit moment nog weinig bekend over de relatie tussen het moleculaire (sub)type van *M. pneumoniae* en de (ernst van de) klinische verschijnselen die veroorzaakt worden door deze bacterie. Het is daarom noodzakelijk dat toekomstig onderzoek aan *M. pneumoniae* zich richt op het ophelderen van deze relatie.

Summary

Respiratory pathogen *Mycoplasma pneumoniae* is traditionally considered to be a genetically stable bacterium. However, in addition to the two major subtypes of *M. pneumoniae* (i.e., subtype 1 and subtype 2), a large number of genetic variants of this bacterium have been identified. These variants differ from each other in the sequence of the MPN141 gene, which encodes an important surface protein (the P1 protein). In this paper, the molecular typing techniques will be described that are available for discrimination between *M. pneumoniae* variants.

Literatuur

1. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev. 2004;17:697-728.
2. Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, et al. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005. J Med Microbiol. 2008;57:469-75.

3. Spuesens EB, Hartwig NG, van Rossum AM, Vink C. Sequence variation within the P1 gene of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2011;49:3723-4.
4. Spuesens EB, Hartwig NG, van Rossum AM, Vink C. Identification and classification of P1 variants of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2010;48:680.
5. Su CJ, Dallo SF, Chavoya A, Baseman JB. Possible origin of sequence divergence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun. 1993;61:816-22.
6. Dallo SF, Horton JR, Su CJ, Baseman JB. Restriction fragment length polymorphism in the cytoadhesin P1 gene of human clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun. 1990;58:2017-20.
7. Ruland K, Himmelreich R, Herrmann R. Sequence divergence in the ORF6 gene of *Mycoplasma pneumoniae*. J Bacteriol. 1994;176:5202-9.
8. Sluijter M, Kaptein E, Spuesens EB, et al. The *Mycoplasma genitalium* MG352-encoded protein is a Holliday junction resolvase that has a non-functional orthologue in *Mycoplasma pneumoniae*. Mol Microbiol. 2010;77:1261-77.
9. Estevão S, Sluijter M, Hartwig NG, et al. Functional Characterization of the RuvB Homologs from *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. J Bacteriol. 2011;193:6425-35.
10. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, et al. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res. 1996;24:4420-49.
11. Spuesens EB, van de Kreeke N, Estevao S, et al. Variation in a surface-exposed region of the *Mycoplasma pneumoniae* P40 protein as a consequence of homologous DNA recombination between RepMP5 elements. Microbiology. 2010;157:473-83.
12. Spuesens EB, Oduber M, Hoogenboezem T, et al. Sequence variations in RepMP2/3 and RepMP4 elements reveal intragenomic homologous DNA recombination events in *Mycoplasma pneumoniae*. Microbiology. 2009;155: 2182-96.
13. Spuesens EB, Hoogenboezem T, Sluijter M, et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. J Microbiol Methods. 2010;82:214-22.
14. Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J, Zaai SA. *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. Infect Immun. 2001;69:5612-8.
15. Dumke R, Luck PC, Noppen C, et al. Culture-independent molecular subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. J Clin Microbiol. 2006;44:2567-70.
16. Pereyre S, Charron A, Renaudin H, et al. First report of macrolide-resistant strains and description of a novel nucleotide sequence variation in the P1 adhesin gene in *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains isolated in France over 12 years. J Clin Microbiol. 2007;45: 3534-9.
17. Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y, et al. Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. Infect Immun. 1999;67:4557-62.
18. Vink C, Rudenko G, Seifert HS. Microbial antigenic variation mediated by homologous DNA recombination. FEMS Microbiol Rev., in press.
19. Schwartz SB, Thurman KA, Mitchell SL, et al. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates using real-time PCR and high-resolution melt analysis. Clin Microbiol Infect. 2009;15:756-62.
20. Schwartz SB, Mitchell SL, Thurman KA, et al. Identification of P1 variants of *Mycoplasma pneumoniae* by use of high-resolution melt analysis. J Clin Microbiol. 2009;47:4117-20.
21. Dumke R, Jacobs E. Culture-independent multi-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) of *Mycoplasma pneumoniae*. J Microbiol Methods. 2011;86:393-6.
22. Dumke R, Catrein I, Pirkil E, et al. Subtyping of *Mycoplasma pneumoniae* isolates based on extended genome sequencing and on expression profiles. Int J Med Microbiol. 2003;292:513-25.
23. Degrange S, Cazanave C, Charron A, et al. Development of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2009;47:914-23.
24. Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B, et al. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiol Infect. 2000;124:103-11.

Genotypering van hepatitis-C-virus ten tijde van nieuwe behandelingsmogelijkheden - uitdagingen en oplossingen

J. Schinkel, X. Thomas, R. Molenkamp

Samenvatting

Hepatitis-C-virus (HCV) is een belangrijke veroorzaker van chronische hepatitis. Voor de huidige behandeling met peginterferon en ribavirine, maar ook bij behandeling met nieuwe antivirale middelen is betrouwbare genotypering noodzakelijk voor een goede behandeling. Genotypering van HCV is niet eenvoudig vanwege de grote genetische variabiliteit van het virus. In dit artikel worden de uitdagingen van correcte HCV-genotypering besproken en worden oplossingen aangedragen die kunnen bijdragen aan betrouwbare typering van HCV.

Trefwoorden

Hepatitis-C-virus, genotypering, sequentieanalyse

Inleiding

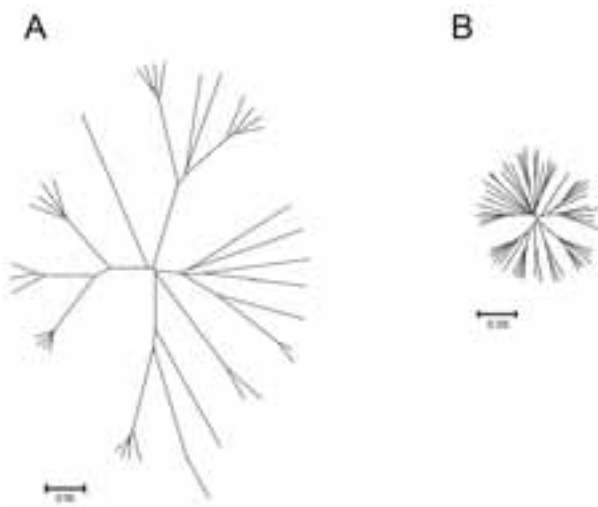
Hepatitis-C-virus (HCV) is overal ter wereld een belangrijke veroorzaker van chronische hepatitis. De acute infectie verloopt in het overgrote deel van de gevallen mild, waardoor de infectie in eerste instantie vaak niet wordt opgemerkt. In 30 tot 50% van de infecties zal de patiënt het virus zelf klaren, maar in de overige gevallen ontstaat er een chronische infectie die na vele jaren leverfibrose, cirrose en hepatocellair carcinoom tot gevolg kan hebben. Bij vergevorderde cirrose is de enige behandeling een levertransplantatie, waarbij de chronische HCV-infectie onverminderd aanwezig blijft. Wereldwijd zijn er zo'n 170 tot 200 miljoen mensen geïnfecteerd met het virus.¹ Daarmee is cirrose ten gevolge van HCV-infectie een van de belangrijkste indicaties voor levertransplantatie. Uit recent onderzoek van het Amerikaanse Center of Disease Control (CDC) is gebleken dat de afgelopen jaren het aantal sterfgevallen dat aan HCV-infectie kan worden toegekend, die van het humaanimmuundeficiëntievirus (HIV) overstijgt.² Wegens het ontbreken van symptomen wordt een aanzienlijk gedeelte van de HCV-infecties niet of pas in een vergevorderd stadium gediagnosticeerd. Verwacht wordt dat de druk op de gezondheidszorg door HCV-infecties de komende jaren verder zal stijgen.

Het virus

HCV is een positief, enkelstrengs RNA-virus van circa 10.000 nucleotiden en vormt een apart genus in de familie van de *Flaviviridae*. Het virus kenmerkt zich onder andere door een zeer grote genetische variabiliteit. Er zijn zes verschillende genotypes gedefinieerd (1 t/m 6), die weer onderverdeeld kunnen zijn in vaak tientallen subtypes (a, b, c, etc.). Deze genotypes verschillen meer dan 30% op nucleotideniveau van elkaar, hetgeen veel is, zelfs in vergelijking met HIV dat erom bekend staat een grote mate van variabiliteit te hebben (*figuur 1*). In Nederland komen de (sub)types 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a en 4d het meest voor. De grote genetische variatie van HCV wordt in de eerste plaats veroorzaakt door het virale RNA-polymerase dat geen "proofreading" kent waardoor bij RNA-replicatie foutief ingebouwde nucleotiden niet verwijderd worden. Daarnaast is de reproductie van HCV hoog: binnen een patiënt worden ongeveer 10^{12} virusdeeltjes per dag gemaakt.³ Uit een genoomlengte van circa 10.000 nucleotiden en een foutfrequentie van het virale polymerase van circa 1 op 10.000, kan afgeleid worden dat elke dag elke mogelijke mutatie kan ontstaan. Levensvatbaarheid van het gemuteerde virus en de effectiviteit van het immuunsysteem van de gastheer om deze mutaties te herkennen, zorgen voor respectievelijk negatieve en positieve selectie, en daardoor voor een steeds veranderende viruspopulatie binnen een gastheer. Deze populatie bestaat uit een groot aantal nauw verwante maar genetisch verschillende virusvarianten hetgeen vaak als quasispecies aangeduid wordt.

Auteurs: J. Schinkel, X. Thomas, afdeling Medische Microbiologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.
Correspondentieadres: R. Molenkamp, afdeling Medische Microbiologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, e-mail: R.molenkamp@amc.uva.nl.

Figuur 1. Deze 'unrooted' fylogenetische bomen van de virus envelop sequenties illustreren het verschil in genetische variatie tussen A) HCV met verschillende subtypes en B) de HIV M-groep. De genetische afstand tussen alle HCV varianten is duidelijk veel groter dan die tussen de HIV-M varianten onderling.



Behandeling van hepatitis-C

Tot zeer recent bestond de enige behandeling van HCV uit een combinatie van gepegyleerd interferon- α (PEG-IFN) en ribavirine (RBV), twee algemeen antivirale middelen die niet specifiek zijn ontworpen voor HCV. Het succes van deze behandeling hangt onder andere af van het genotype van het virus. De 'sustained viral response' (SVR: het verdwijnen en afwezig blijven van viraal RNA in het bloed van de patiënt onder en na behandeling) is slechts 50% bij patiënten geïnfecteerd met genotype 1 en 4. In het geval van infectie met genotype 2 of 3 is de SVR ongeveer 80%. Recent zijn de eerste directe antivirale middelen tegen HCV, de proteaseremmers (PIs) telaprevir en boceprevir, op de markt gekomen. Deze middelen zijn echter alleen geregistreerd voor behandeling van patiënten geïnfecteerd met genotype 1. Combinatietherapie van deze eerste generatie PIs met PEG-IFN en RBV verhoogt de SVR voor genotype 1 naar 70-80%.^{4,5} Behandeling met PEG-IFN/RBV kan matige tot ernstige bijwerkingen geven, zoals griepachtige verschijnselen, anemie en depressiviteit. Deze bijwerkingen kunnen reden zijn voor het (voorlopig) afzien van behandeling of het moeten staken van reeds gestarte therapie.

De rol van HCV-genotypering in de patiëntenzorg

Het verschil in respons op standaardbehandeling met PEG-IFN/RBV tussen HCV-genotypes 1 en 4 enerzijds en genotypes 2 en 3 anderzijds onderstreept het klinisch belang van een goede genotyperingstechniek. De aanwezigheid van een goed behandelbaar genotype zal immers de drempel om te behandelen verlagen, terwijl de aanwe-

zigheid van een moeilijker behandelbaar genotype in sommige gevallen kan betekenen dat men (voorlopig) afziet van behandeling. Daarnaast heeft het verschil in kans op respons geleid tot een verschil in aanbevolen behandelingsduur bij de standaard PEG-IFN/RBV behandelingsrichtlijn.⁶ Bij de 'gemakkelijk' behandelbare genotypes 2 en 3 wordt in principe 24 weken PEG-IFN/RBV gegeven. Bij de 'moeilijk' behandelbare genotypes 1 en 4 is dat 48 weken. Een goede genotyperingstechniek is dus van belang voor de keuze om wel of niet te behandelen én voor de behandelingsduur van de patiënt.

Met de introductie van HCV-specifieke proteaseremmers (PI) blijft het genotype van het virus een belangrijke rol spelen. De eerste generatie PI's die nu beschikbaar zijn gekomen, zijn alleen geïndiceerd voor de behandeling van met genotype 1 geïnfecteerden. Bij de behandeling van patiënten met genotype 1 met boceprevir en telaprevir doet zich de bijzondere situatie voor dat er een verschil bestaat tussen genotype 1a en 1b wat betreft genetische barrière voor het ontstaan van mutaties geassocieerd met resistentie. Dit verschil in genetische barrière betekent dat resistentiemutaties sneller ontstaan in HCV-genotype 1a, omdat voor bepaalde mutaties slechts één nucleotideverandering nodig is om een bepaalde aminozuurverandering tot gevolg te hebben terwijl voor genotype 1b voor dezelfde mutatie twee nucleotide veranderingen nodig zijn. Deze lagere genetische barrière voor resistentie vertaalt zich uiteindelijk ook in een ongeveer 10% kleinere kans op SVR voor genotype 1a met de huidige eerste generatie PI's.⁷ Het subtype van het virus kan dus in sommige gevallen de keuze wat betreft behandeling met een van de nieuwe PI's beïnvloeden als de afweging wel of niet behandelen lastig is. Hieruit volgt dat niet alleen adequaat vaststellen van genotype maar ook subtype van het virus van belang is voor optimaal patiëntenmanagement.

Bij patiënten⁹ met frequente expositie aan HCV doet zich soms de vraag voor of een patiënt die binnen een halfjaar na succesvolle behandeling weer positief geworden is, een gewone 'relapser' is, en dus gefaald heeft op zijn behandeling, of dat deze patiënt wellicht opnieuw is geïnfecteerd. Meer specialistische uitgebreide genotypische analyse (zie verderop in dit artikel) kan uitwijzen of er inderdaad sprake is geweest van een reinfectie.

Moleculaire epidemiologie: de rol van HCV-genotypering in de publieke gezondheidszorg

De variabiliteit van HCV maakt het mogelijk om zeer gedetailleerd oude en nieuwe transmissie-netwerken in kaart te brengen. Een goed voorbeeld daarvan is de HCV-epidemie onder HIV-positieve mannen die rond het jaar 2000 in Nederland haar intrede deed. Van der Laar et al. toonden op basis van uitgebreide genotypische analyse aan dat de nieuwe HCV-gevallen in deze patiën-

tengroep deel uitmaakten van een groot internationaal transmissienetwerk van HIV-positieve mannen die sex met mannen hebben (MSM; Men who have sex with men).⁸ Daarnaast is het mogelijk om bron- en contactopsporing te doen bij nosocomiale transmissie van HCV aan de hand van uitgebreide genetische analyse van het virus. Dergelijke analyse van transmissienetwerken maakt specifieke preventie gericht op risicopopulaties en risicofactoren mogelijk.

Methoden voor genotypering van HCV

Verscheidende moleculaire technieken kunnen gebruikt worden om het HCV-genotype te bepalen, variërend van directe sequentiebepaling tot detectie met PCR en identificatie met probes. Deze methoden, die alle gericht zijn op amplificatie en detectie van een deel van het virale genoom, hebben als overeenkomst dat het deel van het genoom dat geamplificeerd wordt voldoende onderscheidend moet zijn om de verschillende geno- en subtypes te identificeren, maar tegelijkertijd voldoende geconserveerd moet zijn om betrouwbare en gevoelige amplificatie te geven. Deze kennelijke tegenstelling zorgt voor grote uitdagingen bij het ontwikkelen van genotyperingstechnieken.

De 5'-untranslated region (5'-UTR) is het meest geconserveerde gedeelte van het HCV-genoom. De genen coderend voor de virale envelopeiwitten zijn het meest variabel. Het meest variabele deel van het genoom is de zogenaamde 'HVR1' (hypervariable region 1) welke aan de 5'-terminus van het E2-gen te vinden is. Deze sequentie codeert voor een stukje eiwit dat continu is geëxposeerd aan het immuunsysteem van de gastheer. Gedacht wordt dan ook dat dit deel van het genoom een rol speelt bij het ontsnappen aan de immunrespons van de gastheer.

Een veelgebruikte techniek voor het genotyperen van HCV is de zogenoemde 'reverse line blot assay' (INNO-LiPA HCV; Innogenetics). Hierbij wordt een amplicon gehybridiseerd aan een strip met gefixeerde probes en gekleurd. Interpretatie van een line blot assay berust op de aan- en afwezigheid van banden die specifiek zijn voor de verschillende genotypes. Het is een aantrekkelijke test vanwege de snelheid en de geringe eisen voor complexe apparatuur. In de eerste versie van deze test werd een amplicon gegenereerd van de 5'-UTR. Doordat deze regio sterk geconserveerd is, is het moeilijk om betrouwbare subtypering te doen op basis van een 5' uiteinde-typering. In de aangepaste versie van deze assay (VERSANT[®] HCV Genotype Assay (LiPA); Siemens Healthcare Diagnostics) is het amplicon uitgebreid met sequenties uit het coregen waardoor de subtypering werd verbeterd. Deze techniek blijft echter zeer gevoelig voor veranderingen in de regio's waar de primers en probes binden en het is onmogelijk om alle subtypen en varianten te vertegenwoordigen

op de beperkte ruimte van de strip. Er zijn dan ook varianten beschreven die niet door de reverse line blot assay getypeerd konden worden.¹⁰

Een techniek met veel overeenkomsten met de reverse line blot assay is de op Taqman-technologie gebaseerde genotypering. Ook hier wordt een amplicon gegenereerd, maar nu wordt het genotype bepaald door een combinatie van Taqman probes en realtime PCR-technologie (naast 'in-house' ontwikkelde assays ook bijvoorbeeld de RealTime HCV-genotype II assay; Abbott Molecular). De voordelen opzichte van de reverse line blot assay zijn dat er geen post-PCR-handelingen nodig zijn en dat deze methode een hoge gevoeligheid heeft. Net als bij de reverse line blot assay is deze methode wel gevoelig voor variatie op de primer- en probegebieden.

De methode die de meeste informatie over het virus geeft is uiteraard sequentieanalyse van een deel van het genoom. Hierbij wordt immers een sequentie gegenereerd die ook gebruikt kan worden voor fylogenetische analyses, waarbij verwantschap tussen virussen vergeleken kan worden. De verkregen sequentie wordt doorgaans vergeleken met een set van referentie-sequenties van hetzelfde gebied. Een belangrijke bron van deze referentie-sequenties is de sequentiedatabase van het Los Alamos National Laboratory (<http://hcv.lanl.gov/content/sequence/HCV/ToolsOutline.html>).¹¹ De verwantschap van de verkregen sequenties in relatie tot de set van referentie-sequenties kan dan door middel van 'multiple sequence alignments' en reconstructie van fylogenetische bomen geanalyseerd worden (*figuur 2A*). De keuze van het gebied waarop men de sequentie-analyse uitvoert bepaalt de mate van fylogenetische informatie. Vaak wordt voor sequentie-analyse het 5'-UTR-gebied gekozen vanwege het eerder genoemde geconserveerde karakter van dit gebied wat ontwikkeling van primers voor PCR en sequencing vereenvoudigt. Deze hoge conservatie beperkt echter de resolutie hetgeen net als bij de INNO-LiPA HCV-assay subtypering en soms zelfs onderscheid tussen bepaalde genotypes belemmert.

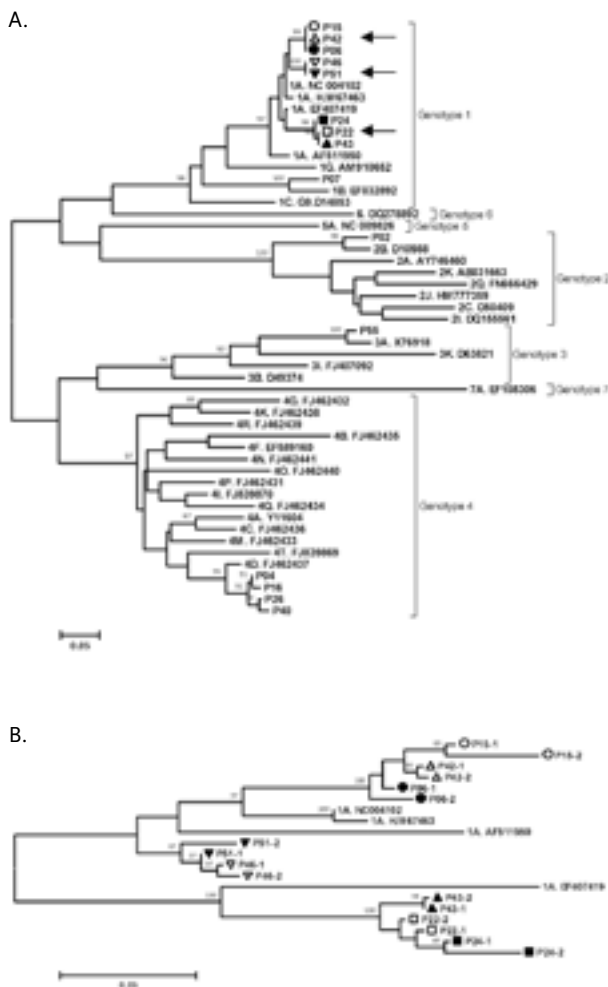
Murphy et al.¹² hebben een sequentiemethode ontwikkeld gericht op een 389 bp-fragment van het polymerase (NS5B)-deel van het genoom. Dit gebied is voldoende geconserveerd om met enkele primers alle genotypen te kunnen amplificeren maar geeft ook genoeg onderscheidend vermogen om de verschillende subtypen te determineren. In een groot onderzoek met ruim 8000 monsters bleek het mogelijk om 97% van alle monsters accuraat te genotyperen met één primerpaar. Alleen voor bepaalde subtypes 6 waren additionele primers nodig. Gezien het groter wordende belang van juiste subtypering in patiëntenzorg, is deze methode geschikt en goed toepasbaar voor routinematige genotypering.

Het door Murphy et al. beschreven NS5B-fragment is zeker niet het enige fragment dat gebruikt kan worden voor accurate HCV-genotypering. Corbet et al. beschreven een assay die zich richt op de core/E1-regio van het genoom.¹³ Naast dit relatief vaak gebruikte deel van het genoom zijn ook andere sequentieanalysestrategieën beschreven die, als het fragment maar lang genoeg is, adequate genotypering mogelijk maken. Echter, de enorme variabiliteit van HCV maakt het ontwerpen van een universele set primers voor

alle genotypes vrijwel onmogelijk, hetgeen de kracht van de door Murphy et al. ontworpen assay onderstreept.

Voor het identificeren en gedetailleerde analyse van transmissienetwerken met lange historie is (een fragment van) het NS5B gen zeer geschikt, maar als een recente uitbraak in kaart moet worden gebracht, zoals bijvoorbeeld de HCV-epidemie bij HIV-positieve mannen, kan het door Murphy beschreven NS5B-fragment onvoldoende onderscheidend zijn. Voor dergelijke studies is dan een sterker 'fylogenetisch signaal' nodig. Dit kan gerealiseerd worden door het meest variabele gebied van het genoom, de virale envelop, te kiezen voor sequentieanalyse. *Figuur 2* laat het verschil in genetische variatie en informatie zien tussen het door Murphy beschreven NS5B-fragment en een deel van de envelop met het HVR1 domein bij HIV-positieve mannen die recent seksueel HCV hebben opgelopen. Hieruit blijkt duidelijk dat virussen van een subtype die binnen deze risicogroep circuleren dermate op elkaar lijken dat een fylogenetische analyse van het standaard NS5B-fragment geen uitkomst biedt (*figuur 2A*). In zo'n geval is er aanvullende sequentieanalyse nodig van bijvoorbeeld de virale envelop, om vast te kunnen stellen of een patiënt opnieuw geïnfecteerd is of dat er sprake is van een 'relapse' (*figuur 2B*). Uitkomst van deze analyse is van belang omdat in het eerste geval herbehandeling in de acute fase van (re)infectie overwogen kan worden. Voor dergelijke analyses zijn echter subtypespecifieke assays nodig, hetgeen meestal buiten de mogelijkheden en het takenpakket van de meeste microbiologische laboratoria zal vallen.

Figuur 2. A) Fylogenetische boom met NS5B-referentiesequenties uit de HCV-sequentiedatabase van het Los Alamos National Laboratory (naamgeving is "subtype. accession number"), Pn zijn sequenties uit de dagelijkse routine die op deze wijze konden worden gesubtypeerd. Analyse van NS5B-sequenties geeft wel inzicht in het subtype van het virus, maar kan niet altijd verschillende varianten van hetzelfde subtype onderscheiden (Po6, P15 & P42; P46 & P51; P22 & P43, subtype 1a, aangegeven met een pijl). B) Analyse van de HVR1/E2-sequenties van deze patiënten met genotype 1a referentiesequenties kan wel het onderscheid tussen verschillende varianten van hetzelfde subtype aantonen. Op verschillende tijdstippen (Pn-1 en Pn-2) is de viruspopulatie binnen een patiënt nauw verwant.



Conclusie

Het genotyperen van hepatitis-C-virus levert een belangrijke bijdrage aan de huidige en toekomstige behandeling van HCV-geïnfecteerde patiënten. De grote mate van variabiliteit van het virus maakt goede subtypering echter niet eenvoudig. In een goed geutiliseerd microbiologisch laboratorium met toegang tot moderne moleculaire technieken is routinematige genotypering voor directe patiëntenzorg goed mogelijk. Specifieke vraagstellingen, zoals bijvoorbeeld het onderscheid kunnen maken tussen 'relapse' en reïnfectie in een specifieke MSM-patiëntenpopulatie vereist echter gedegen kennis van fylogenetische analyses en HCV-variabiliteit.

Abstract

Hepatitis-C-virus (HCV) is an important cause of chronic hepatitis. Reliable genotyping of HCV is essential for proper patient management. Due to the large genetic variability of HCV, genotyping is technically challenging. Here, we describe these challenges and propose solutions that can contribute to reliable genotyping of HCV.

Referenties

1. Hepatitis C: global prevalence. *Wkly Epidemiol Rec.* 1997;72:341-4.
2. Holmberg SD, Ly KN, Xing J, et al. The Growing Burden of Mortality Associated with Viral Hepatitis in the United States, 1999-2007. 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease, San Francisco, November 4-8. 2011.
3. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science.* 1998;282(5386):103-7.
4. Jacobson IM, McHutchison JG, Dusheiko G, et al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2011;364(25):2405-16.
5. Zeuzem S, Andreone P, Pol S, et al. Telaprevir for retreatment of HCV infection. *N Engl J Med.* 2011;364(25):2417-28.
6. de Bruijne J, Buster EH, Gelderblom HC, et al. Treatment of chronic hepatitis C virus infection – Dutch national guidelines.; Netherlands Association of Gastroenterologists and Hepatologists. *Neth J Med.* 2008;66(7):311-22.
7. Brass C, Barnard RJO, Howe JA, et al. Sustained Virologic Response and Boceprevir Resistance-associated Variants Observed in Patients Infected with HCV Genotype 1a/1b when Treated with Boceprevir Plus Peginterferon Alfa-2b/Ribavirin. *Journal of Hepatology.* 54(S1):S471-S472
8. van de Laar T, Pybus O, Bruisten S, et al. Evidence of a large, international network of HCV transmission in HIV-positive men who have sex with men. *Gastroenterology.* 2009;136(5):1609-17.
9. Lambers FA, Prins M, Thomas X, et al. Alarming incidence of hepatitis C virus re-infection after treatment of sexually acquired acute hepatitis C virus infection in HIV-infected MSM. *AIDS.* 2011;25(17):F21-7.
10. Molenkamp R, Harbers G, Schinkel J, Melchers WJ. Identification of two Hepatitis C Virus isolates that failed genotyping by Versant LiPA 2.0 assay. *J Clin Virol.* 2009;44(3):250-3.
11. Kuiken C, Yusim K, Boykin L, Richardson R. The Los Alamos HCV Sequence Database. *Bioinformatics.* 2005;21(3):379-84.
12. Murphy DG, Willems B, Deschènes M, Hilzenrat N, Mousseau R, Sabbah S. Use of sequence analysis of the NS5B region for routine genotyping of hepatitis C virus with reference to C/E1 and 5' untranslated region sequences. *J Clin Microbiol.* 2007;45(4):1102-12.
13. Corbet S, Bukh J, Heinsen A, Fomsgaard A. Hepatitis C virus subtyping by a core-envelope 1-based reverse transcriptase PCR assay with sequencing and its use in determining subtype distribution among Danish patients. *J Clin Microbiol.* 2003;41(3):1091-100.

Moleculaire typering van norovirus

A. Kroneman, H. Vennema, D. Baas, E. Duizer, M. Koopmans

Samenvatting

Norovirussen zijn de belangrijkste veroorzaker van virale gastro-enteritis en kunnen grote uitbraken veroorzaken, vooral in instellingen. Ook komen er regelmatig voedselgerelateerde uitbraken voor. Voor moleculaire surveillance of het opsporen van uitbraken worden norovirussen getypeerd door middel van sequencing. Hierbij worden verschillende regio's van het norovirusgenoom gebruikt. Typering vindt in Nederland steeds vaker plaats op verschillende laboratoria. Daarom worden er afspraken gemaakt tussen deze laboratoria en het RIVM over de te sequencen regio van het norovirusgenoom en over datasharing. Door deze data te delen met een internationaal moleculair surveillancenetwerk kunnen ook internationale uitbraken worden opgespoord. Lokaal kan typering worden gebruikt ter ondersteuning van ziekenhuishygiënist. Als voorbeeld beschrijven we twee uitbraken waarbij typering beslissende informatie opleverde.

Trefwoorden

Norovirus, typering, gastro-enteritis

Inleiding

Norovirussen (NoV) zijn veelvoorkomende veroorzakers van gastro-enteritis, met een duidelijke seizoenspiek in de winter.¹ De incidentie van norovirus-gastro-enteritis in de algemene bevolking is hoog, maar individuele patiënten maken over het algemeen een zelflimiterende ziekte door van een paar dagen. Berucht zijn norovirussen vanwege de hoge besmettelijkheid, waardoor grote uitbraken in ziekenhuizen en verzorgingshuizen voorkomen, maar ook op cruiseschepen, in scholen, kampen, kinderdagverblijven, in restaurants en na consumptie van gecaterde maaltijden. Een norovirusuitbraak in een zorginstelling heeft vaak grote gevolgen zoals opnamestops, sluiten van operatiekamers en personeelstekort. Ook is inmiddels onderkend dat nosocomiale infectie bij hoogrisicopatienten tot chronische diarree kan leiden die moeilijk behandelbaar is. Onderzoek naar mogelijke antivirale middelen heeft nog niet tot effectieve behandeling geleid. Wel is er een kandidaatvaccin waarmee klinische trials worden uitgevoerd. Overdracht van het virus vindt plaats van persoon-op-persoon, via contact met besmette oppervlakten en via voedsel en water. Voedsel kan daarbij gecontamineerd

zijn aan het begin van de voedselketen, door contact met fecaal verontreinigd water, of later in de voedselketen door besmette voedselbereiders.

Norovirussen behoren tot de familie *Caliciviridae*, die is onderverdeeld in genera, waarvan het genus *Norovirus* en het genus *Sapovirus* medisch relevante humane virussen bevatten. Binnen het genus *norovirus* komen vijf genogroepen voor, die weer verder onderverdeeld worden in genotypes en varianten. De indeling in typen en varianten gebeurt in principe op het genoomdeel dat codeert voor het capsid (ORF2). Het gehele virusgenoom is ongeveer 7500 nt lang en bevat drie open reading frames (ORF's). Een up-to-date overzicht van de diversiteit van norovirussen die humaan voorkomen wordt bijgehouden in een publiek toegankelijke typing tool.^{2,3}

Uit onderzoek van het Europese samenwerkingsverband Food-borne viruses in Europe (FBVE) is gebleken dat epidemiologisch gezien onderscheid te maken valt tussen NoV-genotype (G) GII.4- virussen en andere genotypes. NoV GII.4-virussen worden wereldwijd het vaakst gevonden als oorzaak van uitbraken, de epidemiologie laat een duidelijker seizoenspiek zien, en uitbraken komen vaker voor in ziekenhuizen en verzorgingshuizen, maar relatief minder vaak in voedseluitbraken dan andere genotypes.⁴ Dit duidt wellicht op een efficiëntere persoon-op-persoonoverdracht van dit genotype in vergelijking met de ander genotypes.⁵

Net als bij influenza-A worden er bij GII.4-norovirussen door het opeenstapelen van mutaties (drift) periodiek nieuwe varianten gezien die antigenetisch dusdanig

Auteurs: dr. H. Vennema, drs. D. Baas, dr. E. Duizer, RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding; prof. M. Koopmans, RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Erasmus MC, afdeling Virologie, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam.

Correspondentieadres: drs. A. Kroneman, RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, e-mail: annelies.kroneman@rivm.nl.

afwijkend zijn dat bestaande immuniteit waarschijnlijk niet voldoende bescherming biedt tegen infectie met de nieuwgevormde varianten.⁶

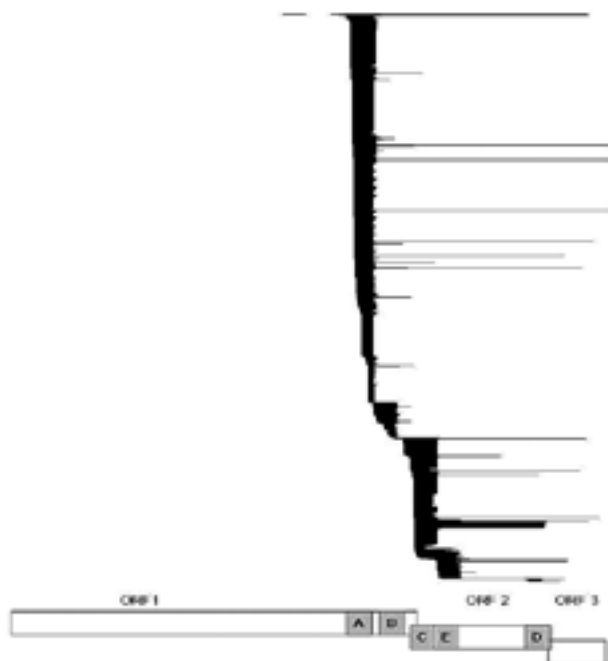
Ook binnen de non-GII.4-virussen lijken er verschillen te bestaan tussen genotypes: verschillende NoV-genotypes binden aan verschillende receptoren. Sommige genotypes zijn daardoor beperkter in hun gastheerspectrum, waarbij GII.4 een breed spectrum heeft.⁷ Er zijn zowel binnen GI als GII genotypes die significant vaker in voedsel voorkomen⁸ of vaker bij kinderen.⁹

Targets voor typering

De genetische diversiteit is dusdanig dat het mogelijk is om op basis van sequentieanalyse clustering aan te tonen, mits de gekozen targets geschikt en groot genoeg zijn.¹⁰ Tussen nucleotidesequenties van virussen van verschillende genogroepen worden verschillen gevonden in de orde van 45-65% uncorrected pairwise distance. Tussen genotypes binnen één genogroep is dat 15-45%.¹¹

Door verschillende laboratoria worden verschillende targets van het NoV-genoom gebruikt voor typering (figuur 1), deels uit historische en deels uit praktische overwegingen.¹² Het 3'-gedeelte van het ORF1, dat codeert voor het polymerase (ORF1) is meer geconserveerd dan ORF2, dat codeert voor het capsid. Het polymerase is dus meer geschikt voor een detectie PCR.¹³ Dit fragment regio

Figuur 1. Weergave van het complete genoom van norovirus met 3 open reading frames (ORF's). A t/m E zijn veel gebruikte sequence targets.¹² De zwarte lijnen daarboven zijn een weergave van de locatie op het NoV genoom van alle 9975 sequenties in de internationale NoroNet-database, gebruikmakend van de begin- en eindcoördinaten bepaald door de typing tool.



A (figuur 1) wordt vervolgens ook vaak gebruikt voor typering, bijvoorbeeld voor de monitoring van trends. Door de grotere variatie in het capsid geeft sequencing van ORF2 meer fylogenetische informatie en is de clustering op basis van ORF2-sequenties robuuster.¹² Daardoor is ORF2-typering geschikt voor situaties waarbij een hogere resolutie nodig is, zoals onderzoek naar een gezamenlijke bron bij een cluster van patiënten of uitbraken.¹⁰

Ook de voedselautoriteiten maken gebruik van typering, als zij viruspositieve producten vinden. Hier wordt de keuze voor de target soms gedicteerd door de beperking van de methode die beschikbaar is voor de betreffende virusmatrixcombinatie.¹⁴ Ten slotte is van belang dat er bij NoV regelmatig recombinatie optreedt, waarbij het recombinatiepunt meestal rond de ORF1/ORF2-overlap ligt.¹⁵ Typering op basis van ORF1 regio's kan dan andere resultaten opleveren dan typering op basis van ORF2, wat vergelijking van typeringsdata tussen laboratoria bemoeilijkt. Om die reden zijn in internationaal verband afspraken gemaakt over de voorkeursregio's voor typering. Op het RIVM is een online typing tool ontwikkeld die internationaal gebruikt wordt voor de toekenning van een genotype, en bij GII.4-sequenties ook de (antigene) variant.^{2,16}

De tool gebruikt een fylogenetische methode voor typetoekenning, inclusief een maat voor de robuustheid van de typetoekenning (bootstrapping). Sequenties die in de typing tool worden getypeerd, worden niet automatisch opgeslagen.

De referentieset die gebruikt wordt in de typing tool bevat sequenties van de meest gebruikte targets voor sequencing A t/m E, van alle bekende norovirusgenotypes en varianten (figuur 1). Deze verschillende 'genoomtargets' kunnen alle gebruikt worden voor toekenning van het genotype.

Typing van norovirussen in Nederland:

Tot 2008 werd de diagnostiek voor NoV voornamelijk gedaan bij het RIVM. Nederlandse laboratoria stuurden hun uitbraakmonsters door naar het RIVM voor kosteloze gastro-enteritis (GE)-diagnostiek en typering. Alle ontvangen monsters die positief waren voor NoV werden vervolgens moleculair getypeerd door sequentieanalyse van regio A.¹³ (figuur 1)

Slechts enkele medisch microbiologische laboratoria (MML) deden zelf NoV-diagnostiek en eventueel typering. In 2009 is met de MML's afgesproken dat het RIVM de virale GE-diagnostiek niet meer kosteloos zou aanbieden, aangezien de MML's deze zelf wilden gaan opzetten. Dit is inmiddels in vrijwel alle MML's geïmplementeerd. NoV-diagnostiek vindt nu plaats bij individuele gastro-enteritispatiënten en als onderdeel van de diagnostiek bij uitbraken van gastro-enteritis, volgens een algoritme beschreven door H.A. Bijlmer e.a. in 2008.¹⁷ Een deel van de positieve monsters wordt vervolgens getypeerd door

middel van sequencing door MML's of het RIVM. Hierbij spelen verschillende vraagstellingen een rol, bijvoorbeeld moleculaire bevestiging bij verdenking op uitbraken of voor het linken van voedsel aan een case.¹⁸⁻²⁰ Typering is ook noodzakelijk om onderscheid te kunnen maken tussen een langdurige uitbraak en uitbraken of cases in een korte tijd als gevolg van meerdere introducties van het virus uit de algemene bevolking, bijvoorbeeld op cruiseschepen of in ziekenhuizen. Beide scenario's vergen andere bestrijdingsmaatregelen.

Daarnaast worden monsters getypeerd voor moleculaire surveillance: voor het vinden van diffuse voedseluitbraken,⁸ of voor aanwijzingen voor het ontstaan van een nieuwe NoV GII.4-variant. In combinatie met een zomer-/lentepiekie kan dit een voorbode zijn van een 'heftig' norovirusseizoen.²¹⁻²³

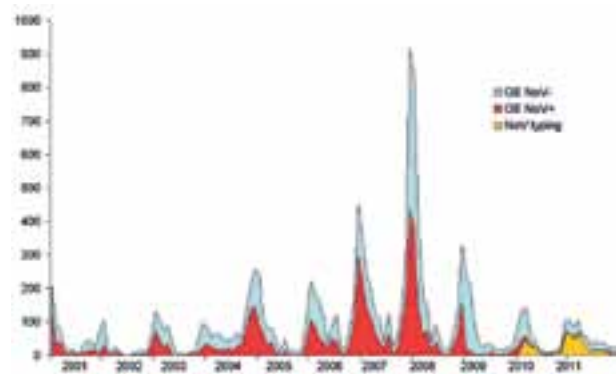
Als gevolg van deze afspraken ontvangt het RIVM sinds 2009 weinig materiaal voor typering, waardoor de landelijke NoV-surveillance in de knel is gekomen. Dit is terug te zien in *figuur 2*, waar de aantallen naar het RIVM ingestuurde monsters voor virale GE-diagnostiek en voor norovirustypering per maand zijn weergegeven voor 2001 t/m 2011. Op dit moment vindt NoV-typering plaats op het RIVM bij de volgende soorten monsters:

- Een beperkt aantal (idealiter ± 5) positieve monsters per uitbraak, vooral uit ziekenhuizen en verpleeghuizen, op verzoek van GGD, instelling of MML opgestuurd ter typering.
- Individuele monsters van patiënten met GE voor diagnostiek, afkomstig van de enkele laboratoria die nog niet zelf de NoV-diagnostiek doen.
- Monsters uit studieprojecten, zoals op dit moment KISZZ, een studie waarin kinderen van verschillende kinderdagverblijven bemonsterd worden.

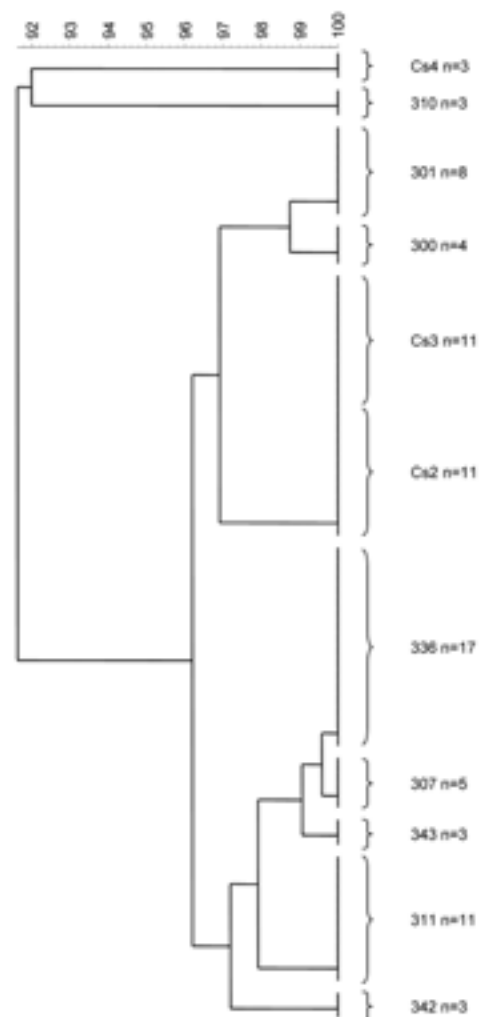
In 2010 werden twee langdurige uitbraken nader geanalyseerd. De eerste uitbraak (*figuur 3*, nr 336) betrof een ziekenhuisafdeling waar van eind februari tot begin juni in 17 van 24 gastro-enteritisgevallen norovirus werd aangetoond. Sequentieanalyse toonde aan dat de virussen onderling geen verschillen vertoonden gedurende de hele uitbraak. Dit laat zien dat het erg moeilijk kan zijn om van een norovirusbesmetting af te komen als er steeds weer nieuwe gevoelige personen zijn.

De tweede uitbraak vond plaats op een cruiseschip dat wekelijks in Nederland aanlegde. In een periode van vier weken werd door middel van diagnostiek vier keer aangetoond dat het om norovirus ging. Van de eerste episode was geen materiaal beschikbaar voor typering. Gedurende de tweede (*figuur 3*, cs2) en de derde (*figuur 3*, cs3) episode werden identieke virusstammen aangetroffen. Na de derde episode werd grondig schoongemaakt. Hierna volgde nog een kleine vierde episode (*figuur 3*, cs4)

Figuur 2. Aantallen naar het RIVM ingestuurde monsters voor virale gastro-enteritisdiagnostiek (blauw: de negatief geteste monsters; rood: de positief geteste monsters); voor typering (geel) per maand.



Figuur 3. Clusteranalyse van een selectie van GII.4 norovirus polymerasesequenties verkregen uit uitbraken in 2010. Norovirussequenties van patiënten betrokken bij uitbraken werden onderling vergeleken met behulp van clusteranalyse. Sequenties die een verticale lijn bij 100% vormen zijn uniek en onderling identiek. Het uitbraaknummer en het aantal betrokken monsters is per uitbraak weergegeven naast de accolade.



maar dit betrof een andere virusstam. Hoewel het leek alsof de schoonmaak niet afdoende was, moeten we naar aanleiding van de typeringsresultaten toch concluderen dat dit wel het geval is geweest maar dat schoonmaak niet kan voorkomen dat er weer opnieuw norovirus geïntroduceerd wordt.

TypeNed en NoroNet

TypeNed is een initiatief van een aantal Nederlandse MML's samen met het RIVM, om te komen tot afstemming van typeringsmethoden, afspraken over referentielabfuncties en datasharing om op die manier op basis van de gegevens van verschillende laboratoria een nationale surveillance te kunnen uitvoeren. Norovirus is één van de pilotorganismen binnen dit initiatief. Door deze afstemming, en datasharing kunnen zowel vraagstellingen op ziekenhuis- of patiëntniveau, als (inter)nationale vraagstellingen beter beantwoord worden. Voor het virologie deel van TypeNed is een pilot gestart met 6 MML's voor het sharen van norovirus en entero- en parechovirussequenties, inclusief een kleine set klinische en epidemiologische data. Norovirussequencing wordt nog niet op grote schaal uitgevoerd in Nederlandse laboratoria, omdat daar maar in een beperkt deel van de gevallen een lokale vraagstelling voor is. Binnen TypeNed is afgesproken dat de zes laboratoria een geselecteerde set monsters gaan sequencen (of insturen ter typering naar het RIVM), specifiek voor de nationale basissurveillance. Hierbij worden er per laboratorium 10 monsters uit het begin van het NoV-seizoen ingestuurd, 10 uit het midden en 10 uit het eind van het seizoen.^{2,3} Daarnaast zullen specifieke uitbraken worden getypeerd, zowel door de MML's als door het RIVM. Die sequenties worden ook in de database gezet. De data die verzameld worden in het TypeNed netwerk worden ook gedeeld met het internationale netwerk NoroNet, zodat ze gebruikt kunnen worden voor het vinden van internationale clusters. Voor de datasharing en analyse wordt hierbij gebruik gemaakt van de ICT-infrastructuur die is ontwikkeld op het RIVM, het moleculaire platform. Binnen deze software zijn voorzieningen gemaakt voor toegangsbeheer en worden de sequenties automatisch getypeerd door de typing tool. Ook zijn enkele analyse- en visualisatiemodules ontwikkeld, waaronder een Blastanalyse van een geselecteerde sequentie met alle andere sequenties in de database om identieke of bijna identieke sequenties te vinden, en visualisatie van een bepaalde selectie op een geografische kaart.

Uitgaande van hetzelfde principe zijn er ook afspraken gemaakt over datasharing van enterovirussequenties. Het RIVM heeft hierbij op verzoek van de deelnemende laboratoria ook een enterovirustypingtool ontwikkeld die eveneens publiek beschikbaar is.^{16,24}

NoroNet is de huidige globale uitbreiding van het Europees FBVE-netwerk van virologische laboratoria van volksgezondheidsinstituten en universiteiten, waarbinnen sinds 1999 norovirussequenties en een beperkte set achtergrondgegevens op uitbraakniveau worden gedeeld in een webdatabase. De laatste jaren is dit netwerk uitgebreid met een aantal laboratoria uit andere werelddelen. De data, behalve van de meest recente meldingen, zijn openbaar toegankelijk.²⁵ Op dit moment bevat de database 9975 sequenties, horende bij 8650 uitbraken. De sequenties zijn afkomstig van verschillende NoV-genoomtargets, waarbij ORF1-sequenties in de meerderheid zijn. De visualisatie hiervan in *figuur 1* laat zien dat er dus veel niet overlappende sequenties in de database zitten, wat het opsporen van internationale uitbraken bemoeilijkt. De laatste jaren wordt steeds vaker, eventueel in combinatie met ORF1-sequencing, ORF2-sequencing uitgevoerd. Naast de gemeenschappelijke database bestaat NoroNet uit een informeel e-mailnetwerk waarin de leden elkaar op de hoogte houden van uitbraakverdenkingen en bijzonderheden in sequencingresultaten.

Conclusie

Door de huidige decentrale diagnostiek en typering van norovirussen is een andere aanpak nodig om toch een landelijke surveillance te kunnen handhaven. Afstemming van typeringsmethode is daar een belangrijk onderdeel van. Het RIVM heeft nu samen met een aantal MML's een centrale database en een systeem van op elkaar afgestemde protocollen operationeel. Deze samenwerking in TypeNed verband zal na een pilotfase van twee jaar worden geëvalueerd, om te bezien of en zo ja hoe de toekomstige samenwerking tussen klinische laboratoria en het Clb voor moleculaire surveillance kan worden vormgegeven.

Summary

Noroviruses are an important cause of viral gastro-enteritis and can cause large outbreaks, especially in health care settings. In addition to person-to-person transmission, food-borne outbreaks occur frequently. For molecular surveillance or identification of clusters, noroviruses are genotyped via sequencing, using different genome targets. With the increasing number of laboratories that offer strain typing, consensus is needed on the choice of sequencing target and datasharing. In addition to the national datasharing, participation in an international datasharing network enables the identification of international outbreaks and international molecular surveillance. For individual laboratories or hospitals, strain typing can be used to support the work of hospital hygiene departments. We describe two outbreaks in which sequencing yielded crucial information.

Referenties

- Mounts AW, Ando T, Koopmans M, Bresee JS, Noel J, Glass RI. Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000 May;181 Suppl 2:S284-7.
- <http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>.
- Duizer E, Kroneman A, Siebenga J, et al. Typing database for noroviruses. *Euro Surveill.* 2008 May 8;13(19).
- Kroneman A, Verhoef L, Harris J, et al. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol.* 2008 Sep;46(9):2959-65.
- Sukhrie FH, Beersma MF, Wong A, van der Veer B, Vennema H, Bogerman J, et al. Using molecular epidemiology to trace transmission of nosocomial norovirus infection. *J Clin Microbiol.* 2011 Feb;49(2):602-6.
- Siebenga JJ, Vennema H, Renckens B, et al. Epochal evolution of GGI.4 norovirus capsid proteins from 1995 to 2006. *J Virol.* 2007 Sep;81(18):9932-41.
- Rockx BH, Vennema H, Hoebe CJ, et al. Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections. *J Infect Dis.* 2005 Mar 1;191(5):749-54.
- Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, et al. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jan;15(1):31-8.
- Lindell AT, Grillner L, Svensson L, Wirgart BZ. Molecular epidemiology of norovirus infections in Stockholm, Sweden, during the years 2000 to 2003: association of the GGIIb genetic cluster with infection in children. *J Clin Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1086-92.
- Verhoef L, Williams KP, Kroneman A, et al. Selection of a phylogenetically informative region of the norovirus genome for outbreak linkage. *Virus Genes.* 2011 Sep 30.
- Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology.* 2006 Mar 15;346(2):312-23.
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods.* 2004 Mar 15;116(2):109-17.
- Vennema H, de Bruin E, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol.* 2002 Aug;25(2):233-5.
- Hoebe CJ, Vennema H, de Roda Husman AM, van Duynhoven YT. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J Infect Dis.* 2004 Feb 15;189(4):699-705.
- Bull RA, Tanaka MM, White PA. Norovirus recombination. *J Gen Virol.* 2007 Dec;88(Pt 12):3347-59.
- Kroneman A, Vennema H, Deforche K, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011 Apr 20;51:121-5.
- Bijlmer HA, Götz H, Koopmans M. Een algoritme ter ondersteuning van de openbare gezondheidszorg bij uitbraken van gastro-enteritis. *Ned Tijdschr Med Microbiol.* 2008;16(2):11-5.
- Di Bartolo I, Monini M, Losio MN, et al. Molecular characterization of noroviruses and rotaviruses involved in a large outbreak of gastroenteritis in Northern Italy. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Aug;77(15):5545-8.
- Mayet A, Andreo V, Bedubourg G, et al. Food-borne outbreak of norovirus infection in a French military parachuting unit, April 2011. *Euro Surveill.* 2011;16(30).
- Maunula L, Roivainen M, Keranen M, et al. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Euro Surveill.* 2009;14(49).
- Kroneman A, Vennema H, Harris J, et al. Increase in norovirus activity reported in Europe. *Euro Surveill.* 2006;11(12):E061214 1.
- Siebenga J, Kroneman A, Vennema H, et al. Food-borne viruses in Europe network report: the norovirus GI.4 2006b (for US named Minerva-like, for Japan Kobe034-like, for UK V6) variant now dominant in early seasonal surveillance. *Euro Surveill.* 2008 Jan 10;13(2).
- Verhoef L, Depoortere E, Boxman I, et al. Emergence of new norovirus variants on spring cruise ships and prediction of winter epidemics. *Emerg Infect Dis.* 2008 Feb;14(2):238-43.
- <http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool>.
- <http://www.noronet.nl>

De onbegrepen levensweg van Giardia: rol van dier-en-sex?

H. Sprong, J. van der Giessen

Samenvatting

Giardia duodenalis kan op basis van genetische verschillen onderverdeeld worden in acht assemblages. Mensen worden vrijwel alleen geïnfecteerd met assemblage A en B, die ook in (landbouw)huisdieren wordt aangetroffen. Typering wordt bemoeilijkt door allel-sequentie heterogeniteit dat hoofdzakelijk veroorzaakt wordt doordat *Giardia* twee zelfstandig delende, diploïde kernen heeft. Sommige subtypes van assemblage A en B die bij mensen worden aangetroffen, worden ook bij (landbouw) huisdieren gevonden. De gebruikte typeringsmethoden zijn ongeschikt om de richting en de frequentie van dier-mensstransmissie vast te stellen. Er zijn aanwijzingen dat *Giardia duodenalis* (seksuele) recombinatie kan ondergaan en dat menginfecties met verschillende assemblages kunnen optreden binnen een gastheer. Hoe vaak dit gebeurt is onbekend, maar is wel van doorslaggevend belang voor de wijze waarop multilocus genotypering (MLG) moet worden geïnterpreteerd. Door alle beschikbare sequentiedata te analyseren met behulp van populatiegenetica, verwachten we meer inzichten te verkrijgen in de biologische complexiteit en recombinante eigenschappen van deze sympathiek ogende parasiet.

Trefwoorden

Moleculaire epidemiologie, typering, Giardia

Inleiding

Giardia duodenalis, *G. intestinalis* en *G. lamblia* worden door elkaar gebruikt in de literatuur, maar in alle gevallen wordt hetzelfde organisme bedoeld. *G. duodenalis* kan giardiase veroorzaken bij mensen en warmbloedige dieren. Giardiase is de meest voorkomende intestinale protozoaire infecties bij de mens. *G. duodenalis* die uit menselijk en dierlijk materiaal worden geïsoleerd, zijn morfologisch niet van elkaar te onderscheiden. Op basis van genetische analyses kan *G. duodenalis* onderverdeeld worden in acht categorieën (A t/m H), die assemblages worden genoemd. Deze ongebruikelijke naamgeving komt doordat de biologie van *Giardia* nog onvoldoende is opgehelderd. Het is niet duidelijk of deze assemblages corresponderen met acht species of slechts met één.¹ Een doorbraak in

deze controversie kan geleverd worden door te achterhalen of deze acht assemblages met elkaar zouden kunnen recombineren.

Moleculaire typeringsmethoden voor Giardia

Door middel van iso-enzymanalyses zijn in de jaren 90 een groot aantal axenische (cel)kweken van *Giardia*-assemblage A en B onderzocht en getypeerd. DNA-sequentieanalyse heeft deze iso-enzymanalyses vervangen. De belangrijkste voordelen zijn dat PCR- amplificatie gevolgd door sequentieanalyse al kan werken op kleine hoeveelheden materiaal en dat het arbeidsintensieve kweken van *Giardia* niet noodzakelijk wordt. Een aantal niet-kweekbare *Giardia* assemblages, zoals assemblage C, D (honden) en F (katten) werden hierdoor geïdentificeerd. Tegenwoordig zijn de complete genoomsequenties van meerdere assemblages bekend: assemblage AI, AII, B en E. Een grote database met veel genomische informatie is beschikbaar (<http://giardiadb.org/giardiadb/>). Deze informatie stelt ons in staat om nieuwe markers te ontwikkelen met specifieke doeleinden.

Giardia's bevatten geen organellen met een eigen DNA, zoals mitochondria. Markers gebaseerd op het DNA van deze organellen zijn dan ook niet beschikbaar voor *Giardia*. Tabel 1 geeft een overzicht van fragmenten van genen die regelmatig worden gebruikt voor de moleculaire typering van *Giardia*. Algemene consensus over de te gebruiken loci voor een internationale multilocus genotypering (MLG) is er niet. Hypervariabele moleculaire markers, zoals microsatellieten, zijn nog niet beschreven. Zulke markers zijn noodzakelijk voor meer specifieke vraagstellingen zoals bronopsporing, detectie van diffuse uitbraken en voor de bestudering van lokale transmissie(routes).

Auteurs: H. Sprong, J. van der Giessen, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, e-mail: Hein.Sprong@rivm.nl, Joke.van.der.Giessen@rivm.nl.

Tabel 1. Fragmenten van genen die gebruikt worden voor de moleculaire typering van *Giardia*. Locatie op het chromosoom is gebaseerd op het genoom van assemblage A. *Deze markers pikken ook andere *Giardia*-soorten op zoals *G. microti* en *G. ardeae*. ** Deze markers worden gebruikt in de ZOOPNET-databank.

| Gen | Functie | Assemblage |
|-------------------------------|----------------------|------------|
| Mlh1 | DNA-reparatie | A en B |
| Glutamaatdehydro-gensase** | Huishoud enzym | A t/m G* |
| Triose phosphate isomerase** | Huishoud enzym | A t/m G* |
| Beta-giardin** | Structuur | A t/m G* |
| Elongation factor 1- α | Translatie | A t/m G* |
| Ferredoxin | Elektronen transport | A en B |
| Histone H2B | Structuur | A en B |
| Histone H4 | Structuur | A en B |
| Actin | Structuur | A en B |
| α -tubulin | Structuur | A en B |
| Chaperonin 60 | Eiwitvouwing | A en B |
| ORF C4 | Eiwitvouwing | A en B |
| 18S rDNA** | Translatie | A t/m G* |
| Intergenic ribosomal spacer | Niet-coderend | A en B |
| ITS regions and 5.8S rDNA** | Translatie | A t/m G* |
| Ribosomal protein L7a | Translatie | A en B |

Door de toepassing van PCR-detectie in de diagnostiek en het gebruik van moleculaire typering voor de bestudering van de epidemiologie, is vooral heel duidelijk geworden dat er nog veel onduidelijkheden zijn omtrent *Giardia*. Door het gebruik van hele gevoelige detectiemethoden, is het maar de vraag of de gedetecteerde *Giardia*'s daadwerkelijk de veroorzaker is van de klachten, zeker omdat de prevalentie van *Giardia* in mensen zonder gastro-intestinale klachten ongeveer net zo groot is als bij patiënten met klachten.^{2,3} Moleculaire markers die onderscheid kunnen maken tussen mensen met en zonder gastro-intestinale klachten (*giardiase*) zijn nog niet voorhanden. Ook zijn de gebruikte PCR-assays niet volledig betrouwbaar: het kan gebeuren dat bepaalde allelen preferentieel worden geamplificeerd ten koste van andere. Dat probleem wordt vooral duidelijk bij de typering van *Giardia* in isolaten met mengsels van *Giardia*-genotypen. Bij MLG worden met regelmaat op verschillende loci *Giardia* van verschillende assemblages gedetecteerd. Dit probleem doet zich vooral bij de MLG-typering van assemblage A en B in dieren voor: met grote regelmaat worden dan ook niet-zoönotische assemblages (C t/m G) geïdentificeerd op één

of twee loci, terwijl op de andere loci dan een potentieel zoönotische assemblage (A of B) wordt gedetecteerd. Het aantal dierlijke *Giardia*-isolaten met volledige MLG's van assemblage A en B is dan ook zeer beperkt.

Menginfecties of seksuele recombinitie?

Doordat *Giardia*'s zo moeilijk te kweken zijn en doordat de meeste typeringen plaatsvinden op DNA-extracties van feces, soms voorafgegaan aan een cyste-isolatie, is het goed mogelijk dat er verschillende *Giardia*(geno)-types in één fecesmonster aanwezig zijn. PCR-assays die gebruikmaakten van assemblagespecifieke primerparen, laten zien dat menginfecties regelmatig voorkomen. Hoe menginfecties ontstaan bij een *Giardia*-infectie (voor of na ingestie), wat het betekent voor de virulentie van individuele *Giardia*-types en of menginfecties consequenties hebben voor de klinische symptomen, is niet bekend.

Tot voor kort werd *Giardia* beschouwd als een eukaryoot die zich enkel en alleen op asexuele manier reproduceerde.⁴ Enkele recente studies leverden een aantal indirecte aanwijzingen dat *Giardia* wel degelijk kan recombineren.^{5,6} De biologische en evolutionaire relevantie daargelaten, (seksuele) recombinitie van *Giardia* zou grote implicaties hebben voor de taxonomie, epidemiologie, virulente eigenschappen en moleculaire typeringstrategieën. Recombinitie zou op drie niveaus kunnen plaatsvinden: (1) tussen de twee kernen van een *Giardia*-parasiet, (2) tussen *Giardia*-parasieten van dezelfde (sub)assemblage en (3) tussen *Giardia*-parasieten van verschillende (sub)assemblages. Mogelijke recombinitie tussen *Giardia*-parasieten van verschillende assemblage (3) is aangetoond in diverse studies. Direct en onomstotelijk bewijs voor seksuele recombinitie (2 en 3) van *Giardia* ontbreekt nog. Ook is het nog niet duidelijk waar in de levenscyclus van *Giardia*, een eventuele seksuele recombinitiestap zou kunnen plaatsvinden. Een belangrijke randvoorwaarde voor intra- en interassemblagerecombinitie is dat verschillende *Giardia*-parasieten elkaar kunnen ontmoeten: Een menginfectie in een gastheer lijkt hiervoor ideaal. Vooral bij honden is bekend dat veel verschillende *Giardia*-assemblages (A t/m D) in de darm kunnen voorkomen. Bij moleculair epidemiologische studies is het dus cruciaal om onderscheid te kunnen maken tussen menginfecties en eventuele (seksuele) recombinitie. Genotypering op een enkele cyst is technisch mogelijk, net als het ontwikkelen van assemblagespecifieke PCR.^{7,8}

Moleculair-epidemiologische databank

Het RIVM beheert een internationale moleculair-epidemiologische *Giardia*-databank. Deze ZOOPNET-databank is opgebouwd in samenwerking met een groot aantal Europese veterinaire en volksgezondheidsinstellingen.⁹

Epidemiologische gegevens van 3352 Giardia-isolaten in combinatie met 5430 DNA-sequenties van vijf moleculaire markers zijn beschikbaar (januari 2012). Van 695 Giardia-isolaten met menselijke en dierlijke oorsprong zijn drie of meer loci beschikbaar. Een groot deel van de databank is toegankelijk via internet (<http://www.rivm.nl/pubmpf/giardia/database>).

Assemblage A: subassemblages

Een aantal recente studies beschrijven drie duidelijke subgroepen in assemblage A op basis van MLG. Subassemblage A1 wordt hoofdzakelijk in (landbouw) huisdieren gevonden, terwijl subassemblage A2 hoofdzakelijk bij mensen voorkomt. Subassemblage A3 is aangetoond in wild, met name in herkauwers.¹⁰ Van alle drie de subassemblages zijn slechts enkele MLG-types beschreven die isolaten van zowel humane als dierlijke oorsprong bevatten. Met andere woorden, op basis van MLG zijn genetisch identieke subtypes geïdentificeerd van zowel menselijke als dierlijke oorsprong in alle drie de subassemblages. Typeringen die gebaseerd zijn op één enkele locus, laten veel meer genotypes van assemblage A als B zien met zowel menselijke als dierlijke isolaten. De meest logische verklaring van de typeringen gebaseerd op een enkele of meerdere loci, is dat al deze drie subassemblages in staat zijn om zowel mensen als dieren te infecteren en dus een zoönotische potentie hebben. Bij deze grove analyses ontbreekt de oorzakelijke verband tussen de dierlijke en menselijke isolaten met identieke MLG. Tot nu toe hebben slechts enkele studies typeringsdata en gedetailleerde epidemiologische gegevens gecombineerd: in geïsoleerde gemeenschappen in India en Thailand, waar mensen en honden dicht op elkaar leven, zijn honden geïdentificeerd als mogelijke bron voor humane giardiase. Een recente studie, waarbij zoönotische transmissie voor de hand ligt, beschrijft een Zweedse jager met giardiase die enkele dagen daarvoor elanden had ontwaard tijdens de jacht. De man bleek geïnfecteerd met Giardia-subassemblage A3, een type dat daarvoor nog niet bij mensen was beschreven.¹¹

Assemblage B: allel-sequentieheterogeniteit

In tegenstelling tot assemblage A zijn geen eenduidige subgroepen te herkennen binnen assemblage B op basis van MLG. Hoewel assemblage B hoofdzakelijk in mensen, huisdieren en wild (voornamelijk primaten) gevonden wordt, is er nog geen enkele MLG beschreven met isolaten van zowel dierlijke als menselijke oorsprong. Het zoönotisch potentieel van assemblage B lijkt daardoor minimaal, maar de typering wordt bemoeilijkt door een aantal zaken. Wat bij assemblage B vooral opvalt, zijn de uitgebreide nucleotidenpolymorfismen in alle bestudeerde loci. 24% van de assemblage-B-sequenties in de ZOOPNET-databank heeft een of meerdere nucleo-

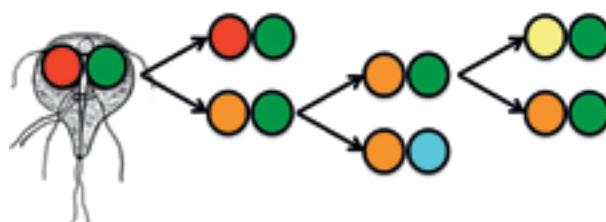
tidenpolymorfismen. Slechts 3% van de DNA-sequenties van assemblage A heeft nucleotidenpolymorfismen. De mogelijke oorzaken van nucleotidenpolymorfismen zijn de aanwezigheid van meerdere genotypes in één isolaat en allel-sequentieheterogeniteit (ASH) binnen één organisme. Het is vooralsnog niet mogelijk om onderscheid tussen deze twee oorzaken te maken. Ook de genomsequenties van axenische kweken van assemblage A (WB-stam) en assemblage B (GS-stam) laten een allel-sequentiediversiteit zien van respectievelijk 0,01% en 0,53%.¹²

De allel-sequentieheterogeniteit bij Giardia verraadt één van de bijzondere eigenschappen van dit organisme. Giardia heeft twee diploïde kernen, die min of meer simultaan repliceren en allebei transcriptioneel actief zijn. Tijdens de celcyclus delen beide kernen, wat resulteert in vier dochterkernen. Twee dochters van de verschillende kernen fuseren met elkaar en gaan verder als een nieuwe trofozoiet. De consequentie van zo'n scheiding is dat de genetische verschillen tussen de twee kernen van een trofozoiet in de tijd accumuleren. Je zou kunnen zeggen dat er genetische drift binnen een organisme plaatsvindt. ASH wordt veroorzaakt door de gelijktijdige amplificatie en sequentie-analyse van homologe allelen uit beide kernen. De identificatie van 'dubbele pieken' DNA-sequentie profielen is lastig om te standaardiseren, net als het vergelijken van DNA-sequenties met en zonder heterogene nucleotiden. ASH bemoeilijkt dus het gebruik en de interpretatie van moleculaire typering in de epidemiologie van Giardia. Bevredigende oplossingen zijn hiervoor nog niet gevonden.

Conclusie

Door een gebrek aan inzicht in de biologie van Giardia, is het bijzonder moeilijk om de epidemiologie van Giardia(se), virulentiekenmerken en (zoönotische) transmissieroutes te bestuderen met behulp van moleculaire

Figuur 1. Giardia is een diplomonad. De twee diploïde kernen (kern: gekleurde cirkel) delen afzonderlijk van elkaar, maar komen toch samen in een nieuwe dochtercel terecht. Genetische informatie tussen deze twee kernen wordt niet uitgewisseld. ASH ontstaat doordat de twee kernen mutaties over de tijd opstapelen (genetische drift). Orange, blauw en geel symboliseren mutaties in de oorspronkelijke rode en groene kernen.



typeringsmethoden. Complete genomsequenties van meerdere axenische isolaten van iedere (beschikbare) assemblage zal meer inzicht geven in de biologie van Giardia en zal ook het ontwikkelen van nieuwe typeringsmethoden versnellen. Net als bij andere ziekteverwekkers zijn internationale, geharmoniseerde typeringsmethoden en internationale databases, zoals de ZOOPNET-databank heel belangrijk om verschillende studies met elkaar te kunnen vergelijken. Gezamenlijke methoden en databases vormen de basis voor internationale, langdurige prospectieve studies.

Abstract

Giardia duodenalis is a widespread flagellated parasite of mammalian species, including humans, and is regarded as the most common cause of protozoan diarrhoea worldwide. Owing to its invariant morphology, investigation on aspects such as pathogenicity and transmission patterns requires a molecular epidemiological approach. Analyses on different loci indicate the existence of eight genetic groups, two of which are found in both humans and animals. Until now, large-scale analyses of Single and Multi-Locus Sequence Typing have underscored the biological complexity of this parasite. The occurrence of mixed infections, the allelic sequence heterozygosity between the two nuclei of single trophozoites, and the reported occurrence of several distinct recombinational events has complicated the interpretation and questions the usefulness of the existing molecular tools. By using a population genetics approach for the analyses of the available sequence-data, novel biological insights may be obtained from this extraordinary complex eye-catching parasite.

Referenties

1. Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. Variation in Giardia: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in parasitology* 2009;25(2):93-100.
2. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Vinje J, van Duynhoven YT. Etiology of gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001;33(3):280-8.
3. de Wit MA, Koopmans MP, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Bartelds AI, van Duynhoven YT. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerging infectious diseases* 2001;7(1):82-91.
4. Adam RD. Biology of Giardia lamblia. *Clinical microbiology reviews* 2001;14(3):447-75.
5. Andersson JO. Double peaks reveal rare diplomonad sex. *Trends in parasitology* 2011.
6. Caccio SM, Sprong H. Giardia duodenalis: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Experimental parasitology* 2010; 124(1):107-12.
7. Almeida A, Pozio E, Caccio SM. Genotyping of Giardia duodenalis cysts by new real-time PCR assays for detection of mixed infections in human samples. *Applied and environmental microbiology* 2010;76(6):1895-901.
8. Geurden T, Geldhof P, Levecke B, Martens C, Berkvens D, Casaert S, Vercruyse J, Claerebout E. Mixed Giardia duodenalis assemblage A and E infections in calves. *International journal for parasitology* 2008;38(2):259-64.
9. Sprong H, Caccio SM, van der Giessen JW. Identification of zoonotic genotypes of Giardia duodenalis. *PLoS neglected tropical diseases* 2009;3(12):e558.
10. Lalle M, Frangipane di Regalbono A, Poppi L, Nobili G, Tonanzi D, Pozio E, Caccio SM. A novel Giardia duodenalis assemblage A subtype in fallow deer. *The Journal of parasitology* 2007;93(2):426-8.
11. Lebbad M, Petersson I, Karlsson L, Botero-Kleiven S, Andersson JO, Svenungsson B, Svard SG. Multilocus genotyping of human Giardia isolates suggests limited zoonotic transmission and association between assemblage B and flatulence in children. *PLoS neglected tropical diseases* 2011;5(8):e1262.
12. Franzen O, Jernelstrom-Hultqvist J, Castro E, Sherwood E, Ankarklev J, Reiner DS, Palm D, Andersson JO, Andersson B, Svard SG. Draft genome sequencing of giardia intestinalis assemblage B isolate GS: is human giardiasis caused by two different species? *PLoS pathogens* 2009;5(8):e1000560.

Targets en tools voor typering van MRSA in uitbraaksituaties

W. van Leeuwen

Samenvatting

Methicillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) vormt een wereldwijd probleem in de gezondheidszorg. Voor een effectieve MRSA-infectiepreventie is MRSA-screening en het vaststellen van transmissieroutes noodzakelijk. MRSA-screening gekoppeld aan identificatie op stamniveau (typering) spelen een sleutelrol in het verkrijgen van informatie over bestrijding van MRSA-uitbraken en bij de beoordeling van risicofactoren voor transmissie. De keuze van typeringsstrategie, dat wil zeggen de selectie van epidemiologische determinanten op het *S. aureus*-genoom, is afhankelijk van de epidemiologische onderzoeksvraag. Vergelijking van het genoom van verschillende *S. aureus* isolaten laat zien dat het genoom globaal is opgebouwd uit verschillende gebieden, ieder met een eigen evolutionaire kloksnelheid. Dit overzichtartikel beschrijft de evolutie van epidemiologische determinanten op het *S. aureus*-genoom die als target dienen voor de verschillende MRSA-typeringsmethoden.

Trefwoorden

MRSA-geno- en fenotypering, epidemiologische determinanten, evolutie.

Inleiding

S. aureus is een buitengewoon veelzijdig pathogeen, die onvriendelijke omgevingsfactoren kan overleven, huid en slijmvliezen kan koloniseren en een breed scala aan ernstige infecties bij mens en dier kan veroorzaken. In de laatste 50 jaar hebben enkele *S. aureus*-klonen zich kunnen ontwikkelen tot multiresistente MRSA's, die zich wereldwijd hebben verspreid.¹

Epidemiologische determinanten in *S. aureus*

Voor de ontwikkeling van epidemiologische merkers voor typeringsmethoden is niet alleen kennis van de genoomsamenstelling onontbeerlijk, ook de samenstelling van de *S. aureus*- populatiestructuur speelt hierin een belangrijke rol. De populatiestructuur van *S. aureus* is klonaal. Dit werd voor het eerst aangetoond met technieken zoals multi-locus enzymelektroforese (MLEE)² en later bevestigd met 'multi-locus sequence typing' (MLST).³ Bij MLST worden de gedeeltelijke sequenties van zeven huishoudgenen op nucleotideniveau vastgesteld en kan isolaten op

basis van het allelprofiel een 'sequence type' (ST) worden toegewezen. Isolaten met zes of zeven overeenkomstige allelen worden ingedeeld in een 'clonal complex' (CC). De MRSA-populatie blijkt voor het grootste deel te zijn opgebouwd uit een beperkt aantal CC's.⁴ Bijna 90% van alle humane *S. aureus*-isolaten kan worden onderverdeeld in 11 CC's.⁵ Er is dus weinig uitwisseling van genetisch materiaal tussen *S. aureus*-isolaten van verschillende CC's. Uit MLST-resultaten³ bleek dat de sequentieveranderingen die leidden tot nieuwe allelen, voornamelijk waren ontstaan door puntmutaties en in veel mindere mate door recombinatie (factor 15 verschil).

S. aureus-genoom

De totale genoomsequenties van verschillende *S. aureus*-isolaten laten een grote overeenkomst zien: ongeveer 78% van het genoom is geconserveerd en wordt aangeduid als 'core'-genoom. De overige 22%, het 'accessory' genoom, is variabel en bestaat uit bacteriofagen, genoom- en pathogeniciteitseilanden, geïntegreerde plasmiden en transposons. Het core-genoom is echter niet volledig stabiel. Sommige gebieden zijn instabiel⁶ en de hieringelegen genen coderen voor factoren die bij de pathogenese van infectie betrokken zijn (zoals toxinen en superantigenen). Vaak bevatten deze variabele coregebieden genen met 'tandem repeat' sequenties die variabel kunnen zijn in aantal en samenstelling en worden aangeduid als 'variable number of tandem repeats' (VNTR). In *S. aureus* is dat bijvoorbeeld beschreven voor MSCRAMM's ('microbial surface components recognizing adhesin matrix molecules'). Het mag duidelijk zijn dat de grote variabiliteit in de virulentiegenen het gevolg is van interactie tussen *S. aureus* en het immuunsysteem en het feit dat deze virulentiegenen geen onderdeel uitmaken van de basisstofwisseling van de bacteriecel.⁹

Hoewel recombinatie binnen het *S. aureus*-genoom relatief weinig voorkomt, speelt dit fenomeen toch een belangrijke rol in de pathogeniciteit. Genen waarbij recombinatie voorkomt coderen voor endotoxinen, enterotoxinen,

Correspondentieadres: W. van Leeuwen, moleculair microbioloog, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Erasmus Medisch Centrum Rotterdam, e-mail: w.vanleeuwen@erasmusmc.nl.

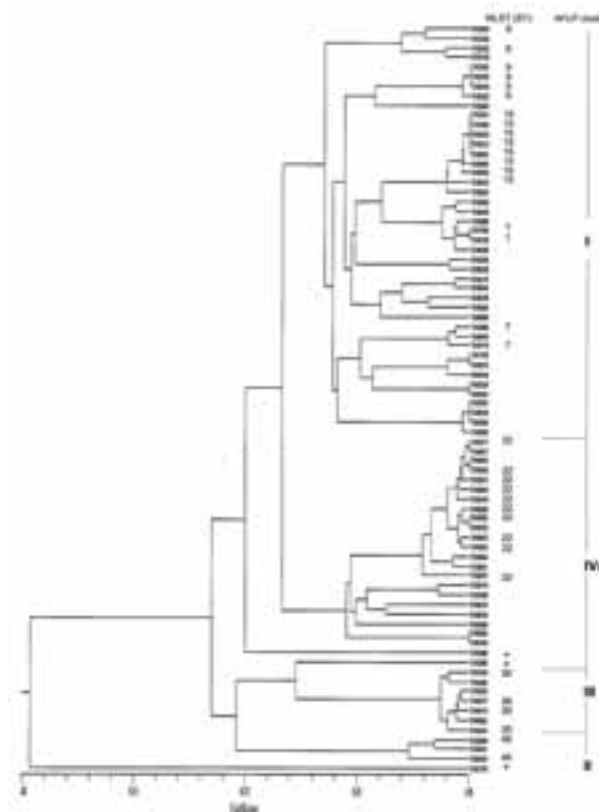
fibronectine-bindende eiwitten en staphylocoagulase. De fylogenetische relatie van het gen dat codeert voor staphylocoagulase (*coa*) loopt niet synchroon met omliggende gebieden of met de geconserveerde epidemiologische determinanten van MLST op het genoom. Dit betekent dat *coa* door horizontale overdracht naar de verschillende *S. aureus*-groepen is overgebracht.^{7,8}

In vitro laat *S. aureus* zich nauwelijks genetisch manipuleren en de cel laat geen exogene plasmiden toe. Bovendien heeft elke *S. aureus*-kloon een 'eigen' reeks bacteriofagen en een selectieve faaggevoeligheid. De oorzaak van deze selectieve faaggevoeligheid (faagtype) is het zogenaamde restrictiemodificatie (RM-)systeem van *S. aureus*. Niet alleen is het RM-systeem verantwoordelijk voor de bescherming van de bacteriecel tegen faaglysis, maar het systeem controleert tevens alle vormen van horizontale overdracht van genetisch materiaal, zoals transformatie, transductie en conjugatie.⁹ Deze RM-systemen, beide van het type I, zijn gelegen op de genomische eilanden γ Sa α en γ Sa β , en zijn in elk *S. aureus*-isolaat aanwezig. De sequentie van één van de componenten van het RM-systeem, het *hsdS*-gen, varieert aanzienlijk tussen de verschillende *S. aureus* CC's. Het eiwit dat gecodeerd wordt door *hsdS* is verantwoordelijk voor de herkenning van een specifieke sequentie in mobiele genetische elementen. Dit leidt vervolgens tot restrictie of modificatie van deze elementen door methylering. Aangenomen mag worden dat een RM-systeem een belangrijke bijdrage levert aan de evolutie van de klonale *S. aureus*-populatiestructuur en het beperken van DNA-recombinatie.

Typeringsmethoden voor MRSA-uitbraakanalyse

Bij korte-termijn epidemiologische vraagstukken, zoals bij uitbraakanalyse, worden typeersystemen gekozen op basis van snel evoluerende epidemiologische determinanten. Dit zijn gebieden die voorkomen op het variabele core-genoom of op het accessory deel van het *S. aureus*-genoom. Het is al eerder opgemerkt dat *S. aureus* een klonale structuur heeft. Dit betekent dat bij genetische analyse van verschillende moleculaire kenmerken, met ieder een eigen kloksnelheid, een vrij hoge consensus van classificatie zal worden bereikt. Verschillende genetische typeermethoden verschillen echter in discriminerend vermogen (figuur 1).¹⁰ Pulsed-field gelelectroforese (PFGE) van genoom-macrorestrictiefragmenten wordt al vele jaren wereldwijd ingezet om lokale MRSA-uitbraken te monitoren. Er zijn criteria beschreven voor de interpretatie van de resultaten (pulsetype) voor het onderzoek van lokale transmissie van MRSA-isolaten.^{11,12} Deze methode heeft een vrij hoge resolutie, maar is technisch vrij complex met de nodige variabele parameters. Daardoor heeft de methode een zeer matige reproduceerbaarheid, waardoor resultaten niet of nauwelijks tussen verschillende laboratoria uitwisselbaar zijn. Bovendien is het protocol vrij langdurig (drie tot vijf dagen). In een enkel geval is een *S. aureus*-isolaat niet

Figuur 1. De klonale populatiestructuur van *S. aureus* komt tot uitdrukking in de hoge mate van consensus tussen de resultaten verkregen met de verschillende typeringsmethoden. De clusteranalyse gaat uit van pulsed-field gelelectroforese van genomisch DNA macrorestrictie fragmenten, die werden vergeleken met de Sequence Types (MLST) en fingerprints gegenereerd met behulp van Amplified Fragment Length Polymorfism. Deze typeermethoden detecteren verschillende epidemiologische determinanten van het *S. aureus*-genoom, elk met hun eigen evolutionaire kloksnelheid.



typeerbaar (zoals veegeassocieerde ST 398 MRSA-isolaten) en moet afgeweken worden van het standaardprotocol.

MLST wordt gezien als de referentiemethode voor het vaststellen van de genetische populatiestructuur van MRSA.¹³ MLST heeft echter een matig onderscheidend vermogen. Er worden immers langzaam evoluerende (geconserveerde) huishoudgenen als epidemiologische merkers gebruikt. Om deze reden is MLST niet geschikt voor uitbraakstudies. Naast de identificatie van de genetische achtergrond zijn er technieken die zich richten op het accessory deel van het genoom, zoals *agr* ('accessory global regulator') of *SCCmec* (staphylococcal chromosome cassette). Beide targets bieden echter te weinig discriminatie voor analyse van uitbraken.

Een 'high-throughput' typeringstechniek die op dit moment wint aan populariteit vanwege de betrekkelijk hoge resolutie, ondubbelzinnige resultaten, en goede reproduceerbaarheid is de 'multi-locus variable number of tandem-repeats' (MLVA) -analyse. Met behulp van deze techniek wordt het aantal tandem repeats vastgesteld

in acht verschillende loci op het *S. aureus*-genoom.¹⁴ De stabiliteit van de techniek vormt evenwel een reden tot discussie. Het polymorfisme van deze repeterende eenheden in de verschillende loci kan aanleiding geven tot misclassificatie vanwege recombinatie, horizontale gen overdracht en homoplasie.¹⁵

Het principe van *spa*-sequentietyperen is gelijk aan dat van MLVA. Het gaat hier echter om één locus. Het vaststellen van het aantal en de samenstelling van tandem-repeats in het *spa*-gen, dat codeert voor het staphylococcal surface protein A, is één van de meest frequent gebruikte MRSA-typeermethoden geworden. Het succes dankt het systeem aan de hoge 'throughput' en hoge reproduceerbaarheid. Hierdoor is uitwisseling van resultaten tussen laboratoria mogelijk. Er bestaat sinds enige tijd een web-based platform, waarin door het invoeren van sequentie-informatie, het *spa*-type kan worden vastgesteld en kan worden vergeleken met de informatie in de database.¹⁶ Evenals bij de MLVA-techniek kunnen de mogelijke instabiliteit van de determinanten aanleiding geven tot misclassificatie.

PCR-gerelateerde technieken voor het typeren van MRSA, zoals repPCR, zorgden in het verleden voor problemen door hun zeer matige reproduceerbaarheid.^{17,18} Niettemin lijkt het Diversilab-systeem (bioMérieux, Frankrijk) een uitkomst te bieden voor het reproduceerbaarheidsprobleem door hoge standaardisatie en robotisering van de repPCR. Het systeem heeft echter voor MRSA-isolaten een te laag discriminerend vermogen en is daardoor ongeschikt voor uitbraakanalyse.

Binaire typeringsmethoden voor *S. aureus* werden reeds 15 jaar geleden ontwikkeld met behulp van DNA probes. Recent is een binaire methode op basis van lengtepolymorfismen van de 16S-23S rDNA 'interspace' regio beschreven.¹⁹ Binaire typering vertoont een goede overeenkomst met MLST en AFLP ('amplified fragment length polymorphism'). Met behulp van AFLP kan goed onderscheid worden gemaakt tussen methicilline-sensitieve *S. aureus* 'lineages' en mogelijk ook tussen MRSA-isolaten.^{20,21}

Ten slotte wordt er bij het typeren van bacteriën in toenemende mate gebruikgemaakt van biofysische analysemethoden. Zo wordt de MALDI-TOF-techniek al op grote schaal ingezet in de bacteriologische routinediagnostiek. Tot op heden mist deze techniek echter de resolutie die nodig is voor het discrimineren tussen bijvoorbeeld MRSA-isolaten. Ramanspectroscopie, een fenotypische methode, blijkt over voldoende stabiliteit, reproduceerbaarheid en oplossend vermogen te beschikken om ingezet te worden in MRSA-uitbraaksituaties.²² De methode is snel en het protocol is eenvoudig.²³ Omdat het een fenotypische typeermethode is, kunnen de resultaten evenwel door omgevingsfactoren worden beïnvloed. Derhalve is de toepassing van gestandaardiseerde protocollen een essentiële factor bij Ramanspectroscopie.

Conclusie

Moleculaire typering en intensieve screening van MRSA-dragers is van groot belang voor infectiecontroleprogramma's. Voor het onderzoeken van uitbraaksituaties zijn verschillende typeringstechnieken geschikt. Door snelle beschikbaarheid van de typeringsresultaten kunnen adequate infectiepreventiemaatregelen worden genomen en, indien nodig, worden bijgestuurd. Het is evident dat snelle diagnostiek kosteneffectief is.²⁴ Standaardisatie van typeringsmethoden en afspraken over de nomenclatuur van MRSA-isolaten zijn essentiële factoren in de samenwerking op het gebied van surveillance van (inter)nationale verspreiding van MRSA.

Referenties

1. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* 2001; 7:178-82.
2. Fitzgerald JR, Meaney WJ, Hartigan PJ, et al. Fine-structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol Infect.* 1997;119:261-9.
3. Enright MC, Robinson DSA, Randle G, et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99:7687-92.
4. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related genotypes from multilocus sequence typing data. *J. Bacteriol.* 2004;186:1518-30.
5. Feil EJ, Cooper EJ, Grundmann H, et al. How clonal is *Staphylococcus aureus*? *J Bacteriol.* 2003;185:3307-16.
6. Lindsay JA, Moore CE, Day NP, et al. Microarrays reveal that each of the ten dominant lineages of *Staphylococcus aureus* has a unique combination of surface-associated and regulatory genes. *J Bacteriol.* 2006;188:669-76.
7. Watanabe S, Ito T, Takeuchi F, et al. Structural comparison of ten serotypes of staphylocoagulases in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2005;197:3698-707.
8. Feng Y, Chen CJ, Su LH, et al. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev.* 2008;32:23-37.
9. Waldron DE, Lindsay JA. Sau I: a novel lineage-specific type I restriction modification system that blocks horizontal transfer into *Staphylococcus aureus* and between *S. aureus* isolates of different lineages. *J Bacteriol.* 2006;188:5578-85.
10. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:222-35.
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol.* 1995;33:2233-9.
12. Blanc DS, Struelens MJ, Deplano A, et al. Epidemiological evaluation of pulsed-field gel electrophoresis patterns for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3442-5.
13. Enright MC, Day NP, Davies CE, et al. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1008-15.
14. Francois P, Huyghe A, Charbonnier Y, et al. Use of an automated multiple-locus, variable-number tandem repeat-based method for rapid and high-throughput genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3346-55.
15. Nubel U, Roumagnac P, Feldkamp M, et al. Frequent emergence and limited geographical dispersal of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105: 14130-5.
16. Friedrich AW, Witte W, de Lencastre H, et al. A European laboratory network for sequence-based typing of methicillin-resistant (MRSA) as a communication platform between human and veterinary medicine-an update on SeqNet.org. *Eur Surveill.* 2008; 13: pii: 18862.

17. Deplano A, Schuermans A, van Eldere J, et al. Multicenter evaluation of epidemiological typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by repetitive-element PCR analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3527-33.
18. Van Belkum A, van Leeuwen W, Kaufmann ME, et al. Assessment of resolution and intercenter reproducibility of results of genotyping *Staphylococcus aureus* by pulsed-field electrophoresis of small restriction fragments: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 1998;36: 1653-9.
19. Budding AE, Vandenbroucke-Grauls CM, Melles DC, et al. Binary IS typing for *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2010;5:e13671.
20. Sergi S, Donnarumma F, Mastromei G, et al. Molecular surveillance and population structure analysis of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in high-risk wards. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:3246-54.
21. Imataki O, Makimoto A, Kato S, et al. Coincidental outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a hematopoietic stem cell transplantation unit. *Am J Hematol.* 2006; 81:664-9.
22. Wulf MW, Willemse-Erix D, Verduin CM, et al. The use of Raman spectroscopy in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of human- and animal-related clonal lineages. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:147-52.
23. Willemse-Erix DF, Scholtes-Timmerman MJ, Jachtenberg JW, et al. Optical fingerprinting in bacterialepidemiology: Raman spectroscopy as a real-time typing method. *J Clin Microbiol.* 2009;47:652-9.
24. Wassenberg MW, Kluytmans JA, Box AT, et al. Rapid screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using PCR and chromogenic agar: a prospective study to evaluate costs and effects. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16:1754-61.

INGEZONDEN

Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India

E. Bowles

In een ingezonden brief in de decemberuitgave van de *Clinical Infectious Diseases (CID)* melden artsen uit het Hinduja Hospital in Mumbai (het voormalige Bombay) India een cluster van vier patiënten met 'Totally Drug-Resistant' Tuberculose (TDR-TB).¹

De betreffende stammen zijn resistent tegen de gebruikelijke eerstelijnsmiddelen: isoniazide, rifampicine, ethambutol, pyrazinamide, streptomycine en tweedelijns anti-TB-middelen: ofloxacin, moxifloxacin, kanamycine, amikacine, capreomycine, para-aminosalicylzuur en ethionamide. De vier stammen zijn alle getest in de MGIT 960. Drie van de vier stammen zijn ook nog met de MTB-DR plus en de MTB-DRsl line probe assays van Hain getest. Bij drie van deze vier patiënten bleek er een voorgeschiedenis te zijn van verkeerde tweedelijns-antibioticaregimes: verkeerde middelen, te laag gedoseerd, te kort, ongesuperviseerd. De patiënten hadden behandeling gezocht in privéklinieken.

India heeft een goed 'National Tuberculosis Control Programme', dat echter geen mogelijkheden biedt voor patiënten met MDR-TB. Deze patiënten zijn aangewezen op privéklinieken, die niet worden gecontroleerd op kwaliteit van zorg of kwalificaties van de dokter.¹

Zonder twijfel gaat het bij dit cluster van vier patiënten om het spreekwoordelijke topje van de ijsberg. De miljoenenstad Mumbai, met ruim 20.000 inwoners/km² een van de dichtstbevolkte steden van de wereld (vgl. Amsterdam 3.500/km²), herbergt een belangrijk zakencentrum, de grootste filmindustrie ter wereld (Bollywood), maar ook een enorme, extreem arme populatie. Meer dan 50% van de 12 miljoen inwoners van Mumbai woont in sloppenwijken. Het percentage patiënten dat toegang heeft tot een microbiologische diagnose, laat staan tot gevoeligheids-

testen voor tweedelijns tuberculostatica, is minimaal. Het merendeel van Mumbai's TB-lijders hoest zijn tuberculose ongediagnosticeerd in het rond.

Wereldwijd, maar vooral in gebieden waar tuberculose hoog endemisch is, is er een enorm gebrek aan mogelijkheden om de diagnose 'tuberculose' microbiologisch te bevestigen. De WHO schat dat minder dan 5% van de nieuw gediagnosticeerde TB-patiënten wordt getest op antibiotische gevoeligheid.²

Een derde van de landen waar resistente tuberculose voorkomt heeft niet eens een laboratorium met de mogelijkheid om resistente stammen te detecteren. Naar schatting heeft slechts 1 op de 10 patiënten met een MDR-tuberculose toegang tot adequate behandeling.²

Er wordt nog naarstig gezocht naar nieuwe behandelingsmogelijkheden voor resistente TB. Er wordt onder meer onderzoek gedaan naar hogere doseringen en andere combinaties van bestaande middelen, nieuwe toepassingen van oude middelen, zelfs oude antipsychotica worden uit de kast gehaald en lijken veelbelovend.³ Maar de tijd dringt.

Referenties

1. Udhwadia ZF, Amale RA, Ajani KK, Rodrigues C. Totally Drug-Resistant Tuberculosis in India. *Clin Infect Dis.* 2011 Dec 21.
2. Global Tuberculosis Control 2011, WHO Report 2011.
3. Abbate E, Vescovo M, Natiello M, et al. Successful alternative treatment of extensively drug-resistant tuberculosis in Argentina with a combination of linezolid, moxifloxacin and thioridazine. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012;67:473-7.

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

Determinants of the Development and Evolution of HIV-1 Drug Resistance

Op 19 januari 2012 heeft drs. A. Fun zijn proefschrift getiteld “Determinants of the Development and Evolution of HIV-1 Drug Resistance” verdedigd in het Academiegebouw van de Universiteit Utrecht. Hij heeft zijn promotie-onderzoek uitgevoerd onder begeleiding van prof. dr. Emmanuel J.H.J. Wiertz, professor Experimentele virologie (promotor), dr. Monique Nijhuis, associate professor moleculaire virologie (copromotor) en dr. Annemarie M.J. Wensing, klinisch viroloog (copromotor) in het UMC Utrecht.

Het proefschrift van A. Fun beschrijft de ontwikkeling van resistentie tegen antiretrovirale middelen uit verschillende medicijnklassen die virusreplicatie verhinderen door het aangrijpen van fundamenteel verschillende processen van de virale replicatiecyclus: virale maturatie en integratie van het virale genetische materiaal in de gastheercel. Hierna volgt een samenvatting van het onderzoek en de bevindingen die in het proefschrift zijn vastgelegd.

Als hiv een cel heeft geïnfecteerd en de hele replicatiecyclus heeft doorlopen, verlaten de nieuw gevormde virusdeeltjes de gastheercel als nog niet volledig ontwikkelde, niet-infectieuze deeltjes. De overgang van niet-infectieus naar infectieus virusdeeltje is een proces dat maturatie heet. Dit proces houdt in dat één van de virale enzymen (protease) de structurele eiwitten, die nog als één lang geheel aan elkaar zitten, opknipt in de uiteindelijke functionele eiwitten. Als dit proces wordt verstoord, blijven de virusdeeltjes niet-infectieus, wat maturatie een ideaal aangrijpingspunt voor antivirale middelen maakt. Een belangrijke groep binnen de antiretrovirale middelen vormen de proteaseremmers, die aan het virale enzym protease binden. Een andere groep remmers waar onderzoek naar is gedaan, is die van een nog experimentele klasse van hiv-medicijnen: de maturatieremmers. In tegenstelling tot proteaseremmers grijpen zij niet aan op protease, maar op de structurele eiwitten zelf.

Het virale genoom moet in het DNA van de gastheercel worden ingebouwd. Het virale enzym integrase is hier primair verantwoordelijk voor en is het aangrijpingspunt van de antiretrovirale klasse van integraseremmers.



Ontwikkeling van resistentie varieert per medicijn en medicijnklasse. Een belangrijke verklaring hiervoor is de genetische barrière van een medicijn (het aantal mutaties dat nodig is om aan de medicijndruk te ontsnappen en het gemak waarmee het virus deze selecteert). De onderzoekers laten zien dat voor resistentie tegen bevirimat (een experimentele maturatieremmer) maar één mutatie nodig is en deze heeft nauwelijks of geen negatief effect op de replicatie van het virus. De onderzoekers laten ook zien dat behandeling met proteaseremmers dramatische consequenties kan hebben voor de successieve behandeling met maturatieremmers, ondanks dat het een verschillende medicijnklasse is.

Voor resistentie tegen raltegravir (integraseremmer) zijn meer mutaties nodig en alle primaire mutaties hebben een negatief effect op de virale replicatie. Daarom worden meestal secundaire mutaties geselecteerd die niet alleen de resistentie verhogen maar ook de replicatie verbeteren. In het onderzoek wordt zichtbaar dat al vroeg tijdens de behandeling meerdere resistente varianten worden geselecteerd en dat de meest fitte variant dominant wordt. Verrassend genoeg kan een dominante variant later worden vervangen door een variant met een andere primaire mutatie en kunnen ook meerdere varianten (met verschillende primaire mutaties) naast elkaar in de populatie bestaan, iets dat voor andere medicijnklassen vrijwel niet gezien wordt. Voor medicijnen met een hele hoge genetische barrière, zoals darunavir (proteaseremmer), is het verhaal nog gecompliceerder. Er zijn zoveel mutaties tegelijk nodig om resistent te worden dat die nooit spontaan allemaal tegelijk ontstaan. De onderzoekers laten zien dat bepaalde polymorfismen (variaties tussen de virussen die van nature voorkomen) de genetische barrière van darunavir kunnen verlagen. Uitgaande van een wild type virus zijn de onderzoekers er in geslaagd een heel hoge mate van resistentie tegen darunavir te selecteren, terwijl er geen aanwijsbare darunavir-resistentiemutaties in het virale protease werden geselecteerd. Deze mutaties liggen vermoedelijk in de structurele eiwitten. Dit geeft aan dat de interactie tussen verschillende virale componenten, in dit geval de structurele eiwitten en het protease enzym, enorm belangrijk kunnen zijn voor de ontwikkeling van resistentie.

Correspondentieadres: A. Fun, Department of Virology, Medical Microbiology, University Medical Center Utrecht, e-mail: a.fun@umcutrecht.nl.

PROMOTIES

23 november 2011 **E. Nevedomskaya**

Metabolomics of biofluids: from analytical tools to data interpretation

Promotor: prof. dr. A.M. Deelder, copromotor: dr. O.A. Mayboroda

LUMC Leiden, afd. Parasitologie

2 december 2011 **C. van Tienen**

(Molecular) epidemiology of HIV-1, HIV-2 and HTLV-1 in Guinea-Bissau

Promotor: prof. dr. R.A. Coutinho, copromotores: dr. M.F. Schim van der Loeff en prof. dr. H.C. Whittle

AMC Amsterdam, afd. Inwendige Geneeskunde. RIVM, Centrum Infectiebestrijding

18 januari 2012 **K.A. Kusi**

Towards a blood stage malaria vaccine; dealing with allelic polymorphism in the vaccine candidate apical membrane antigen 1

Promotor: prof. dr. A.M. Deelder, copromotores: dr. C.H.M. Kocken en dr. E.J. Remarque

LUMC Leiden, afd. Parasitologie

19 januari 2012 **A. Fun**

Determinants of the Development and Evolution of HIV-1 Drug Resistance

Promotor: prof. dr. E.J.H.J. Wiertz, copromotores: dr. M. Nijhuis en dr. A.M.J. Wensing

UMC Utrecht, afd. Medische Microbiologie

17 februari 2012 **R. Heymans**

Molecular typing of *Treponema pallidum* and *Neisseria gonorrhoeae*

Promotor: prof. dr. R.A. Coutinho, copromotores: dr. S.M. Bruisten en dr. M.F. Schim van der Loeff

AMC Amsterdam, afd. Inwendige Geneeskunde. RIVM, Centrum Infectiebestrijding

19 juni 2012 **S.M. Hermans**

HIV and tuberculosis co-infection in Uganda: clinical management, immune reconstitution and health service delivery

Promotores: prof. dr. A.I.M. Hoepelman en prof.dr. J.M.A. Lange, copromotores: dr. Y.C. Manabe en dr. F. van Leth

Universiteit van Utrecht, afd. Medische Microbiologie en afd. Inwendige Geneeskunde. AMC Amsterdam, afd. Inwendige Geneeskunde

PERSONALIA

Nieuwe leden

- Mw. J.L. de Beer
- Mw. A. Dirks
- F. Gulraiz
- Dhr. P.P.A. Lestrade
- Mw. S. Hansenova Manaskova
- Mw. H.C. van der Mei
- Mw. M.S.M. van Mourik
- Mw. N. Roescher
- Mw. E.M. Terveer
- Mw. C. Toukoki
- Mw. M.L. Vandecandelaere
- Mw. A. Wattel
- Mw. H.F.M. Willemse-Erix

ORATIE

26 januari 2012 **prof. dr. P.R. Klatser**

Ter gelegenheid van zijn benoeming tot hoogleraar Ontwikkeling en evaluatie van diagnostische tests in ontwikkelingslanden, houdt prof. dr. P.R. Klatser zijn oratie getiteld 'De diagnostische test gediagnosticeerd'.
Universiteit van Amsterdam, afd. Parasitologie

23 april 2012

HCV-proteaseremmers en actualisering EASL

Utrecht, locatie nog niet bekend

Informatie: www.virology-education.com

6-9 mei 2012

8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing Escherichia coli Infections

RAI, Amsterdam

<http://www.VTEC2012.org>

8-12 mei 2012

30th ESPID

Thessaloniki, Griekenland

<http://www2.kenes.com/espид/Pages/Home.aspx>

4 juni 2012

332^e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur

Informatie: S. Kuipers

5 juni 2012

Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie (NWKV), met WMDI

Informatie Annelies Riezebos-Brilman (secretaris)

tel. 050-3616161

<http://www.nvmm.nl/nwkv>

13-16 juni 2012

15th International Congress on Infectious Diseases (ICID), in collaboration with the Infectious Disease Association of Thailand

Bangkok, Thailand

http://www.isid.org/15th_icid/

21 juni 2012

SWAB-symposium: Behandeling van multiresistente gramnegatieve bacteriën

Aanvang: 12.30 uur. Media Plaza, Utrecht (Jaarbeurs)

Informatie: www.congresscare.com en www.swab.nl

21-22 juni 2012

4^e Nederlandstalige Tuberculose Diagnostiek Dagen

Instituut voor Tropische Geneeskunde, Antwerpen

Inschrijving: [www.http://www.tuberculosis.rivm.nl](http://www.tuberculosis.rivm.nl)

28-29 juni 2012

Summer Frontiers

Nijmegen

4-7 september 2012

15th Annual ESCV together with ESVV

Madrid, Spanje

<http://www.escv.org/>

9-12 september 2012

ICAAC-2012

San Francisco, VS

<http://www.icaacglobal.com/saleskit/Home.aspx>

10 september 2012

Werkgroep Algemene Medische Microbiologie (voorheen wgr. Oost & West)

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur

Informatie: T. Schulín, tel. 024-3614356, R.W. Vreede,

tel. 015-2604305