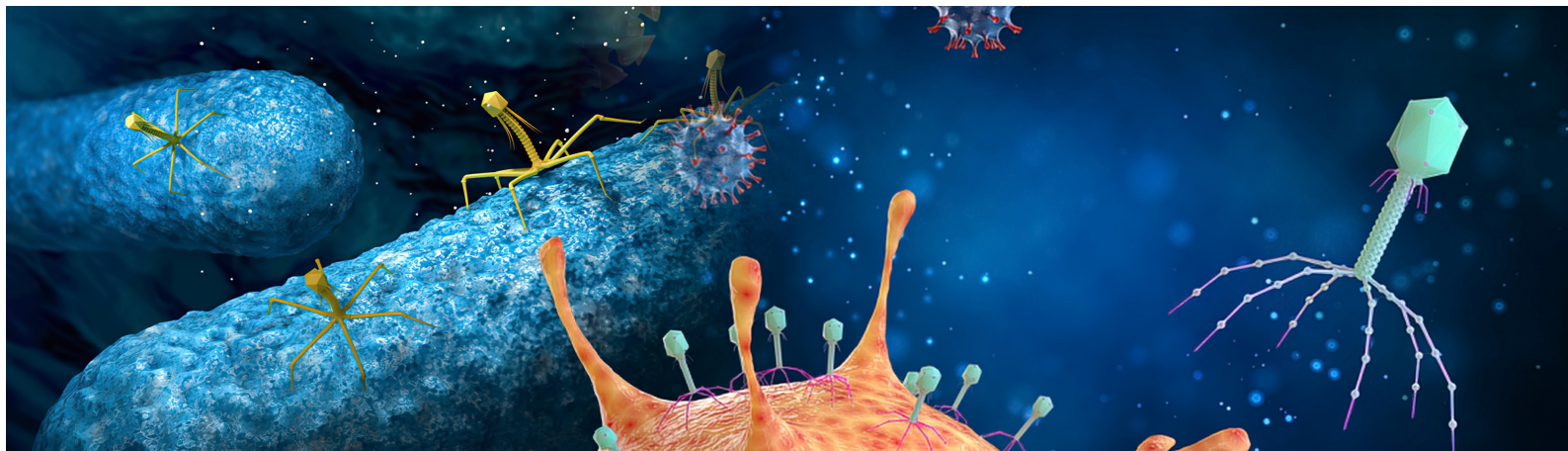


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



nederlandse vereniging voor medische microbiologie

Thema

Faagtherapie

COVID-19

Coronadashboard

Corona en Q-koorts

Immuunrespons B en T!

Influenza-overzicht 2019/2020

Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie

Het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) informeert lezers over zowel fundamentele als klinische relevante ontwikkelingen binnen het vakgebied. Ook biedt het plaats voor promoties, symposium- en congresverslagen en cursusaankondigingen.

NVMM-secretariaat

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

Hoofredactie

Dr. Esther Heikens, dr. Bert Mulder

Redactie

Dr. Jarne M. van Hattem, Nicolien M. Hanemaaijer, dr. Jaap J. van Hellemond, Maarten Heuvelmans, Jan A. Kaan, dr. Bob Meek, dr. Janette C. Rahamat-Langendoen, Gro L. Vlaspolder, dr. René te Witt

Redactiesecretariaat

Alphatekst, Marina Kapteyn
Baronie 42
2405 XG Alphen aan den Rijn
tel. 06 12076835
marina@alphatekst.nl

Frequentie 4 x per jaar. Alle rechten voorbehouden. Op deze uitgave is het redactiereglement van toepassing.

Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, 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 redactie. De redactie verklaart dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kan de redactie op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. De redactie aanvaardt 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.

Inhoud

Van de redactie - Editorial

De rol van faagtherapie in de bestrijding van infectieziekten en een bewogen coronajaar 150

Thema: Bacteriofaagtherapie

Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie 151

Deel 2: Bacteriële resistentiemechanismen

Julia Egido Egido, Pieter Jan Haas, Ana Rita Costa, Annabel Niessen

Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie 155

Deel 3: De genetische basis van faag-resistentiemechanismen

Julia Egido Egido, Pieter Jan Haas, Ana Rita Costa, Annabel Niessen

Ervaringen met faagtherapie in Nederland 159

Saskia Kuipers

Artikel

Influenzaseizoen 2019/2020 in Nederland 162

Een milde korte influenza A-epidemie

Ron Fouchier, Adam Meijer, Mariëtte Hooiveld, Rianne van Gageldonk-Lafeber, Marit de Lange, Marion Koopmans

Thema: COVID-19

Lokale verschillen van de corona-epidemiologie in beeld met een dashboard 172

Eric Hazenberg, Peter Wever, Peter Schneeberger

Doorgemaakte Q-koorts geassocieerd met ernstige ziekte of sterfte van COVID-19-patiënten? 178

Bert Mulder, Jona Walk, Mirjam Dautzenberg, Alfons Olde Lohuis, Marrigje Nabuurs, Ton Dofferhoff

De immunologie achter SARS-CoV-2-afweerrespons, B en T! 182

Michiel Heron, Ailko Bossink, Hendrik Gremmels, Chantal Reusken, Johan Reimerink, Gijs Limonard, Kristin Kremer, Steven Thijsen

Promoties

Promoties 188

De rol van faagtherapie in de bestrijding van infectieziekten en een bewogen coronajaar

Het thema van de decembereditie is dit keer opnieuw de therapeutische toepassing van bacteriofagen. In de editie van september werden onder gastredacteur-schap van Marc Bonten al enkele artikelen opgenomen. Dit keer een vervolg daarop met deel 2 en 3 van de overzichten van Julia Egido Egido over de resistentiemechanismen van fagen. In Nederland is faagtherapie enkele keren toegepast, maar nog zelden beschreven. In 2018 werd in het *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* door Van der Meer en Vandenbroucke-Grauls een oproep gedaan tot het voeren van klinische studies over het toepassen van faagtherapie bij multi-resistente infecties.[1] Daar is tot op heden nog geen zicht op. Saskia Kuipers beschrijft voor dit thema casuïstieken van twee met fagen behandelde patiënten, waarbij de productie van de gebruikte fagen niet in ons land heeft plaatsgevonden.

In 1918, ten tijde van de desastreus huishoudende griep, was de aard van de verwekker niet bekend. Commentaren van wetenschappers uit die tijd zijn in oude kranten opvallend afwezig. In de jaren 80, toen de opkomst van het *acquired immune deficiency syndrome* stap voor stap duidelijk werd, was de aandacht van wetenschappers wisselend van intensiteit over het beloop van een aantal jaren naar gelang er meer bekend werd over de virale oorsprong. In het afgelopen jaar is de feitenstroom rond het nieuwe coronavirus op alle facetten van ons vak zo overweldigend dat vakbladen zich wereldwijd intensief bezighouden met Covid-19. Het jaar is nog niet ten einde en er wordt nog steeds geschiedenis geschreven; we maken in het staartje van dit jaar de meest restrictieve maatregelen tot nu toe mee. Op dit moment kan al worden vastgesteld dat er niet veel jaren zijn waarin, met de tientallen optredens van collega's in de media, de microbiologie zo in de belangstelling heeft gestaan als in 2020.

In deze editie is opnieuw plaats ingeruimd voor drie eerder digitaal gepubliceerde artikelen over Covid-19. Het eerste artikel is van Hazenberg,

die de ontwikkeling beschrijft van een datasysteem rond de registratie van testresultaten. In het tweede artikel schrijft Mulder over de associatie tussen doorge-maakte Q-koorts en ernstige ziekte of sterfte bij Covid-19-patiënten. Niet alleen de geografische overlap tus-sen de Q-koortsepidemie en de eerste golf van Covid-19 is interessant. Inmiddels wordt ook steeds duidelij-ker dat, net als chronische Q-koorts, een deel van de Covid-19-patiënten langdurige klachten laat zien die geduid worden als 'long Covid'. In een derde Covid-19-artikel van Heron en anderen worden de bevindingen van onderzoek van de cellulaire afweer bij Covid-19 gepresenteerd.

Hoewel je het na dit heftige coronajaar bijna zou ver-geten, plaatsen we in dit nummer traditiegetrouw van de groep van Fouchier de jaarlijkse beschrijving van de griep epidemie 2019-2020. Op het zuidelijk halfmond is afgelopen zomerperiode gelukkig weinig griepactivi-teit waargenomen, waarschijnlijk in samenhang met de coronamaatregelen. Laten we hopen dat de komende kerst- en nieuwjaarsperiode net zo min een sterke op-leving van griepactiviteit laat zien als een opleving van het SARS-CoV-2, door sommigen al betiteld als dreigende derde golf.

Het lonkend perspectief voor 2021 is dat er een aantal doorbraken te melden is. Ten eerste zullen er in de loop van 2021 diverse coronavaccins beschikbaar komen. In afwachting van de komst van vaccins bieden daarnaast de snelsten de mogelijkheid van laag-drempelig testen bij instellingen, op scholen, in de ho-reca, bij culturele activiteiten en sportwedstrijden. Daarmee moet 2021 na de tweede golf en de lock-down, een veel beter jaar dan 2020 gaan worden.

De redactie wenst alle lezers rustige kerstdagen, een goede jaarwisseling en het allerbeste voor 2021 toe.

*Namens de redactie,
Bert Mulder, Esther Heikens, Jan Kaan*

1. Ned Tijdschr Geneesk. 2018;162:D2433

Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie

Deel 2: Bacteriële resistentiemechanismen

Julia Egido Egido, Pieter Jan Haas, Ana Rita Costa, Annabel Niessen

Feuilleton in vijf delen

In vijf delen (in achtereenvolgende uitgaven van het *NTMM*) worden de huidige kennis van bacteriofaag-resistentie, de genetische oorzaak die daarvoor verantwoordelijk is en de manier waarop fagen de tegenaanval inzetten, besproken. Na het eerste deel van in totaal vijf delen in de vorige editie volgen hier en tweede en derde hoofdstuk. In deel 2 wordt aandacht gegeven aan de bacteriële resistentiemechanismen die een faag moet overwinnen. Deel drie is aansluitend in deze editie opgenomen.

Resistentiemechanismen

Het tweede van de vijf delen over faagtherapie gaat over de resistentiemechanismen waarover de bacterie beschikt om zich te beschermen tegen een faag.

Om faagtherapie te laten slagen, moet rekening gehouden worden met de resistentieontwikkeling door de bacterie. In een overzichtsartikel publiceerde Oeschlin in 2018 een uitgebreid overzicht waarin de uitkomst van verschillende casus beschreven worden met faagtherapie zowel binnen de veehouderij als in een klinische setting.[1] Hierin laat hij zien dat in de meeste onderzoeken bij zoogdieren de resistente populaties al vaak binnen uren na de eerste gift fagen worden waargenomen. De exacte mechanismen die hieraan ten grondslag liggen, worden echter zelden onderzocht in deze experimenten.

Blokkeren van adsorptie

De verschillende bacteriële verdedigingsmechanismen kunnen zich richten op vrijwel elke stap binnen de infectiecyclus van de bacteriofaag.[2] De eerste barrière die bacteriën kunnen opwerpen is het blokkeren de van voor de faag noodzakelijke receptoren. Door het produceren van extracellulaire matrix ontstaat een fysieke barrière

die de oppervlaktereceptoren verbergen. Ook beschermen extracellulaire polymeren zoals alginaat en hyaluronzuur bacteriën tegen vijandige omgevingscondities; zij fungeren als virulentiefactor en spelen een rol bij het vormen van biofilms.[3]

Een andere manier om het aanhechten van fagen te blokkeren, is het produceren van eiwitten die de receptoren blokkeren of maskeren. Een voorbeeld is het eiwit TraT; dit gaat een interactie aan met de OmpA-receptor in *Escherichia coli* waarmee deze ontoegankelijk wordt voor bepaalde fagen.[4] Fagen kunnen zelf ook eiwitten produceren waarmee receptoren geblokkeerd worden. Hiermee worden aanvullende infecties met dezelfde of nauw gerelateerde faagsoorten voorkomen. Dit fenomeen wordt superinfection exclusion (Sie) genoemd. Het Sie-mechanisme voorkomt tevens de inactivatie van nieuwe viruspartikels door binding aan receptoren van bacterieresten vroeg na de lysis. Dit mechanisme werd waargenomen in faag T5. Deze faag produceert het lipoproteïne Llp dat zijn eigen receptoren blokkeert.[5] Ook bacteriën onder stress kunnen dergelijke maskerende moleculen produceren.[6] Een ander verdedigingsmechanisme van bacteriën is het produceren van buitenmembraanvesikels die fungeren als lokaas, waardoor een deel

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie, J. Egido Egido, promovendus, P.-J. Haas, arts-microbioloog, TU Delft, afdeling Bionanoscience, dr. A.R. Costa. Correspondentie: P.J.A.Haas@umcutrecht.nl.

Oorspronkelijke titel van dit artikel: Understanding and overcoming resistance mechanisms in bacteriophage therapy. Vertaling: Annabel Niessen, arts-onderzoeker (F.A.Niessen@umcutrecht.nl).

van de omringende fagen wordt weggevangen.[7] De expressie van faagreceptoren wordt vaak gereguleerd door genetische modulators die betrokken zijn bij fasevariatie. Fasevariatie is een soort aan-uitmechanisme waarmee bacteriën hun fenotype kunnen aanpassen aan bepaalde omgevingsomstandigheden. Dit proces wordt met name gezien als een manier om het immuunsysteem van de gastheer te vermijden, maar blijkt ook een rol te spelen bij het ontwijken van infecties door fagen.[8] Zo kan de expressie van bepaalde oppervlaktereceptoren worden verminderd door fasevariatie. Ook kunnen receptoren van samenstelling veranderen door verschillende voorgeprogrammeerde mutaties. Sommige fasespecifieke moleculen zijn tevens betrokken bij de bacteriële pathogenese, zoals virulentiefactoren, adhesinen en toxinen.[9] Fasevariatie als reactie op blootstelling aan fagen kan hierdoor resulteren in een verandering in virulentie van de bacterie. Dit zou betekenen dat bacteriën gevoeliger kunnen worden voor de werking van het humane immuunsysteem of voor bepaalde antibiotica. Virulentie kan echter ook toenemen als gevolg van fasevariatie. Het is belangrijk deze mogelijke effecten van bacteriofagen in beschouwing te nemen bij het ontwikkelen van faagtherapie. De onderliggende genetische mechanismen worden later in dit overzicht besproken.

Obstructie van toegang tot het bacteriële DNA

De tweede stap in het infectieproces van de faag waar verdedigingsmechanismen op inspelen, is de toegang tot het cytoplasma.[2] Fagen degraderen hiervoor de peptidoglycaanlaag van de celwand; in het geval van gramnegatieve bacteriën zal het DNA ook het buitenmembraan moeten passeren. Hierna zal het DNA moeten worden getransloceerd door het binnenmembraan naar het cytoplasma. Deze stappen kunnen worden geblokkeerd door membraangeassocieerde eiwitten. Deze worden meestal gecodeerd door profaag-DNA. Dit is ook een voorbeeld van de rol van het Sie-systeem. Het obstruerende effect van deze membraangeassocieerde eiwitten berust op het remmen van de formatie van het kanaal waar het DNA doorheen migreert, het inhiberen van het faaglysozym dat de peptidoglycaanlaag degradeert of het voorkómen van translocatie door het veranderen van de conformatie van de eiwitten rondom de plaats van ejectie.[10]

Degradatie van DNA: restrictie-modificatiesystemen

Als het faag-DNA eenmaal de gastheercel binnengedrongen is, zal het een van de meest beschreven bacteriële verdedigingsmechanismen tegenkomen: het restrictie-modificatie (R-M)-systeem. Dit werkingsmechanisme is gebaseerd op de het gecombineerde effect van methyltransferase en een restrictie-enzym.[11] Methyltransferase methyleert endogeen DNA op specifieke plekken, hetgeen voorkómt dat het DNA gesplitst wordt door een restrictie-enzym. Methyltransferases herkennen vaak hemigemethyleerd DNA, dit is het product van de replicatie van gemethyleerd DNA. Restrictie-enzymen herkennen daarentegen vreemd, ongewijzigd DNA en splitsen dit op specifieke locaties. Meestal zijn dit vier tot acht baseparen-lange palindromische sequenties. Het evenwicht tussen de activiteit van deze twee enzymen bepaalt het lot van het binnenkomende faag-DNA. Restrictie-enzymen hebben veelal een hogere verwerkingssnelheid dan methyltransferases. Maar als het faag-DNA gemethyleerd wordt voordat het restrictie-enzym het kan splitsen, kan het naburige cellen infecteren. Interessant is dat methyltransferases over het algemeen meer geconserveerd zijn dan restrictie-enzymen, die sneller evolueren om de mutaties in het faaggenoom bij te houden.[12] R-M-systemen worden daarom in de basenvolgorde van bacteriële genomen meestal geïdentificeerd door de genen die overeenkomen met methyltransferases. [12]

Er zijn vier klassieke typen van R-M systemen.[11] Het type II-systeem komt het meest voor en bestaat uit een methyltransferase en een restrictie-enzym, die onafhankelijk van elkaar werkzaam zijn als twee aparte eiwitten.

De kennis over R-M-gerelateerde systemen blijft groeien naarmate er meer bekend wordt over bacteriële genomen. Een voorbeeld hiervan is het verdedigingssysteem DISARM ('defence island system associated with restriction-modification'), dat geassocieerd wordt met restrictie-modificatie.[13] Dit systeem bevat ook een methyltransferase en een restrictiemodule. Deze restrictiemodule werkt echter anders dan de restrictie-enzymen en is afhankelijk van het samenspel van meerdere componenten. Het precieze werkingsmechanisme wordt nog niet volledig begrepen. Hoewel de faagadsorptie niet geblokkeerd wordt, voorkomt het circularisatie (tot cirkelvorm sluiten door verbinding van beide

DNA-uiteinden) van faag-DNA waardoor DNA-replicatie en lysogenie in een vroeg stadium van de infectie worden voorkomen. Vermoed wordt dat DISARM tevens samenwerkt met verschillende R-M-elementen waardoor er een synergistisch effect optreedt tegen faaginfectie.

Faagexclusie (Bacteriophage EXclusion BREX) is een ander verdedigingsmechanisme dat zich richt op het faag-DNA zodra het de gastheercel is binnengedrongen.[14] Ook dit systeem methyleert het gastheereigen DNA om dit te kunnen onderscheiden van exogeen DNA. Het BREX-systeem breekt het niet-gemethyleerde DNA echter niet af, in tegenstelling tot R-M-systemen. Analyse van DNA dat geëxtraheerd is uit door fagen geïnfecteerde bacteriën die BREX tot expressie brengen, wees erop dat BREX replicatie belemmert zonder het faag-DNA te splitsen of te verwerken.[14] Bijzonder aan dit systeem is dat de activiteit van de methylase nodig lijkt te zijn om resistentie te vormen tegen bacteriofagen. Daarnaast is bekend dat gemethyleerd of geglycosyleerd faag-DNA niet gevoelig is voor BREX.[15] In sommige bacteriën wordt vreemd DNA onderschept door eiwitten van de Argonaute (Ago)-familie. Deze eiwitten zijn ook aanwezig in eukaryote cellen. Daar reguleren zij de afbraak van exogeen RNA met behulp van interferentie-RNA's (small interfering RNA's, siRNA's) die het doel herkennen. Hoewel dit proces in prokaryote cellen minder goed is bestudeerd, zijn er prokaryotische Ago-eiwitten (pAgo) gevonden in *Thermus thermophilus* (TtAgo) en in *Rhodobacter sphaeroides* (RsAgo). Bij TtAgo berust dit mechanisme op DNA-DNA-interferentie in plaats van RNA-RNA-interferentie in tegenstelling tot eukaryoot Ago.[16] Het TtAgo-proteïne heeft tevens een endonucleasedomein dat zowel enkelstrengs-DNA als negatief *supercoiled* dubbelstrengs-DNA (circulair DNA met een tertiaire winding, dat zich meestal in plasmiden bevindt) kan splijten. Hoewel het onduidelijk is hoe het interferentie-RNA of -DNA wordt gevormd, lijkt de activiteit van het Ago-eiwit zelf nodig te zijn voor de productie hiervan. In tegenstelling tot TtAgo maakt RsAgo gebruik van kleine RNA-moleculen om vreemd DNA te herkennen.[17] RsAgo heeft geen endonucleasedomein, DNA-interferentie wordt in dit geval veroorzaakt door enkel de binding aan het target.

Adaptieve immuniteit: CRISPR-Cas

Een ander mechanisme waarmee bacteriën faag-DNA kunnen degraderen, is met behulp van het CRISPR-Cassysteem (CRISPR staat voor: 'Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats'; Cas staat voor 'CRISPRAssociated Proteins'). Het CRISPR-Casmechanisme is tot nu toe de enige vorm van adaptieve immuniteit die is beschreven in bacteriën. Ze worden verdeeld in zes typen,[18] waarvan type II de bekendste is door de toepassing binnen de biotechnologie.[19]

Na infectie door een faag of plasmide kan de bacterie het vreemd DNA afbreken in kleine fragmenten die als interspacers in de CRISPR-reeks worden geplaatst. De CRISPR-regio van het genoom bestaat uit repetitieve sequenties die worden gescheiden door deze interspacers.[20] Dit creëert een immunologisch geheugen dat het bacteriën mogelijk maakt om vreemd DNA te detecteren na een eerdere infectie. De CRISPR-regio wordt getranscribeerd waarmee korte RNA-fragmenten worden gevormd, zogenaamde CRISPR-RNA's (crRNA's). Elk crRNA-fragment koppelt zich aan een Cas-eiwit en leidt het naar het binnengedrongen DNA. Caseiwitten hebben een endonucleasefunctie en splijten daarmee het vreemd DNA op een sequentiespecifieke manier. Type I en type V CRISPR/Cas-systemen herkennen daarnaast ook een geconserveerde sequentie van drie nucleotiden naast de plek waar het DNA gesplitst is, het 'protospacer adjacent motif' (PAM).[21]

Abortieve infectie

Als al deze verdedigingsmechanismen falen en de bacterie irreversibel is geïnfecteerd door een bacteriofaag, kan de geïnfecteerde bacterie zich opofferen om de rest van de populatie te beschermen. Verantwoordelijk hiervoor zijn de 'abortieve infectiesystemen'. Veel van deze systemen bestaan uit een toxine-antitoxinemechanisme en zijn afhankelijk van de balans tussen een stabiel toxine en een onstabiel anti-toxine.[22]

Infectie van de gastheercel door een faag onderdrukt de productie van antitoxine. Het gevolg hiervan is dat het toxine de overhand krijgt, waardoor de bacterie sterft en er geen nieuwe fagen gegenereerd kunnen worden.

Er zijn verschillende soorten abortieve infectiemechanismen, zoals het RexA-RexB-systeem,[23] het 'Lit'-systeem, het 'PrrC'-systeem,[24] exclusie

van T7 door PifA[25] en de faag-DNA-replicatie, zoals bijvoorbeeld gezien in *Lactococcus*-speciës.[26]

In het derde deel van dit feuilleton gaan we dieper in op de genetische mechanismen van faagresistentie.

Referenties

1. Oechslin F. Resistance Development to Bacteriophages Occurring during Bacteriophage Therapy. *Viruses*. 2018;10(7).
2. Labrie S-J, Samson J-E, Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(5):317-27.
3. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108.
4. Riede I, Eschbach ML. Evidence that TraT interacts with OmpA of *Escherichia coli*. *FEBS Lett*. 1986;205(2):241-245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3527751>. Accessed February 19, 2019.
5. Pedruzzi I, Rosenbusch JP, Locher KP. Inactivation in vitro of the *Escherichia coli* outer membrane protein FhuA by a phage T5-encoded lipoprotein. *FEMS Microbiol Lett*. 1998;168(1):119-25.
6. Decker K, Krauel V, Meesmann A, Heller KJ. Lytic conversion of *Escherichia coli* by bacteriophage T5: blocking of the FhuA receptor protein by a lipoprotein expressed early during infection. *Mol Microbiol*. 1994;12(2):321-32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8057856>. Accessed March 8, 2019.
7. Manning AJ, Kuehn MJ. Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*. 2011;11(1):258.
8. Henderson IR, Owen P, Nataro JP. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol*. 1999;33(5):919-32.
9. Van Der Woude MW, Bäumlér AJ. Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2004;17(3):581-611.
10. Bondy-Denomy J, Qian J, Westra ER, et al. Prophages mediate defense against phage infection through diverse mechanisms. *ISME J*. 2016;10(12):2854-66.
11. Tock MR, Dryden DT. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):466-72.
12. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, Macelis D. REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D269-70.
13. Ofir G, Melamed S, Sberro H, et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities. *Nat Microbiol*. 2018;3(1):90-8.
14. Goldfarb T, Sberro H, Weinstock E, et al. BREX is a novel phage resistance system widespread in microbial genomes. *EMBO J*. 2015;34(2):169-183.
15. Gordeeva J, Morozova N, Sierro N, et al. BREX system of *Escherichia coli* distinguishes self from non-self by methylation of a specific DNA site. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(1):253-65.
16. Swarts DC, Jore MM, Westra ER, et al. DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature*. 2014;507(7491):258-61.
17. Miyoshi T, Ito K, Murakami R, Uchiumi T. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat Commun*. 2016;7(1):11846.
18. Koonin E V, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*. 2017;37:67-78.
19. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-). 2014;346(6213):1258096.
20. Al-Attar S, Westra ER, van der Oost J, Brouns SJJ. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): the hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol Chem*. 2011;392(4):277-89.
21. Gleditzsch D, Pausch P, Müller-Esparza H, et al. PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. *RNA Biol*. September 2018:1-14.
22. Page R, Peti W. Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. *Nat Chem Biol*. 2016;12(4):208-14.
23. Parma DH, Snyder M, Sobolevski S, Nawroz M, Brody E, Gold L. The Rex system of bacteriophage lambda: tolerance and altruistic cell death. *Genes Dev*. 1992;6(3):497-510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1372278>. Accessed February 20, 2019.
24. Snyder L. Phage-exclusion enzymes: a bonanza of biochemical and cell biology reagents? *Mol Microbiol*. 1995;15(3):415-420. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7540246>. Accessed February 20, 2019.
25. Cheng X, Wang W, Molineux IJ. F exclusion of bacteriophage T7 occurs at the cell membrane. *Virology*. 2004;326(2):340-52.
26. Chopin M-C, Chopin A, Bidnenko E. Phage abortive infection in lactococci: variations on a theme. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(4):473-9.

Inzicht in bestrijding van resistentiemechanismen bij faagtherapie

Deel 3: De genetische basis van faag-resistentiemechanismen

Julia Egido Egido, Pieter Jan Haas, Ana Rita Costa, Annabel Niessen

De enorme complexiteit in prokaryotische genomen verklaart de vele verschillende manieren waarop bacteriën zich kunnen aanpassen en resistentie tegen een faaginfectie kunnen ontwikkelen (figuur 1). Bacteriën kunnen zich in een zeer snel tempo delen en zijn aan een constante selectiedruk onderhevig. Zo kunnen mutaties zich in hoog tempo in een bacteriepopulatie verspreiden. Dat fagen een mutageen effect kunnen hebben op bacteriën is al sinds 1963 bekend.[1]

Profagen en plasmiden

Veranderingen in het bacterieel genoom vinden vaak niet willekeurig verspreid plaats. Veel van de in deel twee beschreven resistentiemechanismen worden gecodeerd door genen die geclusterd zijn in zogenoemde 'defence islands'.[2] In deze geclusterde regio's is sprake van geprogrammeerde genetische variatie, die de diversiteit van het genoom sneller en efficiënter kan verhogen dan willekeurig voorkomende puntmutaties. Deze defence islands kunnen worden gereguleerd door mobiele of flexibele genetische elementen. Deze elementen worden wel beschreven als bacterieel mobiloom. De belangrijkste bron voor verrijking van het mobiloom zijn gematigde fagen.[3] Deze elementen kunnen worden overgenomen door volgende generaties of, in het geval van plasmiden, horizontaal worden overgedragen door middel van conjugatie. Deze geïntegreerde elementen kunnen gunstige eigenschappen bevatten die oorspronkelijk ontwikkeld zijn voor faag-faaginteractie.

Homotypische competitie, oftewel competitie tussen fagen van dezelfde of een nauw verwante soort, is een veelvoorkomend fenomeen. Veel profagen coderen voor repressorgen, Sie-systemen of restrictie-modificatiemechanismen

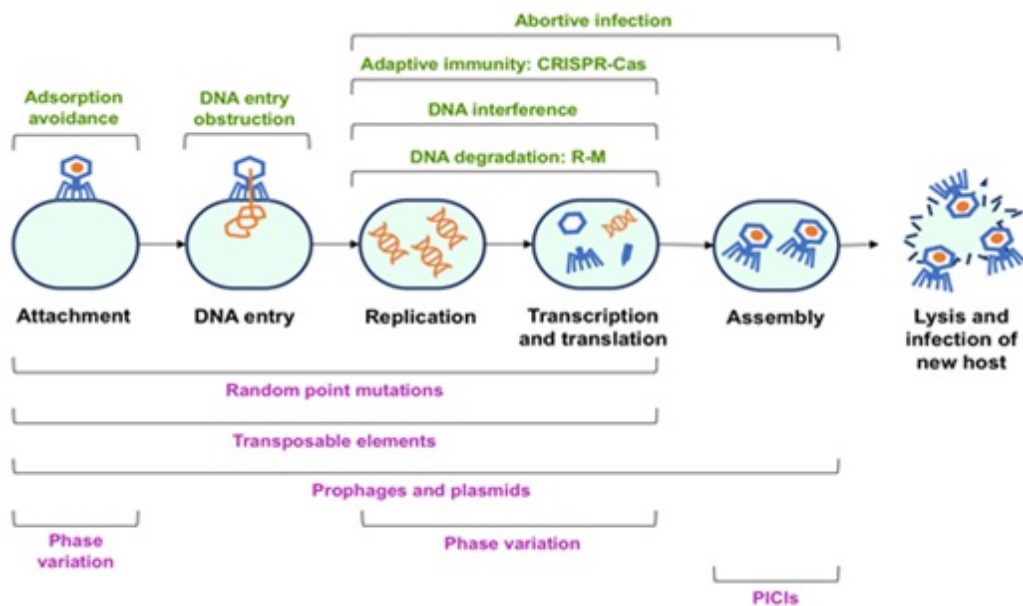
die zich richten op hun eigen of een nauw verwante soort.[4] Op deze manier wordt het aantal vrije fagen, dat andere bacteriën kan koloniseren, vergroot. Competitie tussen verschillende faagsoorten komt veel voor.[5]

Ook plasmiden kunnen verantwoordelijk zijn voor faag-resistentie hoewel ze met name uitgebreid beschreven zijn in relatie tot antibioticumresistentie. Vooral in de voedingsmiddelenindustrie is onderzoek gedaan naar plasmide-gemedieerde faagresistentie voor de bescherming van bacteriestammen die gebruikt worden voor de productie van onder andere zuivelproducten. Dit soort plasmiden zijn beschreven in *Lactococcus lactis*. [6-9]

Plasmiden kunnen daarnaast genetische variaties aanbrengen in het bacteriële genoom door te coderen voor geclusterde inversiegebieden oftewel 'shufflons'. [10] Deze systemen worden maar in enkele bacteriën beschreven. Ze werden voor het eerst gevonden in het plasmide R64 van de *Salmonella* spp. Ze bestaan uit verschillende recombinatiesequenties en een recombinase, Rci, die een inversie of deletie van het tussenliggende DNA teweeg kan brengen. Zo kan geschakeld worden tussen de aan- of afwezigheid van oppervlaktestructuren, zoals pili, die door fagen herkend kunnen worden.[11-12]

Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie, J. Egido Egido, promovendus, P.-J. Haas, arts-microbioloog; TU Delft, afdeling Bionanoscience, dr. A.R. Costa. Correspondentie: P.J.A.Haas@umcutrecht.nl.

Oorspronkelijke titel van dit artikel: Understanding and overcoming resistance mechanisms in bacteriophage therapy. Vertaling: Annabel Niessen, arts-onderzoeker (F.A.Niessen@umcutrecht.nl).



Figuur 1. Samenvatting van de bacteriële resistentiemechanismen (in groen), en van de genetische elementen die daarvoor verantwoordelijk zijn (in magenta) in de opeenvolgende stadia van de infectiecyclus. De aanhechting van de faag kan worden tegengegaan door maskeren, blokkeren, veranderen of onderdrukken van de oppervlaktereceptoren die worden herkend. Obstructie van binnendringen van DNA in het bacteriële cytoplasma wordt bereikt door proteïnen die DNA-ejectie, degradatie van de peptidoglycaanmembraan, of translocatie over de binnenmembraan blokkeren. Faag-DNA is zodra het zich binnen de bacterie bevindt doelwit, waarbij replicatie, transcriptie en translatie van genproducten worden voorkomen. Dit gebeurt door systemen die DNA afbreken, zoals R-M en CRISPR-Cas, en door systemen die het DNA niet alleen knippen maar ook binden, zoals BREX en Argonaute. Abortieve infectiesystemen hebben als doel verspreiding van fagen naar andere bacteriën te voorkomen door het laten afsterven van de geïnfecteerde bacterie in elk stadium van de infectiecyclus.

Expressie van de genen die de voor meeste processen coderen kan worden gehinderd door mutatie op aselechte plaatsen van het genoom, door reguliere puntmutaties of door integratie of deletie van een transposon. De aanwezigheid van DNA van een andere faag in de vorm van een profaag of plasmide kan zorgen voor de verandering van oppervlaktereceptoren of voor het coderen van resistentiemechanismen zoals proteïnen die gerelateerd zijn aan Sie, R-M-systemen of genen die verbonden zijn aan abortieve infectie. Fasevariatiestystemen kunnen voeren tot verandering van het bacteriële fenotype, wat resulteert in veranderingen van de conformatie, of van de expressieniveaus van oppervlaktereceptoren, of in de specificiteit van R-M-systemen. Ten slotte worden PIC's geactiveerd in de aanwezigheid van een invaderende faag, die door de assemblage van nieuwe faagpartikels competeren om de verspreiding naar nieuwe gastheercellen.

Bacteriële fasevariatie

Zoals boven beschreven kan door fasevariatie faaginfectie vermeden worden. Er zijn drie mechanismen die hieraan ten grondslag liggen: locatiespecifieke recombinatie, *slipped-strand mispairing* en epigenetische modificatie.[13] Locatiespecifieke recombinatie vindt plaats op een specifieke plek binnen een korte recombinatiereeks en wordt gemedieerd door een specifiek recombinase.[14] Door inversie van een DNA-segment in het regulatiegebied kan de expressie van een gen worden in- of uitgeschakeld. In sommige gevallen zijn recombinasen in staat om deze inversie de andere kant op te katalyseren, in andere gevallen is hier een ander enzym voor nodig. De aan- of afwezigheid van oppervlaktestructuren

van een bacterie is een van de eigenschappen die kunnen worden gereguleerd door dit mechanisme. Dit gebeurt bijvoorbeeld bij de ontwikkeling van flagellen in *Salmonella* spp en fimbriae in *E. coli*. [15-17] Ook *slipped strand mispairing* vindt plaats in specifieke regio's, maar deze regio's bestaan juist uit korte herhalende DNA-segmenten.[18] Slipped strand mispairing is een mutatieproces dat optreedt in specifieke regio's tijdens DNA-recombinatie, waarbij de verkeerde complementaire basen tegenover elkaar komen te liggen. De regio's waarin dit optreedt bestaan uit korte herhalingen van een bepaalde sequentie.[18] Deze mutaties kunnen stroomopwaarts van het gen of binnen de coderende sequentie optreden.[19]

Slipped strand mispairing kan leiden tot veranderde expressie van een gen of ook tot verandering in het genproduct zelf.[20] Als gevolg daarvan kan slipped-strand mispairing aanleiding zijn voor faagresistentie door onder meer de non-expressie van receptoren [21-22] of R-M-systemen.[23]

Epigenetische modificaties zijn voornamelijk gebaseerd op veranderingen in methyleringspatronen op DNA-sequenties.[24] In bacteriën is methylering van adenine het meest voorkomend en dit wordt gekatalyseerd door het enzym Dam (DNA-adenine-methylase). Methylering door Dam kan een rol spelen bij de onderdrukking van bepaalde promotors.[25] Zo reguleert methylering door Dam het verkorten van O-antigeenketens in de lipopolysacharide van *Salmonella enterica*. [26] Dit maakt de bacterie resistent tegen fagen maar het gaat ten koste van de eigenschap zich te kunnen prolifereren binnen macrofagen, wat de bacterie minder virulent maakt.

Transponeerbare elementen

Ook transponeerbare elementen dragen bij aan de genetische variabiliteit, oftewel transposons. Transposons zijn DNA-fragmenten die hun positie binnen het genoom willekeurig kunnen veranderen. Dit creëert mutaties en in sommige gevallen veranderingen in de grootte van het genoom. Transposons kunnen tussen bacteriesoorten worden overgedragen door middel van fagen.[27] Transpositie van DNA-sequenties stimuleert mutagenese hetgeen de kans op de ontwikkeling van een faagresistent fenotype vergroot.

Een bijzonder voorbeeld van transpositie van bacteriën wordt gezien bij de bacteriofaag Mu. Het genoom van deze faag kan fungeren als een transposon en op willekeurige posities van het bacteriële genoom worden geplaatst. Op deze manier kunnen genen of operons worden verstoord en stimuleert het de mutatiefrequentie.[28] Het genoom kan zijn DNA inbrengen in elke willekeurige fase van de levenscyclus van de bacterie waarbij het meer dan één keer kan worden getransposeerd.[29]

Anderzijds kunnen transposons ook een technisch hulpmiddel zijn om genen die betrokken zijn bij faagresistentie te identificeren. Hierbij worden aselekt gekozen transposons in vitro gebruikt om bacteriële mutanten te selecteren. In deze faagresistente mutanten wordt de insertieplek geïdentificeerd door sequensen om zo het mechanisme

van faagresistentie op te helderen.[30]

Faag-induceerbare chromosomale eilanden

Sommige grampositieve bacteriën hebben een nog slimmere manier waarmee ze hun genoom gebruiken als bescherming tegen faaginfectie. Ze coderen voor zogeheten faag-induceerbare chromosomale eilanden (PICI's). Dit zijn als het ware genetische parasieten die kunnen concurreren met binnengevallen fagen tijdens hun lytische cyclus. De meest bekende zijn de PICI's die gevonden zijn in *Staphylococcus aureus*, de SaPI's.[31] SaPI's worden tot expressie gebracht als reactie op een faaginfectie. Ze kunnen zich repliceren en verpakken zich binnenin de capside van de infecterende faag, waarmee het genoom van de faag zelf wordt verdreven. De nieuw gevormde SaPI-dragende virions barsten vervolgens uit de cel bij de lysis en verspreiden zich naar nabijgelegen bacteriën waar ze concurreren met faaginfectie.

In deel vier gaan we verder in op de mechanismen waarop bacteriofagen de tegenaanval inzetten.

Referenties

1. Taylor AL. Bacteriophage-induced mutation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1963;50(6):1043-51.
2. Koonin E V, Makarova KS, Wolf YI. Evolutionary Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2017;71:23361.
3. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(4).
4. Dedrick RM, Jacobs-Sera D, Bustamante CAG, et al. Prophage-mediated defence against viral attack and viral counter-defence. *Nat Microbiol*. 2017;2(3):16251.
5. Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol Rev*. 2004;28(2):127-81.
6. Hill C, Romero DA, McKenney DS, Finer KR, Klaenhammer TR. Localization, cloning, and expression of genetic determinants for bacteriophage resistance (Hsp) from the conjugative plasmid pTR2030. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(7):1684-1689. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2504114>. Accessed February 6, 2019.
7. Jarvis AW, Heap HA, Limsowtin GK. Resistance against Industrial Bacteriophages Conferred on Lactococci by Plasmid pAJ1106 and Related Plasmids. *Appl Environ Microbiol*. 1989;55(6):1537-43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16347947>. Accessed February 6, 2019.
8. Ainsworth S, Mahony J, van Sinderen D. The Plasmid Complement of *Lactococcus lactis* UC509.9 Encodes Multiple Bacteriophage Resistance Systems. Björkroth J, ed. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(14):4341-9.
9. O' Sullivan D, Ross RP, Twomey DP, Fitzgerald GF, Hill C, Coffey A. Naturally Occurring Lactococcal Plasmid pAH90 Links Bacteriophage Resistance and Mobility Functions to a Food-Grade Selectable Marker. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(2):929-37.
10. Komano T. Shufflons: Multiple Inversion Systems and Integrons. *Annu Rev Genet*. 1999;33(1):171-91.

11. Sitaraman R, Dybvig K. The Hsd Loci of *Mycoplasma Pulmonis*: Organization, Rearrangements and Expression of Genes. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-2958.1997.5571938.x>. Accessed March 9, 2019.
12. Blakely G, Murray N. DNA Restriction and Modification. In: Encyclopedia of Microbiology. Vol. 3. ELSEVIER ACADEMIC PRESS INC; 2009:538-49.
13. Henderson IR, Owen P, Nataro JP. Molecular switches - the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol.* 1999;33(5):919-32.
14. Dybvig K. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 1993;10(3):465-471. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7968525>. Accessed February 18, 2019.
15. Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(17):5724-7.
16. Heichman KA, Johnson RC. The Hin invertasome: protein-mediated joining of distant recombination sites at the enhancer. *Science.* 1990;249(4968):511-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2166334>. Accessed March 9, 2019.
17. Choi Y, Shin H, Lee J-H, Ryu S. Identification and characterization of a novel flagellum-dependent *Salmonella*-infecting bacteriophage, iEPS5. *Appl Environ Microbiol.* 2013;79(16):4829-37.
18. Chandler M, Fayet O. Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Mol Microbiol.* 1993;7(4):497-503.
19. Belland R.J. H-DNA formation by the coding repeat elements of neisserial opa genes. *Mol Microbiol.* 1991;5(10):2351-60.
20. Zhou K, Aertsen A, Michiels CW. The role of variable DNA tandem repeats in bacterial adaptation. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(1):119-41.
21. Sarkari J, Pandit N, Moxon ER, Achtman M. Variable expression of the Opc outer membrane protein in *Neisseria meningitidis* is caused by size variation of a promoter containing polycytidine. *Mol Microbiol.* 1994;13(2):207-17.
22. Willems R, Paul A, van der Heide HG, ter Avest AR, Mooi FR. Fimbrial phase variation in *Bordetella pertussis*: a novel mechanism for transcriptional regulation. *EMBO J.* 1990;9:2803-9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975238>. Accessed March 9, 2019.
23. Adamczyk-Poplawska M, Lower M, Piekarowicz A. Deletion of One Nucleotide within the Homonucleotide Tract Present in the hsdS Gene Alters the DNA Sequence Specificity of Type I Restriction-Modification System NgoAV. *J Bacteriol.* 2011;193(23):6750-9.
24. Casadesús J, Low D. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70(3):830-56.
25. Marinus MG, Løbner-Olesen A. DNA Methylation. *EcoSal Plus.* 2014;6(1).
26. Cota I, Sánchez-Romero MA, Hernández SB, Pucciarelli MG, García-Del Portillo F, Casadesús J. Epigenetic Control of *Salmonella enterica* O-Antigen Chain Length: A Tradeoff between Virulence and Bacteriophage Resistance. *PLoS Genet.* 2015;11(11):e1005667.
27. Babakhani S, Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol.* 2018;58(11):905-97.
28. Fields BN, Knipe DM (David M, Howley PM. *Virology*. Lippincott-Raven Publishers; 1996.
29. Harshey RM. Transposable Phage Mu. *Microbiol Spectr.* 2014;2(5).
30. Barquist L, Mayho M, Cummins C, et al. The TraDIS toolkit: sequencing and analysis for dense transposon mutant libraries. *Bioinformatics.* 2016;32(7):1109-11.
31. Ram G, Chen J, Kumar K, et al. Staphylococcal pathogenicity island interference with helper phage reproduction is a paradigm of molecular parasitism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(40):16300-5.

Ervaringen met faagtherapie in Nederland

Saskia Kuipers

Achtergrond

Bacteriofagen, ook wel de meest voorkomende microben op deze aardbol genoemd en vast onderdeel van het menselijk microbiom, zijn behoorlijk in het nieuws geweest de afgelopen jaren. De sterke toename van antibioticumresistentie sinds 2000 is hier mede debet aan. In de jaren vijftig van de vorige eeuw waren antibiotica volop beschikbaar in Europa en de Verenigde Staten, waardoor de noodzaak tot verder onderzoek naar bacteriofagen verdween. Inmiddels kijkt de wereld, geplaagd door multiresistente bacteriën en sombere toekomstscenario's met onbehandelbare infecties, met een bredere blik naar antimicrobiële mogelijkheden. De toegenomen aandacht blijkt uit publicaties over het gebruik van bacteriofagen bij infecties met ESKAPE-bacteriën (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, en *Enterobacter*-speciës).[1] Na het beschikbaar komen van antibiotica rond 1940 experimenteerden de instituten in Polen, Rusland en Georgië wel verder met bacteriofagen, al bleef de hoeveelheid bruikbare literatuur die daaruit voortkwam summier, zoals beschreven in het Feuilleton Faagtherapie in NTMM, september 2020. Dit artikel beschrijft een aantal klinische casussen en laboratoriumervaring met bacteriofagen.

Casusbeschrijvingen

In het Radboudumc in Nijmegen werden wij in de afgelopen jaren geconfronteerd met diverse patiënten die zelf voor bacteriofaagtherapie hadden gekozen vanwege chronische bacteriële infecties die niet goed reageerden op antibiotica. De ziektebeelden van deze patiënten liepen uiteen.

De eerste patiënt die vroeg of bacteriofagen toegediend mochten worden in het ziekenhuis leed aan *Pseudomonas aeruginosa*-bacteriëmie vanuit een met *P. aeruginosa* gekoloniseerde, 18

jaar bestaande Clagett-holte. De familie van deze patiënt had een bacteriofagenoplossing opgehaald bij het 93 jaar oude Eliava Instituut in Tbilisi, Georgië. De bacteriofagenoplossing met natuurlijk voorkomende lytische fagen wordt geleverd onder de naam 'Intestiphage' en zou werkzaam zijn tegen zeven verschillende grampositieve en gramnegatieve bacteriën, waaronder *Pseudomonas aeruginosa*. In ons laboratorium onderzochten we deze oplossing op werkzaamheid tegen drie verschillende stammen, een *P. aeruginosa*-stam uit bloed en twee stammen uit pus uit de Clagett-holte. De fagen vertoonden geen lytische werking tegen de pseudomonasstammen uit pus, zowel in vitro als in vivo. De holte werd diverse malen gespoeld met Intestiphage. De patiënt overleed uiteindelijk aan een aortale bloeding in de holte. Deze casus illustreert dat bacteriofagen sterk gespecialiseerd zijn en dat een onbekende bacteriofagenoplossing altijd op functionaliteit moet worden getest.

De tweede patiënt leed aan recidiverende *P. aeruginosa*-bacteriëmie vanwege een geïnfecteerd endovasculair focus (TIPS) in de levervenen die niet kon worden verwijderd. Voor deze casus kwamen halverwege 2019 infectioloog Jaap ten Oever, apotheker Roger Brügge-mann en arts-microbioloog Saskia Kuipers bijeen om voor de Inspectie een "Onderbouwing voor de afwezigheid van een adequaat medicamenteus alternatief" te schrijven, met als doel antipseudomonasbacteriofagen uit het Militair Hospitaal Koningin Astrid in Leuven (België) te importeren. Dat stuitte echter op twee bezwaren. De Inspectie (IGJ) had nog geen ervaring met dergelijke aanvragen. Ook de apotheker, die niet kon beloven dat het

Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie, dr. S. Kuipers, arts-microbioloog.
Correspondentieadres:
saskia.kuipers@radboudumc.nl

medicament steriel was, liep aan tegen grenzen die in de regels van de magistrale bereiding waren vastgelegd. De patiënt week uit naar België voor therapie met bacteriofagen in combinatie met twee antipseudomonale middelen, waardoor zijn infectieuze probleem verdween.

Een derde patiënt had na zijn niertransplantatie last van recidiverende urineweginfecties met hardnekkige urethritis door een ESBL-bevattende *Klebsiella pneumoniae*. Er was geen sprake van prostatitis. Vele kuren meropenem, later gecombineerd met amikacine blaasspoelingen, leidden niet tot genezing. De urineweginfectie recidiveerde keer op keer. Hierop stuurde deze patiënt zelf zijn urine naar het Eliava Instituut in Tbilisi in de hoop dat er werkzame bacteriofagen te vinden waren. Het pakket met ampullen met bacteriofagen uit Tbilisi werd door een Belgische kennis in ontvangst genomen, want de Nederlandse wet verbiedt bacteriofagen per post te verzenden.

Het lukte ons niet te achterhalen hoeveel verschillende anti-*Klebsiella pneumoniae*-bacteriofagen in de ampullen aanwezig waren. Wel konden we in ons laboratorium aantonen dat er lytische activiteit was tegen de *K. pneumoniae*-stam uit de urinewegen van onze niertransplantatiepatiënt. Hij diende zelf zijn bacteriofagen oraal en intravesicaal toe, want hij had al ervaring met blaasspoelingen met amikacine. Zijn urethritisklachten verminderden zodra de bacteriofagen intravesicaal waren ingebracht. Door ingestie van fagen verdween ook het darmdragerschap van ESBL-bevattende *Klebsiella pneumoniae* tot onder detecteerbare niveau. Hij genas van zijn chronische infectie met de combinatie van langdurig meropenem en bacteriofagen. De patiënt is in de daarop volgende 18 maanden klachtenvrij gebleven. Zijn succesverhaal werd getoond in de tv-uitzending van "Dokters van Morgen" van februari 2020 en is met zijn toestemming beschreven in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. [2]

Bacteriofagegebruik in de literatuur

Bacteriofagentherapie is sporadisch beschreven bij *Pseudomonas aeruginosa*-sepsis en bij *P. aeruginosa*-pneumonie bij taaislijmziekte en na longtransplantatie, zowel met als zonder antibiotische behandeling en zowel intraveneus als via inhalatie. [3]

Op het gebied van urogenitale infecties verscheen er dit jaar een artikel over een klinische trial naar het gebruik van bacteriofagen bij urineweginfecties na TURP. Hierbij werd de gestandaardiseerde bacteriofagenoplossing Pyophage intravesicaal vergeleken met een orale antibioticumkuur. [4] De suspensie was werkzaam tegen zes verschillende bacteriën en werd zo nodig verrijkt met nieuwe fagen. Pyophage bevatte echter geen fagen gericht tegen *Klebsiella*-speciës. Pyophage werd in vitro getest tegen de verwekkers van de post-TURP-urineweginfecties bij de patiënten en kon veilig worden gebruikt maar leverde geen voordeel op ten opzichte van de antibioticumkuur. Het moet nog worden bewezen dat gepersonaliseerde therapie met grotere concentraties specifieke bacteriofagen gericht betere resultaten geeft. Op theoretische gronden zou een persoonlijke bacteriofaagtherapie - met een geconcentreerde cocktail van actieve fagen werkzaam tegen de specifieke verwekker van de chronische infectie - tot betere resultaten kunnen leiden dan een reeds bereid combinatieproduct. Voor de persoonlijke bacteriofaagtherapie is circa één tot twee weken tijd nodig naast de bacteriële verwekker van de chronische infectie en een reeds bestaande 'phage library'.

Laboratoriumonderzoek naar bacteriofagen

Welke diagnostiek voeren wij uit in ons microbiologische laboratorium als we een bacteriofagenoplossing uit Georgië aangeboden krijgen? We keken de kunst af van Stan Brouns bij de TU Delft, waar een van onze analisten stage kon lopen.

Om de aanwezigheid van werkzame bacteriofagen tegen de pseudomonas- en klebsiellastammen te bestuderen voeren wij een zogeheten 'spot'-test uit. Deze test maakt gebruik van een dubbele laag agar, te weten een vaste voedingsbodem en een wat zachtere topagar. De vaste voedingsbodem is niet alleen een

voedingsstoffenleverancier voor de bacteriën maar ook een aanhechtingsmedium voor de topagar. De topagar bestaat uit 4 milliliter 0,6 procent 'cation-adjusted' Mueller Hintonagar, waaraan 100 microliter van de te onderzoeken bacteriestam in stationaire groeifase is toegevoegd. Boven op deze zachtere agar wordt een druppel bacteriofaagsuspensie gepipetteerd. Daarna wordt de plaat gedurende 18 uur bij 37 graden Celsius geïncubeerd. Dit geldt voor bacteriën die in 18 uur optimaal bij die temperatuur groeien, zoals de meeste stafylokokken, enterobacteriën en niet-fermentoren. Als er plaques zijn gevormd in de topagar daar waar de druppel met bacteriofagen is aangebracht, dan is er lyse (afbraak) van de bacterie oftewel lytische activiteit van de onderzochte fagen, en zijn de bacteriofagen in de plaques inzetbaar als therapie. Overigens lijkt de grootte van de plaques samen te hangen met de capsid-kop van de bacteriofaag. In 2016 beschreven Jurczak-Kurek *et al.* dat bacteriofagen met een kleinere capsidkop juist grotere plaques vormen dan die met een grote capsidkop, juist omdat de fagen met een kleinere kop makkelijker door de agar kunnen bewegen.[5]

De afzonderlijke bacteriofagen uit de Georgische Intestiphage-ampullen zijn verrijkt door ze te oogsten uit plaques met dezelfde morfologie met behulp van een steriele houten prikker. Deze prikker wordt vervolgens gestoken in een verse voedingsbodem met topagar geënt met een bacteriestam, om daarna de bacteriofagen over de hele plaat te verdelen met een geautoclaveerd papieren stripje. De geogste bacteriofagen worden opgelost en gestabiliseerd door een overnacht incubatiestap in een buffer bij 4° Celsius. Daarna wordt de inhoud vermengd met chloroform, gecentrifugeerd, gefilterd door een 0,22 micrometer filter om alle bacterieresten te verwijderen, en ingevroren tot verder gebruik.

Beschouwing

Bacteriofagen kunnen een aanvulling zijn in het therapeutisch arsenaal tegen bacteriële infecties, met als voordeel dat het microbioom van de gastheer niet wordt aangetast; maar kunnen bacteriofagen het antimicrobiële resistentieprobleem oplossen? Ook bij gebruik van bacteriofagen treedt resistentie op. Bacteriën kunnen zich op verschillende manieren ongevoeligheid ontwikkelen tegen bacteriofagen door hun oppervlak aan te passen, door hun extracellulaire matrix te gaan verdikken of door een eiwit aan te maken dat genetisch materiaal van de faag weert als dat door de celwand wordt geïnjecteerd. Om resistentievorming tegen te gaan dient men therapeutisch een cocktail aan bacteriofagen te gebruiken. Hopelijk zijn de praktische en juridische uitdagingen rondom bereiding en toediening van bacteriofagen op korte termijn overwonnen. Het spreekt voor zich dat een toe te dienen bacteriofaagoplossing vrij moet zijn van lipopolysachariden en andere contaminanten. Het geven van bacteriofagen waar mogelijk in combinatie met antibiotica kan veelbelovend zijn in de behandeling van chronische infecties, en onderzoek naar de werking van geïndividualiseerde fagentherapie verdient dan ook alle aandacht en financiële steun. Het onderwerp 'diagnostiek en behandeling met bacteriofagen' mogen wij als microbiologen absoluut niet laten liggen!

Met dank aan Mike Mientjes, Stan Brouns en Jakko van Ingen voor het mogelijk maken van dit werk.

Referenties

1. El Haddad L, Harb CP, Gebara MA, Stibich MA, Chemaly RF. A systematic and critical review of bacteriophage therapy against multidrug-resistant ESKAPE organisms in humans. *Clin Infect Dis.* 2019;69:167-78.
2. Kuipers S, Ruth MM, Mientjes M, de Sévaux RGL, van Ingen J. A Dutch case report of successful treatment of chronic relapsing urinary tract infection with bacteriophages in a renal transplant patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;64(1):e01281-19.
3. Aslam S. Bacteriophage therapy as a treatment option for transplant infections. *Curr Opin Infect Dis.* 2020;33:298-303.
4. Leitner L, Ujmajuridze A, Chanishvili N, et al. Intravesical bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomised placebo-controlled, double-blind clinical trial. *Lancet Inf Dis* 2020;16:S1473-3099(20)30330-3.
5. Jurczak-Kurek A, Gaşior T, Nejman-Faleńczyk B, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep.* 2016;6:34338.

Influenzaseizoen 2019/2020 in Nederland

Een milde korte influenza A-epidemie

Ron Fouchier, Adam Meijer, Mariëtte Hooiveld, Rianne van Gageldonk-Lafeber, Marit de Lange, Marion Koopmans

Samenvatting

De influenza-epidemie van het seizoen 2019/2020 was mild en duurde kort, van week 5 tot en met week 7 en in week 10 en 11 van 2020. De toename van het aantal personen met een influenza-achtig ziektebeeld per 10.000 inwoners, zoals gerapporteerd door huisartsen, vanaf week 10 overlapte met de eerste weken van de COVID-19-pandemie in Nederland en ging gepaard met een snelle afname van influenzavirusdetecties. De pieken in de incidentie van influenza-achtige ziektebeelden per 10.000 inwoners lagen in deze twee periodes op respectievelijk 7,2 in week 5 en 11,5 in week 11. Net als in het seizoen 2018/2019 werden influenza A(H1N1)pdm09- en A(H3N2)-virussen ongeveer even vaak gedetecteerd en circuleerde er weinig influenzavirus type B, hoofdzakelijk van de B/Victoria-lijn. Ongeveer 67 procent van de circulerende A(H3N2)-virussen behoorde tot clade 3C.3a, waartoe ook de vaccinstam voor 2019/2020 behoorde. De overige A(H3N2)-virussen behoorden tot varianten binnen clade 3C.2a1b die antigeen verschillend waren van de vaccinstam. De A(H1N1)pdm09-virussen behoorden genetisch vrijwel allemaal tot clade 6b.1A5, met goede antigenegelijkheid met de vaccinstam in tests met frettensera. Een kleine groep A(H1N1)pdm09-virussen vertoonde antigenegelijkheid. De B/Victoria-virussen behoorden allemaal tot clade 1A met een deletie van drie aminozuren in hemagglutinine. De voorlopige analyse van de vaccineffectiviteit tegen laboratoriumbevestigde influenzavirusinfectie in Europa was ongeveer 48 procent. Onder de virussen die onderzocht zijn op gevoeligheid voor neuraminidaseremmers en Baloxavir marboxil werd geen resistentie waargenomen.

Voor het influenzaseizoen 2020/2021 heeft de

Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) voor het noordelijk halfrond de volgende vaccinsamenstelling aanbevolen:

- Voor A(H1N1)pdm09 een A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019-achtig virus;
- Voor A(H3N2) een A/Hong Kong/2671/2019-achtig virus;
- Voor de B/Victoria-lijn een B/Washington/2/2019-achtig virus;
- Voor de B/Yamagata-lijn een B/Phuket/3073/2013-achtig virus.

Abstract

The influenza epidemic of 2019/2020 started in week 5 of 2020, was relatively mild and lasted only 5 weeks. The epidemic reached peak incidence in weeks 5 and 11 with 7,2 and 11,5 persons presenting with influenza-like illness (ILI) per 10.000 inhabitants respectively and incidence dropping below the epidemic threshold in weeks 8 and 9. The second part of the epidemic overlapped with the start of the COVID-19 pandemic in The Netherlands, when influenza virus detections decreased rapidly. Influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2)-viruses were detected at approximately equivalent frequencies with only sporadic detection of influenza B viruses. Approximately 67

Erasmus MC, afdeling Viroscience, Nationaal Influenza Centrum, Rotterdam, prof. dr. R.A.M. Fouchier, prof. dr. M.P.G. Koopmans, virologen. Nivel Zorgregistraties eerste lijnpeilstations, Utrecht, dr. M. Hooiveld, senior onderzoeker. RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Nationaal Influenza Centrum, Bilthoven, dr. A. Meijer, viroloog, dr. A.B. van Gageldonk-Lafeber, epidemioloog, dr. M.M.A. de Lange, epidemioloog. Correspondentieadres: prof. dr. R.A.M. Fouchier (r.fouchier@erasmusmc.nl)

percent of the circulating A(H3N2)-viruses belonged to clade 3C.3a, like the vaccine. The remaining A(H3N2)-viruses belonged to clade 3C.2a1b with antigenic diversity within this group. Most A(H1N1)pdm09-viruses belonged to clade 6b.1A5 and reacted well with ferret antisera raised against the vaccine strain but a subgroup of antigenically distinct viruses emerged. Almost all influenza B viruses were of the B/Victoria lineage, clade 1A, with a deletion of 3 amino acids in hemagglutinin. Interim results estimated a 48 percent vaccine effectiveness in Europe. There was no evidence for resistance against neuraminidase inhibitors and Baloxavir marboxil in the investigated influenza viruses.

Griep

Iedere winter kunnen influenzavirussen van het type A, B of C bij mensen griep veroorzaken.[1] Influenzavirussen van het type A en influenzavirussen van het type B zijn afwisselend verantwoordelijk voor de grootste ziektebelasting tijdens deze influenza-epidemieën, waarbij de impact van type C-virussen relatief beperkt is. De influenzavirussen van type A behoren tot de subtypen A(H1N1)pdm09 en A(H3N2), terwijl het voor de influenzavirussen van type B antigenen varianten betreft die als Yamagata-lijn en Victoria-lijn worden aangeduid.[2] Mensen van 60 jaar en ouder en patiënten met een medische indicatie worden in het kader van het Nationaal Programma Grieppreventie jaarlijks in oktober en november door de huisarts uitgenodigd om een grieprik te halen. In Nederland wordt hiervoor sinds 2019/2020 een quadrivalent griepvaccin aangeboden. Dit vaccin bevat steeds de meest recente door de WHO aanbevolen componenten voor A(H1N1)pdm09, A(H3N2), B/Yamagata en B/Victoria.[3,4] De vaccinsamenstelling wordt twee keer per jaar opnieuw bekeken, respectievelijk voor het noordelijk en zuidelijk halfrond, op grond van epidemiologische en virologische gegevens die verzameld worden binnen een door de WHO gecoördineerd internationaal surveillancenetwerk. Nadat de nieuwe aanbeveling van de vaccinsamenstelling is vrijgegeven hebben vaccinproducenten ongeveer een half jaar de tijd om een nieuw vaccin voor het eerstvolgende seizoen te produceren en distribueren.[5]

Influenzasurveillance

Een goede overeenkomst tussen de antigenen eigenschappen van de circulerende influenzavirussen van het seizoen en de componenten in het vaccin zijn belangrijk voor een goed werkend griepvaccin. Om deze 'matching' optimaal te houden worden antigenen veranderingen in de circulerende influenzavirussen continu in kaart gebracht binnen het door de WHO gecoördineerde Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).[6]

Het Nationaal Influenza Centrum rapporteert namens Nederland wekelijks de gegevens over de Nederlandse epidemie aan de WHO via het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Om de Nederlandse data te integreren met die van elders in Europa en in de wereld wordt een selectie van de in Nederland verzamelde en gekarakteriseerde influenzavirussen opgestuurd naar het WHO Collaborating Centre in London.

Het Nivel (Nederlands instituut voor onderzoek van de gezondheidszorg) registreert wekelijks het aantal patiënten dat zich met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) meldt bij de huisarts en vraagt de huisartsen om een deel van deze patiënten te bemonsteren. De influenzavirussen verkregen uit luchtwegmonsters van een groot aantal huisarts- en ziekenhuispatiënten met IAZ en van patiënten met andere acute respiratoire infecties (ARI) worden door RIVM en Erasmus MC binnen het Nationaal Influenza Centrum gekarakteriseerd. Hiertoe worden de genetische en antigenen eigenschappen van de virussen bepaald en de gevoeligheid voor antivirale medicijnen vastgesteld. In het verleden werd voor een representatieve subset van de fenotypisch gekarakteriseerde virussen de genetische eigenschappen bepaald. Sinds het seizoen 2018/2019 wordt deze volgorde steeds vaker omgedraaid waarbij aan de hand van de genetische karakterisering met moderne sequentietechnieken een fenotype kan worden voorspeld, dat vervolgens experimenteel wordt bevestigd voor een representatieve set monsters waaruit virus is geïsoleerd.

Resultaten en discussie

De influenza-epidemie van het seizoen 2019/2020

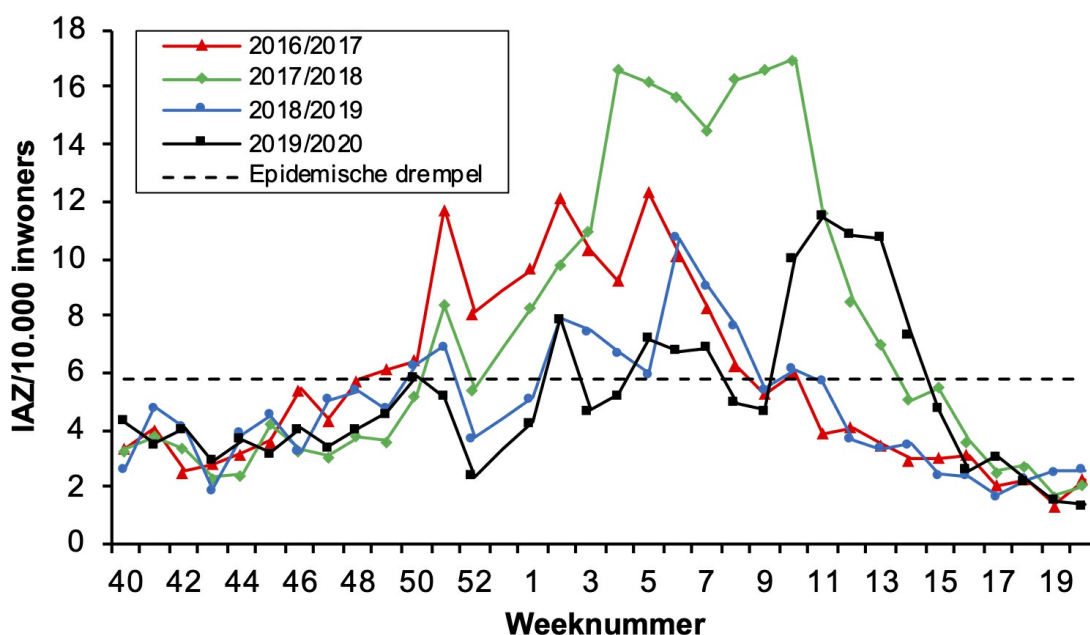
De influenza-epidemie van 2019/2020 duurde in totaal vijf weken, van week 5 tot en met week 7 en in weken 10 en 11 van 2020 (zie *figuur 1*). In Nederland spraken we in het seizoen 2019/2020 van een epidemie wanneer in twee opeenvolgende weken meer dan 5,8 op de 10.000 mensen zich bij hun huisarts meldden met IAZ en tegelijkertijd in de neus- en keelmonsters van een substantieel deel van deze patiënten influenzavirus werd aangetoond.[7] Het eerste deel van de epidemie van week 5 tot en met 7 voldeed volledig aan deze norm. Van week 10 tot 14 was de IAZ-incidentie ook boven de norm van 5,8 op de 10.000 mensen, maar werd er vanaf week 12 nauwelijks nog influenzavirus aangetoond, waardoor er toen van een influenza-epidemie geen sprake meer kon zijn. De verhoogde IAZ-incidentie in deze tweede periode viel samen met de aanvang van de COVID-19-pandemie in Nederland, waarbij in weken 10 en 11 de eerste aanbevelingen werden gedaan om de verspreiding te beperken. De influenza-epidemie van 2019/2020 duurde daarmee veel korter dan de epidemie van het jaar daarvoor (14 weken) en korter dan het gemiddelde van 10 weken van de laatste 25 jaar.[8,9]

In het winterseizoen van 2019/2020 hadden relatief weinig mensen een IAZ (zie *figuur 1*). De pieken in de incidentie van influenza-achtige ziektebeelden per 10.000 inwoners lagen in de twee periodes van de influenza-epidemie op respectievelijk 7,2 in week 5 en 11,5 in week 11 (zie *figuur 1*). Al met al was er sprake van een relatief milde en kortdurende influenza-epidemie in Nederland.

Overzicht van de onderzochte influenzavirussen

De influenza-epidemie van 2019/2020 werd gedomineerd door influenzavirussen van type A, waarbij A(H3N2) en A(H1N1)pdm09-virussen net als vorig seizoen ongeveer even vaak werden gedetecteerd in de peilstations en de ziekenhuizen (zie *tabel 1*). Net als vorig jaar was de prevalentie van influenzavirus type B opvallend laag. In de 203 volledig gekarakteriseerde influenzavirus-positieve monsters afgenomen door peilstationhuisartsen bij IAZ-patiënten werd 101 keer (50 procent) een A(H3N2)-virus gevonden, 86 keer (42 procent) een A(H1N1)pdm09-virus, 15 keer (7,5 procent) een influenzavirus type B van de Victoria-lijn en 1 keer (0,5 procent) een influenzavirus type B van de Yamagata-lijn. In de 48 van ARI-patiënten afgenomen influenzavirus-positieve monsters werd 32 keer (67 procent) een A(H3N2)-virus gevonden, 11 keer (23 procent) een A(H1N1)pdm09-virus en 5 keer (10 procent) een influenzavirus type B van de Victoria-lijn (zie

Figuur 1. Klinische influenza-activiteit in Nederland in de seizoenen 2016/2017 tot en met 2019/2020, weergegeven als het wekelijkse aantal patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld per 10.000 inwoners, aangemeld bij de huisartsenpeilstations van week 40 tot en met week 20 van het volgende jaar. Bron: Nivel Zorgregistraties eerste lijn.



Tabel 1. Detectie van influenzavirussen in luchtwegmonsters van patiënten met influenza-achtig ziektebeeld en andere acute respiratoire infecties die ingestuurd werden vanuit de huisartsen peilstations en vanuit diagnostische laboratoria van ziekenhuizen van week 40 van 2019 tot en met week 20 van 2020.

Bron van Virusdetecties [§]	Aantallen influenzavirus detecties (%)*					
	Type A			Type B		
	H3N2	H1N1pdm09	Anders [#]	Victoria	Yamagata	Anders [#]
IAZ patiënten	101 (50%)	86 (42%)	3	15 (7%)	1 (<1%)	0
ARI patiënten	32 (67%)	11 (23%)	0	5 (10%)	0 (0%)	0
Ziekenhuizen	185 (47%)	201 (51%)	361	8 (2%)	0 (0%)	10

* Percentage van het aantal volledig getypeerde influenzavirussen per bron.

§ Monsters van patiënten met IAZ en ARI werden ingestuurd vanuit Nivel-peilstations naar RIVM, monsters van ziekenhuizen werden ingestuurd door diagnostische laboratoria naar Erasmus MC waarbij dit laatste aantal werd gemaximeerd op vijf per ziekenhuis per week.

Te weten diverse niet nader getypeerde virussen uit de Nivel-peilstations en ziekenhuizen, ofwel door technische limitatie (bijvoorbeeld hoeveelheid virus in monster) ofwel logistiek (overschrijding aantal inzendingen per ziekenhuis).

tabel 1 en figuur 2). Van de 765 door diagnostische ziekenhuislaboratoria aangemelde influenzavirussen waren er 747 (98 procent) van het A-type en 18 (2 procent) van het B-type. Van de verder gekarakteriseerde A virussen waren er 201 (51 procent) van het A(H1N1)pdm09 subtype en 185 (47 procent) van het A(H3N2) subtype. Van de verder gekarakteriseerde B virussen behoorden er 8 tot de Victoria-lijn (zie tabel 1 en figuur 3).

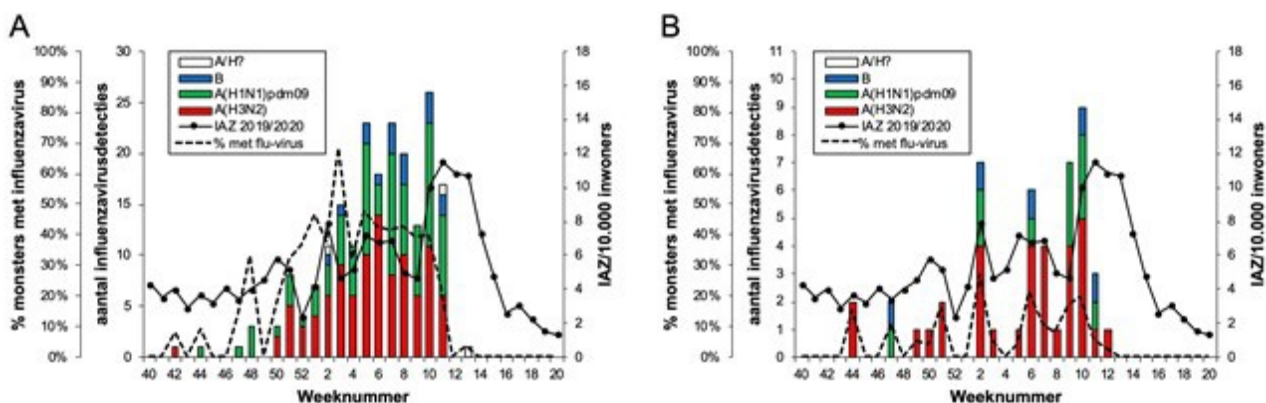
Karakterisering van influenza A(H1N1)pdm09-virussen

Alle A(H1N1)pdm09-virussen van dit seizoen die werden onderzocht, behoorden genetisch tot

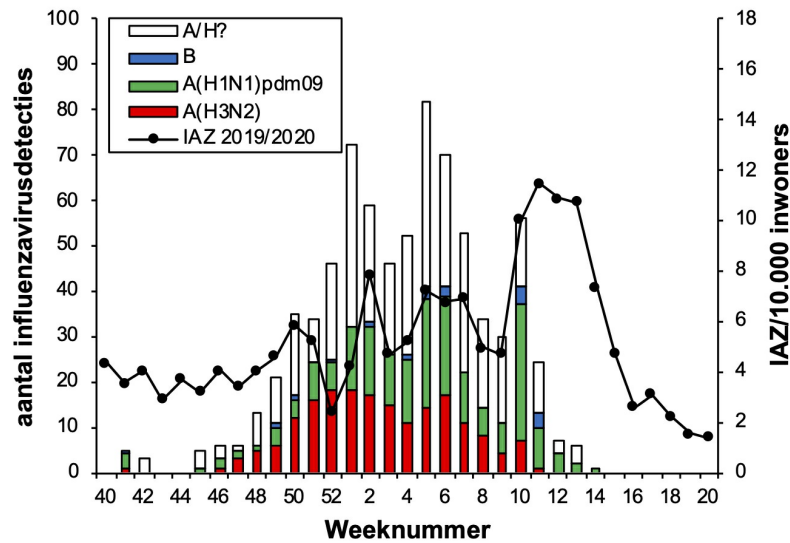
clade 6B.1A, met additionele genetische verschillen tussen de virussen onderling (zie figuur 4a). De grootste groep virussen behoorde tot clade 6B.1A5A met aminozuursubstitutie 187V/A net als A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019, de vaccinstam voor het seizoen 2020/2021.[10] Een tweede grote groep virussen behoorde tot dezelfde clade 6B.1A5A maar met de aminozuursubstitutie 156K net zoals A/Victoria/2570/2019, de vaccinstam voor 2021 voor het zuidelijk halfrond.[11] Verder werden er diverse clade 6B.1A5A-virussen zonder bijzondere aminozuursubstituties gevonden en sporadisch ook virussen van clade 6B.1A5B en 6B.1A7.

Sinds de pandemie van 2009 hebben de

Figuur 2. Virusdetecties in het influenzaseizoen 2018/2020 in de door peilstations afgenomen monsters van patiënten gediagnostiseerd met een IAZ (A) of een andere acute respiratoire infectie (ARI) (B). Afgebeeld zijn de wekelijkse aantallen detecties van influenzavirus, opgesplitst naar (sub)type. De aantallen zijn weergegeven als balken en als percentage van de monsters waarin een influenzavirus werd aangetroffen (stippellijn), af te lezen op de linker verticale as. Ook het aantal IAZ per 10.000 inwoners per week is weergegeven, af te lezen op de rechter verticale as.



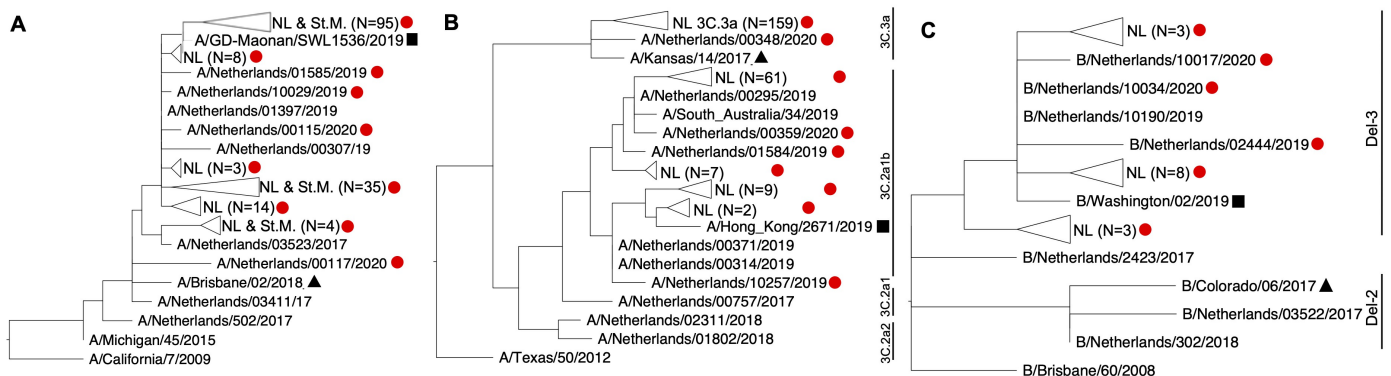
Figuur 3. Virusdetecties in het influenzaseizoen 2019/2020 in monsters ingestuurd vanuit diagnostische ziekenhuislaboratoria. Afgebeeld zijn de wekelijkse aantallen detecties van influenzavirus, opgesplitst naar (sub)type. De aantallen zijn weergegeven als balken, af te lezen op de linker verticale as. Ook het aantal IAZ per 10.000 inwoners per week is weergegeven, af te lezen op de rechter verticale as. Het relatief grote aantal niet gekarakteriseerde influenzavirussen type A ('A/H?') komt door maximering van het aantal inzendingen per ziekenhuis dat in aanmerking kwam voor next-generation sequencing.



A(H1N1)pdm09-virussen nog weinig antigene variatie laten zien in de hemagglutinatieremmingstest (HAR) met frettensera (minder dan een factor 4 verschil in titers gemeten met sera tegen verschillende A(H1N1)pdm09-stammen). Nagenoeg

alle Nederlandse A(H1N1)pdm09-virussen van het afgelopen seizoen vertoonden goede antigene overeenkomst met frettensera opgewekt tegen de 2019/2020-vaccincomponent A/Brisbane/2/2018 in de HAR-test (zie tabel 2). Ook

Figuur 4. Fylogenetische analyse van de influenzavirussen die circuleerden in Nederland in het seizoen 2019/2020. De fylogenetische bomen voor (A) influenzavirus A(H1N1)pdm09, (B) influenzavirus A(H3N2) en (C) influenza B-virus van de Victoria-lijn zijn berekend met de hemagglutinine aminozuursequenties zonder signaalpeptide en stopcodon. Er zijn geen sequenties verkregen voor influenza B-virus van de Yamagata-lijn. De bomen zijn gemaakt met Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA X) versie 10.0.5, waarin de Maximum Likelihood-methode is gebruikt met als substituatiemodel "JTT Gamma Distributed with Invariant model". De bomen zijn gevisualiseerd met FigTree 1.4.3 en geëxporteerd in pdf format. In de figuur zijn grote groepen Nederlandse virussen uit het 2019/2020 seizoen geclusterd ('collapsed') weergegeven als grote witte driehoeken met vernoeming van het aantal taxa in de tak, waarbij de lengte van de driehoek een maat is voor de diversiteit binnen het cluster. Zwarte driehoekjes en vierkantjes markeren respectievelijk de vaccinstammen van 2019/2020 en 2020/2021. Rode stippen markeren taxa uit het 2019/2020 seizoen. In (B) zijn aan de rechterkant diverse clades weergegeven en in (C) het aantal deleties in hemagglutinine waaraan in de tekst wordt gerefereerd.



Tabel 2. Antigene karakterisering van Nederlandse influenza A(H1N1)pdm09-virussen uit het seizoen 2019/2020.

Virus	Seizoen	Clade	HAR titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met						
			IVR180	Brisbane	IVR190	NL/3411/17	NL/2307/18	NL/307/19	NL/121/20
A/Michigan/45/15 [§]			5120	10240	10240	10240	10240	5120	80
IVR-180 [#]			<u>5120</u>	5120	5120	5120	10240	5120	160
A/Brisbane/2/18 [§]			10240	<u>15360</u>	10240	10240	20480	7680	160
IVR-190 ^{&}			10240	15360	<u>15360</u>	5120	15360	10240	160
A/NL/3411/17	2017/18		20480	20480	15360	<u>5120</u>	15360	5120	320
A/NL/2307/18	2018/19		20480	20480	20480	20480	<u>20480</u>	20480	480
A/NL/307/19	2018/19		20480	20480	10240	7680	20480	<u>10240</u>	640
A/NL-StM/233/20	2019/20	6B.1A5B	30720	30720	30720	30720	30720	30720	2560
A/NL/1659/19	2019/20	6B.1A5A	15360	20480	10240	10240	30720	20480	320
A/NL/1673/19	2019/20	6B.1A5A	10240	7680	10240	5120	15360	10240	320
A/NL/10258/19	2019/20	6B.1A5A	20480	30720	20480	20480	30720	15360	640
A/NL/1619/19	2019/20	6B.1A5A187	10240	15360	10240	15360	20480	10240	320
A/NL/1725/19	2019/20	6B.1A5A187	20480	20480	15360	15360	20480	20480	640
A/NL/10263/19	2019/20	6B.1A5A187	20480	20480	20480	30720	30720	20480	640
A/NL/48/20	2019/20	6B.1A5A187	15360	20480	10240	20480	30720	5120	320
A/NL/238/20	2019/20	6B.1A5A187	10240	10240	10240	10240	20480	10240	240
A/NL/121/20	2019/20	6B.1A5A156	1280	1280	640	1920	1280	1280	<u>20480</u>

* Weergegeven zijn de titers van frettersera opgewekt tegen vaccinreferentiestammen en representatieve Nederlandse virusisolaten, bepaald in een HAR met erythrocyten van kalkoenen. Alle Nederlandse virusstammen werden gekweekt in hCK-cellen. Vaccinreferentiestammen worden geïsoleerd in eieren. De virusnaam is als volgt opgebouwd: type/locatie/stamnummer/jaar van isolatie. De titer in de HAR is de omgekeerde waarde van de hoogste verdunning van het antiserum die de hemagglutinatie van erythrocyten door een standaarddosis van het influenzavirus nog volledig remt. Homologe titers zijn vetgedrukt onderlijnd weergegeven. Verschillen tussen titers uit verschillende kolommen zijn niet informatief. Binnen een kolom zijn de titers wel vergelijkbaar, waarbij titerverschillen van ten minste een factor vier als significant voor antigene diversiteit worden beschouwd.

§ A/Michigan/45/2015 was de WHO A(H1N1)pdm09 vaccinreferentiestam voor 2017/2018 en 2018/2019.

IVR-180 is een reassortant vaccinstam van A/Singapore/GP1908/15, nauw verwant aan A/Michigan/45/2015.

§ A/Brisbane/2/2018 is de WHO A(H1N1)pdm09 vaccinreferentiestam voor 2019/2020.

& IVR-190 is een reassortant vaccinstam van A/Brisbane/2/2018.

reageerden deze Nederlandse A(H1N1)pdm09-virussen goed met frettersera opgewekt tegen de Nederlandse prototypevirussen van de afgelopen seizoenen. Echter, voor het eerst werd nu in de HAR een antigeenafwijkend patroon gezien voor (H1N1)pdm09, namelijk met een virus van clade 6B.1A5A met aminozuursubstitutie 156K (A/Nederland/121/2020). A/Victoria/2570/2019, de vaccincomponent voor het zuidelijk halfrond, heeft dezelfde 156K-substitutie. Voor het noordelijk halfrond heeft de WHO een A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019-achtig virus aanbevolen dat tot dezelfde clade behoort als de grootste groep virussen uit Nederland, clade 6B.1A5A met substitutie 187A/V. Deze update ten opzichte van A/Brisbane/2/2018 is gebaseerd op HAR-data met een set humane sera uitgevoerd door de WHO Collaborating Centres, waarmee kleine antigenen verschillen werden waargenomen ten

opzichte van A/Brisbane/2/18 die met frettersera niet zijn waar te nemen.[10,11]

Karakterisering van influenza A(H3N2)-virussen

Genetische analyse van het hemagglutinine gen van de in Nederland circulerende A(H3N2)-virussen toonde net als voorgaande jaren forse genetische diversiteit aan (zie figuur 4b). Ongeveer 67 procent van de in Nederland gekarakteriseerde A(H3N2)-virussen behoorden tot clade 3C.3a, zodat de vaccinkeuze voor A/Kansas/14/2017 (clade 3C.3a) voor Nederland goed heeft uitgepakt. De overige gekarakteriseerde virussen behoorden tot clade 3C.2a1b, met diverse additionele aminozuursubstituties in hemagglutinine. In Nederland kwamen clade 3C.2a1b-virussen met T131K ongeveer zes keer zo vaak voor als virussen met T135K. Door de wereldwijde toename in circulatie van clade

Tabel 3. Antigene karakterisering van Nederlandse influenza A(H3N2)-virussen uit het seizoen 2019/2020.

Virus	Clade	VN titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met				
		X-327 [§] NL/384/19	IVR-197 [#] NL/314/19	NL/122/20		
X-327 [§]	3C.3a	<u>1280</u>	80	40	<20	<20
NL/384/19	3C.3a	<20	<u>1280</u>	<20	<20	<20
NL/1671/19	3C.3a	<20	40	<20	<20	<20
NL/1672/19	3C.3a	40	80	<20	<20	<20
NL/10267/19	3C.3a	<20	80	<20	<20	<20
IVR-197 [#]	3C.2a1b+T131K	<20	<20	<u>80</u>	<20	20
NL/54/20	3C.2a1b+T131K	<20	<20	40	80	40
NL/10259/19	3C.2a1b+T131K	<20	<20	40	80	80
NL/122/20	3C.2a1b+T131K	<20	<20	40	40	<u>40</u>
NL/314/19	3C.2a1b T135K	<20	<20	<20	<u>640</u>	40
NL/16/20	3C.2a1b+T135K	<20	<20	<20	40	<20
NL/10257/19	3C.2a1b+T135K	<20	<20	<20	80	40

* Weergegeven zijn de titers van frettensera opgewekt tegen vaccinreferentiestammen en representatieve Nederlandse virusisolaten, bepaald in een VN test. De titer in de VN is de omgekeerde waarde van de hoogste verdunning van het frettensera in de betreffende kolom die een standaarddosis virus nog voor 90 procent kan neutraliseren. De VN-assay werd uitgevoerd zoals recent beschreven.[14,15]

[§] X-327 is een reassortant vaccinstam van A/Kansas/14/2017, de vaccinreferentiestam voor A(H3N2) voor 2019/2020.

[#] IVR-197 is een reassortant vaccinstam van A/South Australia/34/2019, een referentiestam voor clade 3C.2a1b met T131K. Voor het seizoen 2020/2021 werd een component met de T135K-substitutie aanbevolen, een A/Hong Kong/2671/2019-achtig virus.

3C.2a1b-virussen met T135K is besloten om een A/Hong Kong/2671/2019-achtig virus met deze substitutie aan te bevelen voor het 2020/2021-vaccin voor het noordelijk halfrond.[10]

Het maken van een gedegen keuze voor de A(H3N2)-vaccincomponent is momenteel niet alleen lastig door de genetische diversiteit maar ook omdat een groot deel van de virussen niet of nauwelijks in staat is rode bloedcellen te agglutineren of hoofdzakelijk via neuraminidase.[12,13] Hierdoor is de HAR-test voor de karakterisering van hemagglutinine niet betrouwbaar en is een alternatieve virusneutralisatie (VN)-test ontwikkeld, die helaas minder reproduceerbaar en meer bewerkelijk is.[13-15] Daarnaast zijn de gekozen vaccinstammen vaak genetisch instabiel gebleken in eieren, waardoor deze de laatste jaren vaak antigenen verschillen lieten zien ten opzichte van de epidemische stammen die niet in eieren zijn gekweekt. De antigenen eigenschappen van A(H3N2)-virussen van 2019/2020 waren heterogeen, net als vorig seizoen (zie tabel 3). Frettensera opgewekt tegen de A/Kansas/14/2017-vaccinstam X-327 en A/Nederland/384/2019 van vorig seizoen uit clade 3C.3a lieten lage titers zien tegen A(H3N2)-virussen van clade 3C.3a uit

het seizoen 2019/2020. Hoewel de keuze voor een clade 3C.3a-vaccinstam op zich de juiste was voor Nederland, was de antigenen matching met de epidemische 3C.3a-stammen waarschijnlijk suboptimaal. De antisera tegen de clade 3C.3a-virussen reageerden, zoals verwacht mocht worden, niet met virussen van clade 3C.2a1b. Binnen de clade 3C.2a1b-virussen was enige antigenen heterogeniteit zichtbaar, die deels samenhangt met substituties T131K en T135K in HA. De frettensera opgewekt tegen deze clade 3C.2a1b-virussen gaven helaas te lage titers om overtuigend verschillen aan te tonen. Serum opgewekt tegen de referentiestam IVR-197 gaf geen meetbare titers tegen clade 3C.2a1b-stammen met T135K zoals ook binnen het WHO-netwerk werd gemeld en waardoor besloten is het vaccin aan te passen met een stam met de T135K-substitutie, een A/Hong Kong/2671/2019-achtig virus.[10]

Karakterisering van influenza B-virussen

In seizoen 2019/2020 werd in Nederland slechts één influenzavirus type B van de Yamagata-lijn gedetecteerd maar deze kon door de lage hoeveelheid virus in het monster niet verder worden gekarakteriseerd. Wereldwijd werden geen

Tabel 4. Antigene karakterisering van Nederlandse influenza B virussen van de Victoria-lijn uit het seizoen 2019/2020.

Virus	HAR titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met			
	B/Colorado/6/17	BX-69A	B/NL/302/18	B/Washington/2/19
B/Colorado/6/17 [§]	320	2560	5120	5120
BX-69A [#]	240	1280	640	1280
B/NL/302/18	640	320	320	160
B/Washington/2/19 [§]	80	640	1280	2560
B/NL/1716/19	160	160	320	640
B/NL/2444/19	40	<30	40	320

* Zie tabel 2.

[§] B/Colorado/6/17 is een WHO B/Victoria-lijnreferentiestam voor 2019/2020.

[#] BX-69A is een reassortant van B/Maryland/15/16, de vaccinstam van de B/Victoria-lijn voor 2019/2020.

[§] B/Washington/2/19 is de aanbevolen vaccinstam van de B/Victoria-lijn voor 2020/2021.

substantiële antigenen veranderingen waargenomen in B/Yamagata-virussen, waardoor de vaccinkeuze voor een B/Phuket/3073/2013-achtig virus niet werd gewijzigd ten opzichte van vorig seizoen.[10]

Alle in het seizoen 2019/2020 gekarakteriseerde influenzavirussen type B van de Victoria-lijn behoorden tot clade 1A, met een deletie van drie aminozuren in hemagglutinine. De vaccincomponent en de referentiestam voor het seizoen 2019/2020 behoorden tot dezelfde clade, maar hebben een deletie van twee aminozuren in hemagglutinine. De nieuwe vaccinkeuze voor het noordelijk halfrond voor 2020/2021 is een B/Washington/2/2019-achtig virus, dat een deletie heeft van drie aminozuren en genetisch nauw verwant is aan de Nederlandse virussen van 2019/2020 (zie figuur 4c).[10]

Zoals verwacht op basis van de aminozuuredeleties in hemagglutinine reageerden de frettensera opgewekt tegen de referentiestam B/Colorado/6/2017, en de vaccinstam B/Maryland/15/2016 suboptimaal met de Nederlandse virussen uit 2019/2020 met een deletie van drie aminozuren. Omdat dit wereldwijd werd waargenomen is besloten de B/Victoria-vaccinstam aan te passen voor het seizoen 2020/2021 voor het noordelijk halfrond naar een B/Washington/2/2019-achtig virus. [10] De titers van een frettenserum opgewekt tegen B/Washington/2/2019 waren hoger dan de titers van een serum opgewekt tegen de oude vaccinstam. Er is echter ook enige diversiteit zichtbaar tussen de B/Victoria-virussen met een deletie van drie aminozuren onderling.

Vaccineffectiviteit

Uit de interim-resultaten aan het einde van het griepseizoen van de Europese I-MOVE-studie waaraan Nederland deelneemt, werd een influenzavaccineffectiviteit van 48 procent gemeten tegen alle influenzavirussen. De effectiviteit was 45 procent tegen A(H1N1)pdm09-virussen, 49 procent tegen A(H3N2)-virussen en 57 procent tegen influenzavirussen van type B. De vaccineffectiviteit was het laagst bij personen ouder dan 65 jaar.

Vaccinsamenstelling voor het seizoen 2020/2021

Op 28 februari 2020 adviseerde de WHO voor het noordelijk halfrond over de samenstelling van het influenzavaccin voor 2020/2021. De enige component die niet werd aangepast is die voor de B/Yamagata-lijn. De geadviseerde samenstelling is:[9]

- A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09-achtig virus;
- A/Hong Kong/2671/2019 (H3N2)-achtig virus;
- B/Washington/02/2019-achtig virus, van de Victoria-lijn;
- B/Phuket/3073/2013-achtig virus, van de Yamagata-lijn.

Gevoeligheid voor antivirale middelen

Tijdens het seizoen 2019/2020 werd voor 454 influenzavirussen de sequentie van het neuraminidasegen onderzocht op aminozuursubstituties die resistentie tegen neuraminidaseremmers kunnen veroorzaken, maar werden deze substituties niet gevonden. Ook werd er geen fenotypische

resistentie gemeten in een kleinere groep virussen. Omdat verwacht wordt dat de endonuclease-remmer Baloxavir marboxil (Xofluz[®]) binnenkort op de markt komt voor de behandeling van influenza, werd ook de sequentie van het PA-polymerasegen van 166 virussen geïnspecteerd, waarbij geen mutaties aan het licht kwamen waarvan bekend is dat ze resistentie veroorzaken. In het seizoen 2019/2020 werd niet gezocht naar resistentie tegen M2-ionkanaalblockers omdat dergelijke medicijnen nauwelijks meer worden voorgeschreven en de A(H3N2)- en A(H1N1)pdm09-influenzavirussen die de laatste jaren wereldwijd werden getest nagenoeg allemaal de S31N aminozuursubstitutie droegen die verantwoordelijk is voor resistentie.

Conclusie

De influenza-epidemie van 2019/2020 was een korte en milde epidemie die hoofzakelijk werd veroorzaakt door A(H3N2)- en A(H1N1)pdm09-virussen. Net als vorig jaar werden er nauwelijks influenza B-virussen gedetecteerd. De epidemie verliep in twee fasen, waarbij de tweede piek in IAZ-incidentie van week 10 tot 14 overlapt met de start van de COVID-19-pandemie in Nederland. Na week 11, toen de eerste aanbevelingen werden gedaan om de verspreiding van SARS-CoV-2 te beperken, werd nauwelijks nog influenzavirus gedetecteerd terwijl de frequentie van SARS-CoV-2-detecties op liep. De tweede IAZ-piek had waarschijnlijk dus meer te maken met COVID-19 dan met influenza.

De interim-resultaten van de I-MOVE-studie gaven een vaccineffectiviteit van 48 procent voor 2019/2020. Voor zowel A(H3N2) als A(H1N1)pdm09 circuleerden er in 2019/2020 meerdere genetische varianten die grote antigenische verschillen vertoonden, waardoor voor de influenzavirussen van type A de vaccinkeuze opnieuw lastig is voor het seizoen 2020/2021. Deze keuze werd nog verder bemoeilijkt doordat de vaccins die in eieren geproduceerd worden aminozuurveranderingen in hemagglutinine ondergaan en daardoor nog meer afwijken van de epidemische virussen.

Dankbetuigingen

Wij zijn de peilstationhuisartsen van Nivel Zorgregistraties eerste lijn (registratie van gevallen van IAZ en verzending van klinische monsters naar het NIC-RIVM) zeer erkentelijk voor hun bijdragen, die essentieel zijn voor de influenzasurveillance in Nederland. Zonder de bereidwilligheid van de diagnostische laboratoria om influenzavirusmonsters naar NIC-Erasmus MC te sturen, was deze surveillance evenmin mogelijk geweest.

The authors gratefully acknowledge the generous gift of influenza reference viruses and antisera from Dr. J. McCauley from the World Influenza Centre in London.

De auteurs danken verder R. van Beek, M. Pronk, P. Lexmond, M. Silva (NIC-Erasmus MC), W. van der Hoek, M. Bagheri, G. Goderski, S. van den Brink, L. Wijsman, P. Overduin, J. Sluimer, drs. D. Reukers, drs. F. Dijkstra en dr. A. Teirlinck (NIC-RIVM) en E. Wentink, M. Hooiveld, Y. Weesie, L. Verberne en J. Gravestein (Nivel) voor de uitstekende technische ondersteuning.

Referenties

1. Shaw ML, Palese P. Orthomyxoviridae. In: Knipe, DM, Howley, PM (eds). *Fields Virology*, 6th ed. (2013), Chapter 40, pp 1151-1185. Wolters Kluwer, Philadelphia.
2. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, et al. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J Virol*. 1999;73:4413-26.
3. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2019_20_north/en/.
4. Meijer A, Fouchier R, Donker GA, et al. Influenzavaccinatie in Nederland – naar het quadrivalent influenzavaccin. *Ned Tijdschr Med Microbiol*. 2019;27(3):148-155.
5. Meijer A, Timmermans J, Donker GA, et al. Elk jaar een nieuw griepvaccin. Hoe wordt de samenstelling ervan bepaald? *Tijdschr Infect*. 2017; 12:33-40.
6. Hay AJ, McCauley JW. The WHO global influenza surveillance and response system (GISRS)-A future perspective. *Influenza Other Respir Viruses*. 2018;12:551-7.
7. Hooiveld M, Donker G, Fouchier R, et al. Grenswaarde influenza-epidemie winter 2019-2020. Utrecht: Nivel, 2019. <https://www.nivel.nl/nl/nieuws/grenswaarde-influenza-epidemie-2019-2020-vastgesteld-op-58-100000-inwoners>.
8. Fouchier R, Donker G, Meijer A, et al. Influenzaseizoen 2018/2019 in Nederland, Een relatief milde epidemie met twee subtypen A-virussen. *Ned Tijdschr Med Microbiol*. 2019;27(3):198-208.
9. <https://www.nivel.nl/nl/nieuws/hoe-lang-duurt-een-influenza-epidemie>.
10. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2020-21_north/en/.
11. https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2021_south/en/.

12. Mögling R, Richard MJ, van der Vliet S, et al. Neuraminidase-mediated hemagglutination of recent human influenza A(H3N2)-viruses is determined by arginine 150 flanking the neuraminidase catalytic site. *J Gen Virol.* 2017;98:1274-81.
13. Lin YP, Gregory V, Collins P, et al. Neuraminidase receptor-binding variants of human influenza A(H3N2)-viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol.* 2010;84:6769-81.
14. Van Baalen CA, Els C, Sprong L, et al. Detection of non-hemagglutinating influenza A(H3) viruses by ELISA in quantitative influenza virus culture. *J Clin Microbiol.* 2014;52:1672-7.
15. Van Baalen CA, Jeeninga R, Penders G, et al. ViroSpot™ microneutralization assay for antigenic characterization of influenza viruses. *Vaccine.* 2017;35:46-52.

Lokale verschillen van de corona-epidemiologie in beeld met een dashboard

Eric Hazenberg, Peter Wever, Peter Schneeberger

Samenvatting

Onder tijdsdruk worden in het Jeroen Bosch Ziekenhuis en het Ziekenhuis Bernhoven de Corona Result Viewer en het Corona Dashboard ontwikkeld. Met behulp van laboratorium- en ziekenhuisdata wordt de epidemiologische informatie rondom patiënten met een positieve uitslag voor SARS-CoV-2 toegankelijk voor artsen-microbioloog, hygiëne- en infectiepreventiewerkers, aanvragers en supportteams. De systemen bieden geaggregeerde laboratoriumuitslagen en een grafische weergave van de dynamiek.

Abstract

The development of two databases is described in two Dutch hospitals situated in the epicentre of the SARS-CoV-2 pandemic. Test results are combined with epidemiological information and presented graphically in order to render insight in the hospital orientated dynamics to clinical microbiologists, support teams and applicants of the test.

Inleiding

Eind februari wordt na verontrustende berichten uit China en Noord-Italië in Nederland de eerste COVID-19-patiënt gediagnosticeerd. Om onopgemerkte SARS-CoV-2-transmissie vroegtijdig op te sporen, wordt in week 10 in het Jeroen Bosch Ziekenhuis (JBZ, Den Bosch) en in Ziekenhuis Bernhoven (BNH, Uden) naast de influenzadiagnostiek, ook COVID-19-diagnostiek ingezet bij patiënten met verdenking griep (figuur 1). Begin maart is 35 procent van de testaanvragen positief voor influenza en worden de eerste positieve monsters met het SARS-CoV-2-virus vastgesteld. Een week later blijkt dat de omgeving van Bernhoven een COVID-19-hotspot is. In de eerste week van maart testen in BNH (130 bedden, adherentie 280.000 personen) 18 van de 108

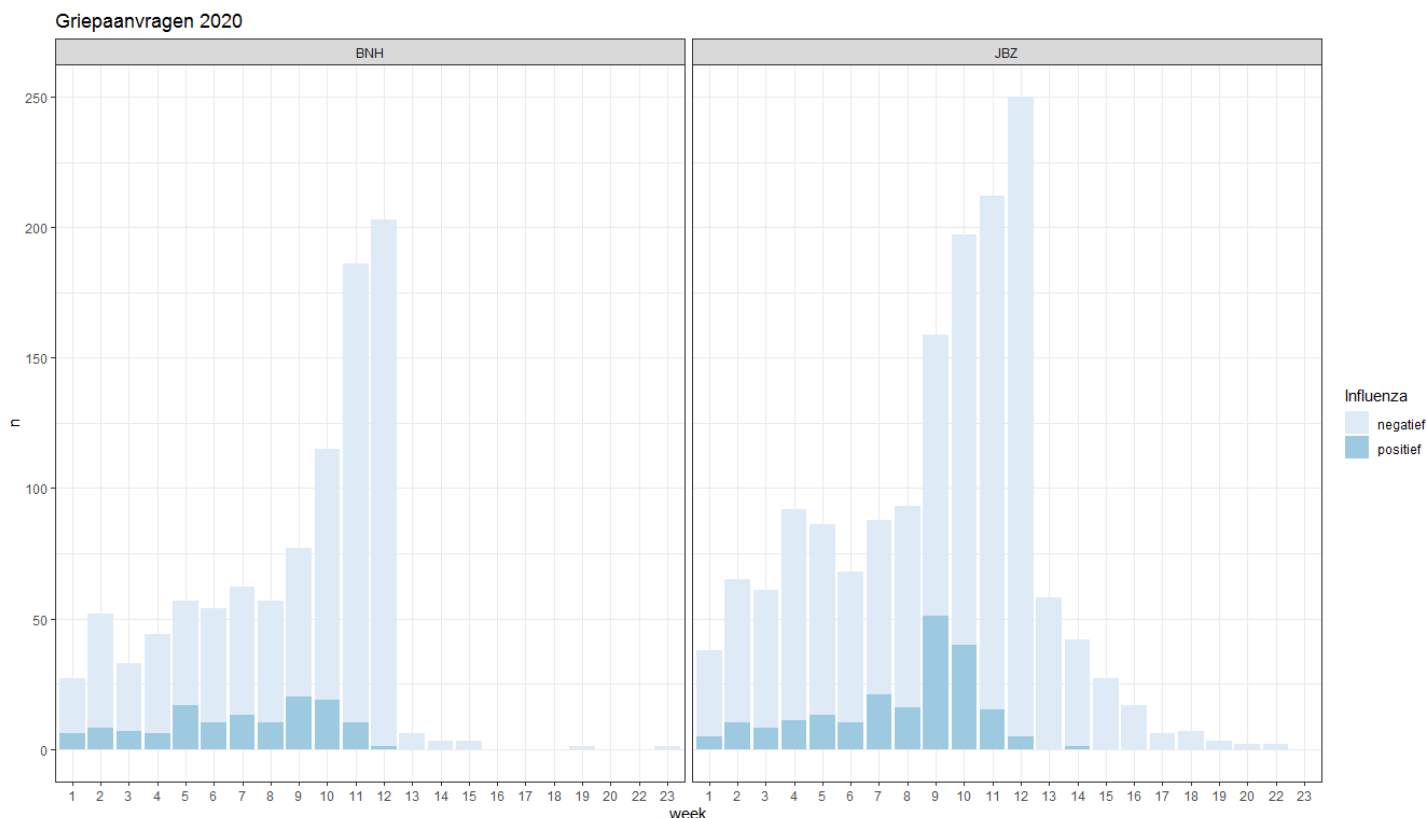
geteste patiënten positief voor SARS-CoV-2, in het naburige JBZ (600 bedden, adherentie 450.000 personen) 3 van de 184 patiënten. Om de toename van de vraag naar overzichtelijke en geaggregeerde resultaten digitaal te ondersteunen wordt een applicatie ontwikkeld. Hierna beschrijven we enkele toepassingen van deze applicatie tijdens de recente COVID-19-uitbraak in de regio's rondom Den Bosch en Uden.

Corona Result Viewer

Door de reguliere standaardrapportage komen de resultaten van een COVID-PCR in de grote vergaarbak met de andere resultaten van de betreffende patiënt, terwijl er juist een behoefte is om COVID-19-data gescheiden te analyseren. De data moeten niet op patiënt- maar op testniveau worden geaggregeerd en dienen geactualiseerd beschikbaar te zijn voor de eindgebruikers. Dat zijn de verschillende ziekenhuisorganisaties, de coronasupportteams, de ziekenhuishygiëneteam, de bedrijfsartsen en de GGD. Om dit te realiseren wordt de Corona Viewer ontwikkeld. Aanvankelijk, eind februari, is het de bedoeling de COVID-19-data op te nemen in de Influenzamonitor, die er binnen het JBZ is. De COVID-19-data kunnen op eenzelfde wijze als de RSV-data aan de Influenzamonitor worden toegevoegd, te weten met een duiding in de kantlijn. Al na enkele dagen blijkt dat een aparte monitor gemaakt moet worden. Deze Corona Result Viewer (CRV) geeft alle geaggregeerde COVID-19-PCR-

Ziekenhuis Bernhoven, Uden, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Den Bosch, afdeling Medische microbiologie,
dr. P.M. Schneeberger, arts-microbioloog,
P.C. Wever, arts-microbioloog,
E. Hazenberg, data- en Informatiemanager.
Regionaal Laboratorium Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Den Bosch.
Correspondentieadres: p.schneeberger@jbz.nl

Figuur 1. Toename griep testen bij het begin van de afname van het aantal positieve griep testen. Vanaf week 10 werden de negatieve griep testen ook ingezet op COVID-19.



gerelateerde data per dag per patiënt weer. Vanuit het laboratoriuminformatiesysteem worden ieder half uur, alle COVID-19-testen (wel en niet afgeronde testen) geëxporteerd naar het beveiligde netwerk van het JBZ. Software (R-script) transformeert de gegevens naar zinvolle informatie op patiëntniveau. Per patiënt per dag wordt één regel weergegeven in de CRV, waarbij drie uitslagen mogelijk zijn: 'negatief' indien alle testen met dezelfde afnamedatum negatief en afgerond zijn, 'positief' indien één test positief is, en 'in behandeling' als er nog niet afgeronde testen zijn én er geen afgeronde positieve test is. De relevante data worden vervolgens zichtbaar gemaakt via een HTML5-website opgeslagen in het netwerk van het JBZ, en beschikbaar gesteld voor specifieke gebruikers in en buiten het JBZ, dus ook voor BNH en de GGD. Per gebruiker/gebruikersgroep worden uitsluitend gerelateerde uitslagen aangeboden.

Privacy

De Algemene verordening gegevensbescherming (AVG) stelt dat toegang tot uitslagen van testen alleen mag worden verleend indien men een behandelrelatie met de patiënt heeft. Het Outbreak

Management Team (OMT) van het ziekenhuis heeft per decreet verordend dat dit in deze situatie geen grond heeft. In samenspraak met juridische zaken wordt een disclaimer in de CRV opgenomen die de verantwoordelijkheid voor juist gebruik bij de eindgebruiker legt. Dit is aan alle interne (JBZ) en externe gebruikers (BNH/GGD) meegedeeld. Voor externe partijen zijn ook op bestuurlijk niveau (RvB) de verantwoordelijkheden voor het gebruik afgestemd en overgedragen.

Dataveiligheid

De technische veiligheid is afgestemd met de dataveiligheidsexpert van de afdeling ICT. Omdat de CRV binnen het netwerk van het JBZ wordt opgeslagen, moet voor externe partijen toegang worden geregeld tot het JBZ-netwerk. Dit wordt gerealiseerd door op naam gestelde gebruikersaccounts aan te maken waarmee uitsluitend toegang wordt geboden aan de CRV. In deze constructie worden twee beveiligingen aangebracht, authenticatie in twee stappen en het loggen van de gebruikersnaam, zoals de standaard is voor de JBZ-accounts. Wegens tijdsgebrek wordt 'wie-ziet-wat-wanneer' niet geborgd. Daarbij zal het antwoord op het 'wat'-gedeelte in de

'wie-ziet-wat-wanneer'-vraag altijd zijn 'alles wat er in de CRV staat' en de 'wie en wanneer' zal te herleiden zijn uit het log-register van de betreffende account.

De Corona Result Viewer in de praktijk

Op 9 maart wordt de CRV in gebruik genomen, aanvankelijk door de bedrijfsartsen, korte tijd later door de Dienst hygiëne en infectiepreventie (later overgenomen door het coronasupportteam) en eind maart de GGD.

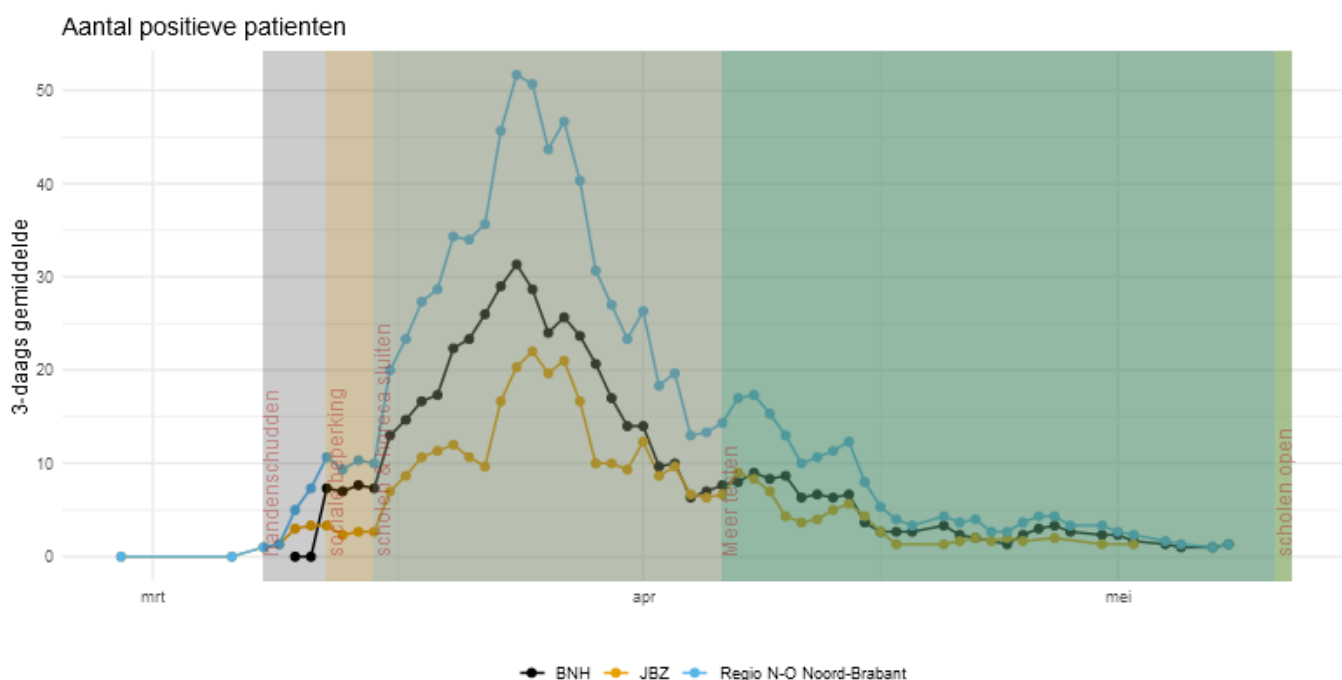
De elkaar snel opvolgende vragen om een CRV leidt vervolgens tot 'klantspecifieke' CRV's. Hierdoor kunnen heel precies de juiste patiënten, cliënten en medewerkers worden geraadpleegd. Een nadeel is dat onderhoud van de diverse CRV's en doorontwikkeling van de brondata een tijdrovende klus wordt. De optimale werkwijze op het laboratorium is begin maart nog niet gevonden, waardoor datastructuren subtiel veranderen, wat consequenties heeft voor de data. De eerste CRV's worden gevoed met klantspecifieke data. Dit blijkt al snel niet houdbaar, waarna ervoor wordt gekozen om de CRV's te gaan voeden vanuit één bronbestand. Nu ontstaan er nieuwe uitdagingen omdat er klantspecifieke vragen zijn. Zo wil bijvoorbeeld de GGD graag de

telefoonnummers van de patiënten en heeft het coronasupportteam van Bernhoven behoefte aan het lokale patiëntnummer. Data voor de klantspecifieke vragen komen uit andere tabellen en moeten worden samengevoegd met bronbestand. Ondanks het karakter van improvisatie, een beperkt omschreven opdracht onder grote druk, is er door goede samenwerking tussen applicatiebeheer (laboratorium), ICT (ziekenhuis), juridische zaken (JBZ) en data- en informatiemanager een effectief systeem neergezet dat bij diverse interne en externe partijen de administratieve druk flink heeft verlicht.

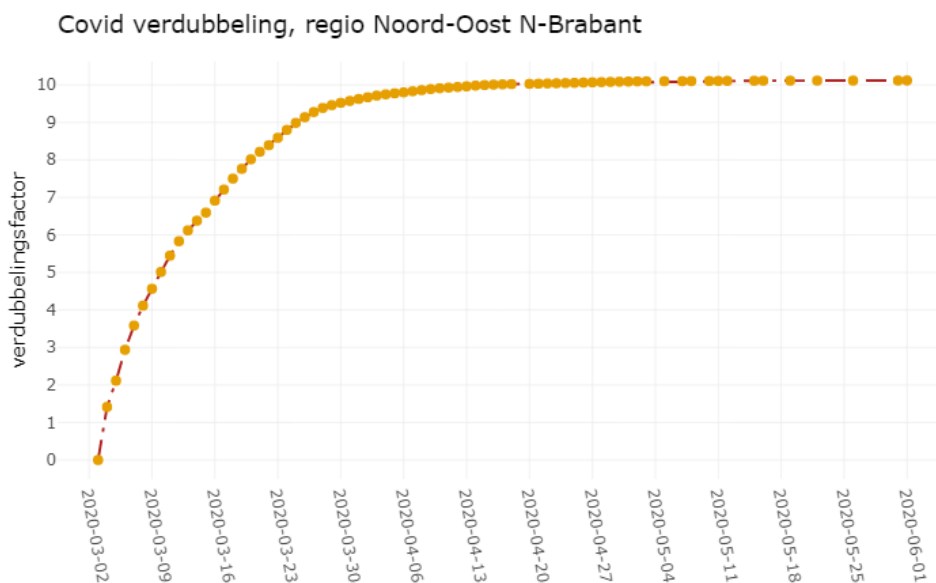
Het Corona Dashboard

Parallel aan de ontwikkeling van de CRV wordt een Corona Dashboard ontwikkeld. In tegenstelling tot de dataverzameling voor de CRV's worden de data niet geaggregeerd op testniveau maar op herkomst van de patiënt. Op deze manier wordt bijvoorbeeld de problematiek per ziekenhuis in kaart gebracht. Het Corona Dashboard wordt beschikbaar gesteld aan de arts-microbioloog en levert via hen gegevens aan het OMT van beide ziekenhuizen. Voor de RvB van de ziekenhuizen wordt een dagelijks rapport gemaakt op basis van deze dataverzamelaar. In de latere fase van de epidemie kunnen de bedrijfsarts en de GGD aanhaken om gebruik te maken

Figuur 2. Aantal COVID-19-patiënten in het Jeroen Bosch Ziekenhuis, Ziekenhuis Bernhoven en beide ziekenhuizen samen, uitgezet in de tijd met aanduiding van de door de overheid genomen beheersingsmaatregelen. De extreem snelle stijging maar ook de snelle daling zijn duidelijk te zien.



Figuur 3. Verdubbelingsfactor (het aantal positieve patiënten uitgedrukt in 2^y , waarbij y de verdubbelingsfactor is) van het aantal COVID-19 patiënten voor het Jeroen Bosch Ziekenhuis en Ziekenhuis Bernhoven tezamen uitgezet in de tijd.



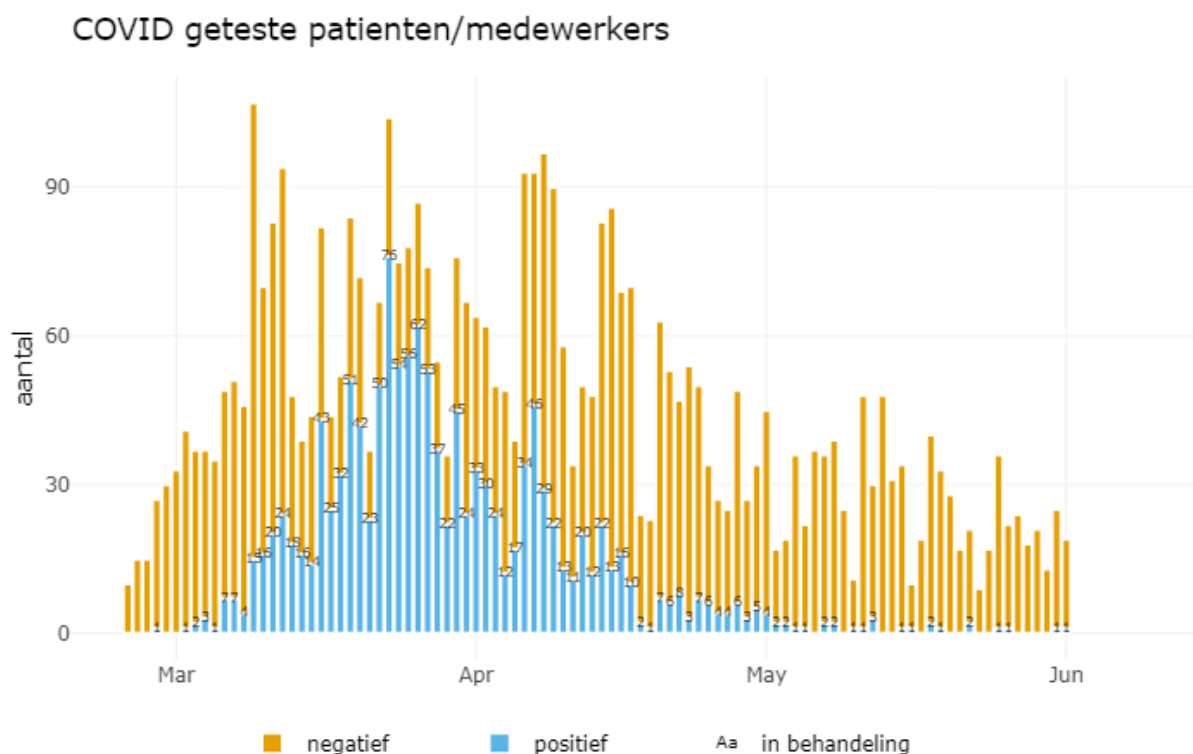
van de geaggregeerde data.

Het gebruik van Corona Result Viewer en Dashboard

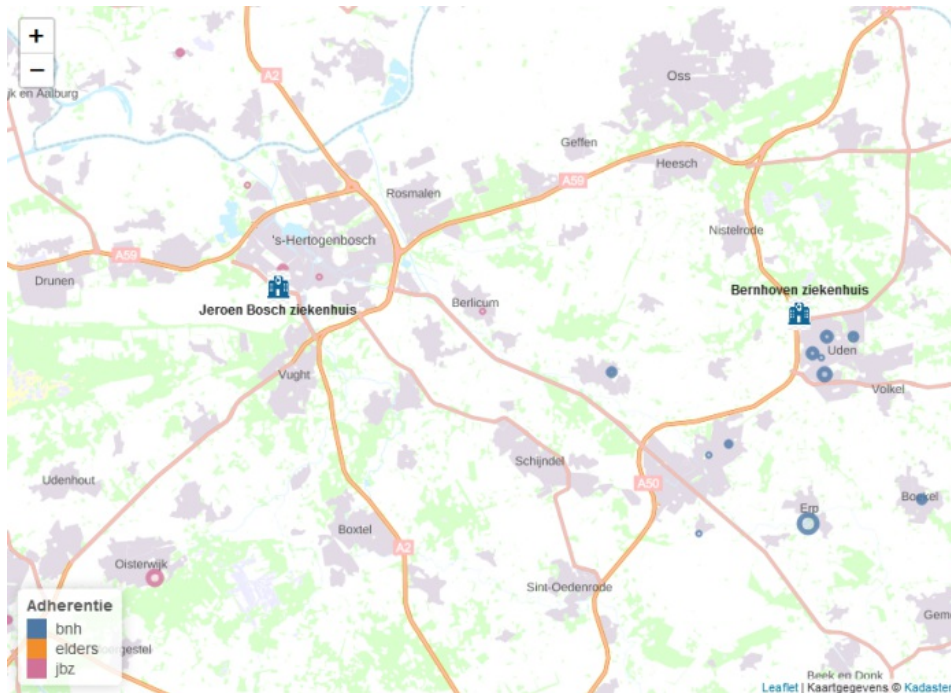
De viewer is aanvankelijk ontwikkeld om lokale epidemiologie van influenza inzichtelijk te maken. Een opmerkelijk staartje aan het eind van de influenzapieak wordt zichtbaar in figuur 1. Er is een behoorlijke toename in influenza-aanvragen in

week 10, 11 en 12. Dit is het moment dat juist het aantal influenzagevallen afneemt, maar dit moment valt samen met het begin van de COVID-19-epidemie (figuur 2). In week 10 (2 maart) wordt in ons laboratorium gestart met COVID-19-diagnostiek met PCR bij influenzanegatieve aanvragen. Ook worden in week 10 de eerste COVID-19-gevallen gediagnosticeerd in Uden en Den Bosch.

Figuur 4. COVID-19-positief- en -negatiefgeteste patiënten en medewerkers uitgezet in de tijd.



Figuur 5. De lokale COVID-19-epidemiologie in het adherentiegebied van het Jeroen Bosch Ziekenhuis (rood) versus het adherentiegebied van Ziekenhuis Bernhoven (blauw).



8 maart



15 maart

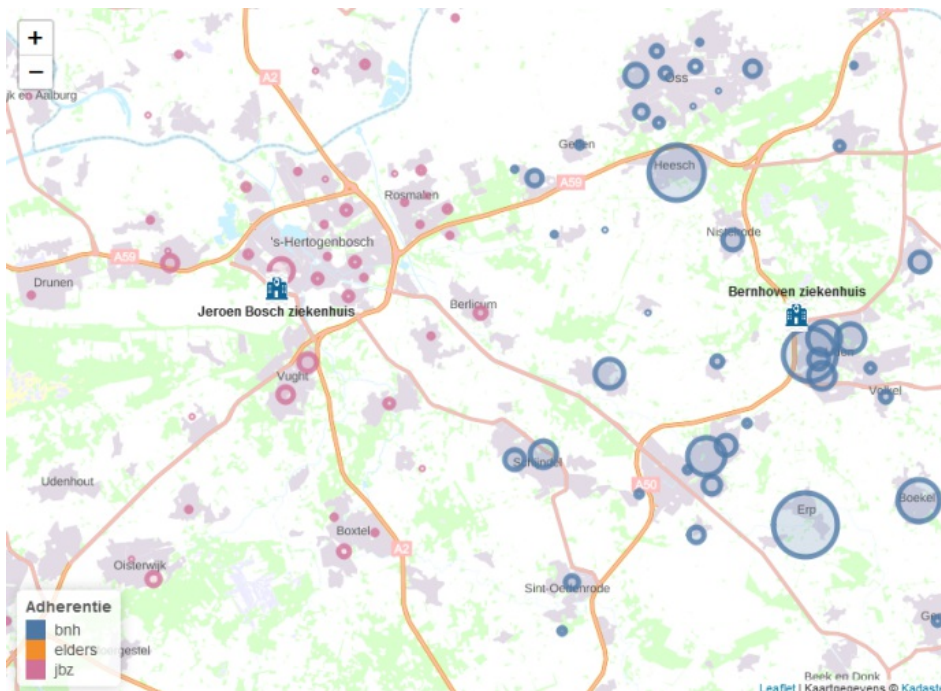
De snelle stijging van aantal COVID-19-diagnoses in Uden is opmerkelijk. In het begin is er een verdubbelingstijd van drie dagen (figuur 3). Het valt op dat als de data van twee ziekenhuizen worden samengevoegd, de pieken minder geprononceerd zijn (figuur 2). Waarschijnlijk wordt dit mitigerende effect versterkt als de data landelijk worden samengevoegd. Dit leidt tot verlies

aan inzicht van de lokale epidemiologie.

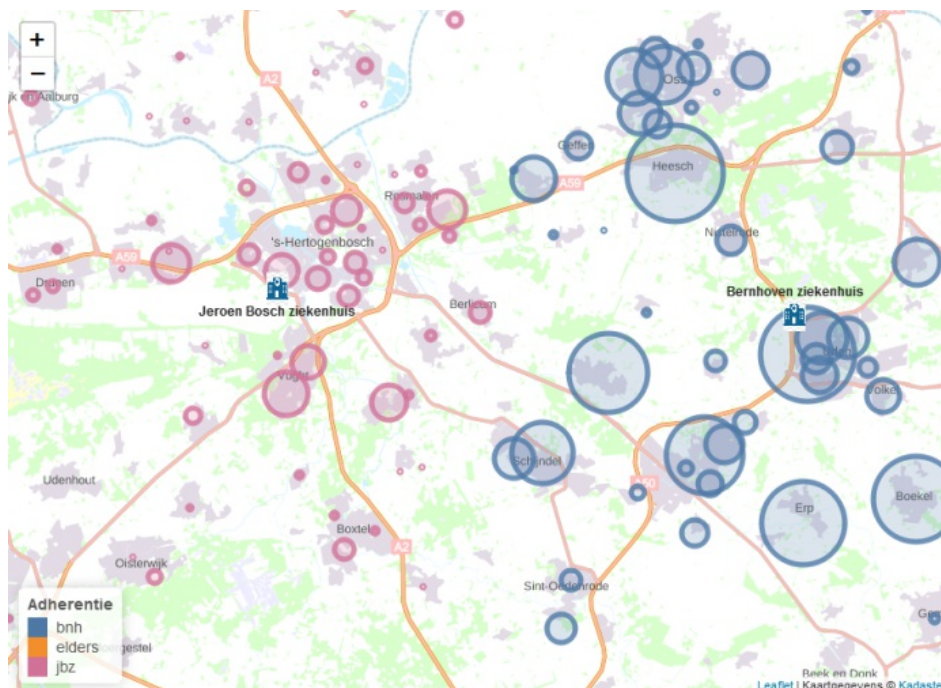
De oorzaak voor de snelle stijging in Uden is niet bekend. Meervoudige introductie door besmette vakantiegangers in het carnavalsgedruis lijkt het meest aannemelijk.

De verschillen tussen Bernhoven en JBZ in aantallen van geregistreerde besmettingen zijn wel heel opmerkelijk, met name omdat de afstand (20

Vervolg figuur 5. De lokale COVID-19-epidemiologie in het adherentiegebied van het Jeroen Bosch Ziekenhuis (rood) versus het adherentiegebied van Ziekenhuis Bernhoven (blauw).



22 maart



31 maart

km) tussen de twee locaties beperkt is (figuur 5).

De snelle daling, die vooral in Bernhoven zeer kort op de maatregelen volgde, kan niet volledig worden verklaard door het effect van die landelijke maatregelen (figuur 2 en 4). Mogelijk is de snelle daling mede veroorzaakt door het einde van het carnaval en doordat de focus van de

media gericht was op Noord-Brabant en specifiek op de regio Bernhoven. Misschien heeft ook een rol gespeeld dat eerst regionale maatregelen werden afgekondigd door de burgemeesters van Noord-Brabant. Dit heeft wellicht geleid tot een verhoogd bewustzijn in de regio, waardoor adviezen en maatregelen sneller zijn opgevolgd dan in andere delen van Nederland.

Doorgemaakte Q-koorts geassocieerd met ernstige ziekte of sterfte van COVID-19-patiënten?

Bert Mulder, Jona Walk, Mirjam Dautzenberg, Alfons Olde Lohuis, Marringje Nabuurs, Ton Dofferhoff

Samenvatting

In februari 2020 verspreidde de COVID-19-epidemie zich in Nederland vooral vanuit Brabant. De ziekenhuisopnames en de sterfte in Brabant (en Limburg) vertoonden een opvallende overeenkomst met de epidemiologische brandhaard van Q-koorts. Wij hebben in het serum van vijftig opgenomen COVID-19-patiënten Q-koorts fase II-IgG bepaald. Wij vonden een opvallend hoge seroprevalentie, namelijk 16 procent, met 18,5 procent bij Brabantse en 13 procent bij Gelderlandse patiënten. De huidige groep is te klein om definitieve conclusies te trekken. In een eventuele toekomstige studie naar de luchtkwaliteit, met name naar fijnstof als risicofactor, is het wellicht zinvol om ook doorgemaakte Q-koorts in de serologische onderzoeken mee te nemen.

Abstract

In February 2020, the COVID-19 epidemic in the Netherlands started mainly in Brabant. The hospital admissions and deaths in Brabant (and Limburg) showed a striking similarity with the epidemiologic hearth of the Q fever outbreak. We have determined Q fever phase II IgG in the serum of fifty COVID-19 patients. We found a remarkably high seroprevalence, almost 16 per cent, with 18.5 per cent in patients in Brabant and 13 per cent in Gelderland. The current group is too small to make definite conclusions. In future studies, on air quality, it is meaningful to include Q fever as risk factor in scientific research too

Inleiding

Sinds februari 2020 verspreidde de COVID-19-epidemie zich in Nederland vooral vanuit Brabant. Hoewel het RIVM van meet af aan een zeer terughoudend testbeleid hanteerde, bleek al snel dat het virus wijdverspreid was onder inwoners van Noord-Brabant. Dit werd enerzijds veroorzaakt door de terugkeer van Nederlanders uit met

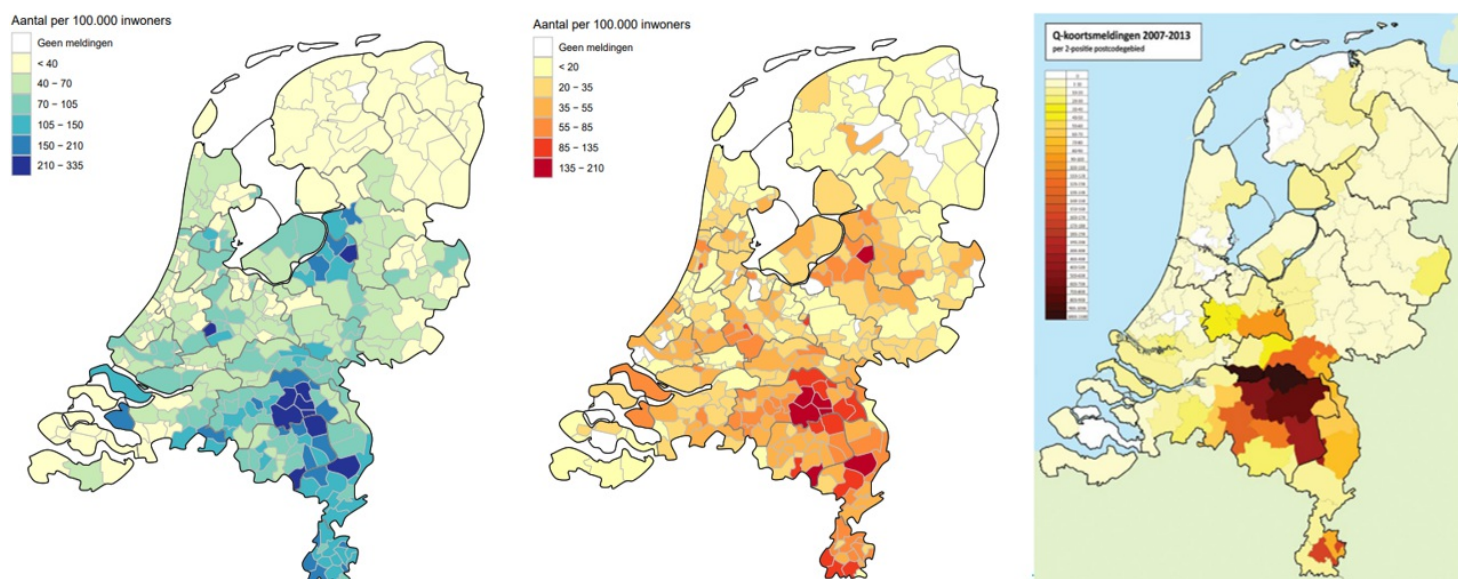
name Italiaanse en Oostenrijkse vakantiegebieden en anderzijds door zogenaamde 'superspreading events' met zeer efficiënte transmissie tijdens carnaval. In het weekend van 6-8 maart werden 1097 medewerkers in Noord-Brabantse ziekenhuizen onderzocht op SARS-CoV-2.[1]. In Tilburg bleek 9,5 procent van de onderzochte medewerkers positief. De meesten hadden geen contact gehad met op dat moment opgenomen COVID-19-patiënten, wat suggereert dat de verspreiding van het virus aanzienlijk groter was dan tot dan toe werd aangenomen. Het aantal opgenomen COVID-19-patiënten en het aantal sterfgevallen in Noord-Brabant nam daarna een grote vlucht. Op 10 juni 2020 waren er 48.087 ziekte- en 6.042 sterfgevallen gerapporteerd in Nederland, waarvan 9439 (19,6 procent) ziekte- en 1523 (25,2 procent) sterfgevallen in Noord-Brabant.[2]

Hoewel in heel Brabant en Limburg uitgebreid carnaval werd gevierd en mensen van wintersportgebieden terugkeerden in diezelfde vakantieperiode, kon dat het extreme aantal patiënten en sterfgevallen in Noordoost Brabant vergeleken met de rest van die provincie niet eenvoudig verklaren. Enerzijds zou het terughoudende testbeleid kunnen bijdragen aan een onderschatting van de werkelijke verspreiding in dit gebied. Anderzijds vertoonden de meldingen en de sterfte in Brabant (en Limburg) een opvallende overeenkomst met de epidemiologische brandhaard van

Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen, dr. B. Mulder, arts-microbioloog, J. Walk, aios interne geneeskunde, M. Dautzenberg, aios medische microbiologie; A. Olde Lohuis, huisarts; dr. M. Nabuurs, arts-microbioloog, dr. T. Dofferhoff, internist-infectioloog.
Correspondentieadres: b.mulder@cwz.nl.

Figuur 1. Prevalentie van COVID-19 en Q-koorts in Nederland

Links: Aantal in het ziekenhuis opgenomen COVID-19-patiënten per 100.000 inwoners, tussen 23 februari en 10 juni 2020. Midden: Aantal overleden COVID-19-patiënten per 100.000 inwoners, tussen 23 februari en 10 juni 2020. Rechts: Aantal Q-koortsmeldingen van 2007 tot en met 2013. Bron: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu.



een eerdere zoönotische uitbraak in dezelfde provincies: die van Q-koorts (figuur 1). Deze Q-koortsuitbraak was destijds de grootste ter wereld.[3] Een groot deel van het verzorgingsgebied van

het Canisius Wilhelmina Ziekenhuis (CWZ) bevindt zich in het voormalige Q-koortsgebied. Bovendien werd een deel van de patiënten in het werkgebied van ziekenhuis Bernhoven overgeplaatst naar het CWZ. Wij onderzochten of met

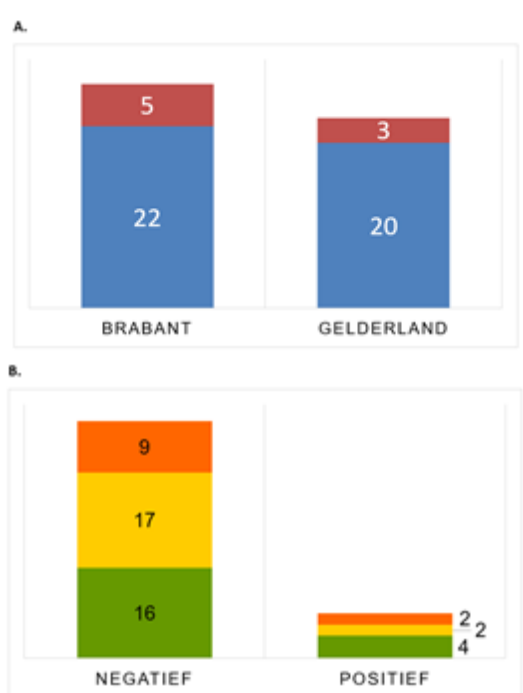
Figuur 2. Baselinetabel

	Q-koorts fase II-IgG	
	Negatief	Positief
Totaal	42	8
Man	32 (76 procent)	5 (63 procent)
Leeftijd (jaren)	70 (SD 12)	67 (SD 14)
Comorbiditeit (n, procent)		
Diabetes mellitus	11 (26 procent)	1 (13 procent)
Hypertensie	13 (31 procent)	5 (63 procent)
HVZ of cardiale afwijking	13 (31 procent)	4 (50 procent)
Astma/COPD	8 (19 procent)	2 (25 procent)
Overige longziekten	6 (14 procent)	1 (13 procent)
Immuungecompromitteerd	2 (4,8 procent)	0
Dialyseafhankelijk	1 (2,4 procent)	0
Actieve maligniteit	3 (7,1 procent)	0

Figuur 3. Q-koortsprevalentie en klinische uitkomst van COVID-19-patiënten in het CWZ.

(A) Prevalentie van Q-koorts fase II-IgG in serum van COVID-19-patiënten opgenomen in het CWZ, woonachtig in de provincie Noord-Brabant (n = 27) of in andere provincies (n = 23). Rood: Q-koorts fase II-IgG positief; blauw: negatief.

(B) Klinische uitkomst bij patiënten met negatieve (eerste kolom) en positieve (tweede kolom) Q-koorts fase II-IgG. Patiënten werden onderverdeeld in opgenomen en ontslagen vanaf de verpleegafdeling (groen), opgenomen op de IC (geel) en overleden op de verpleegafdeling zonder IC opname (oranje).



name bij onze Brabantse patiënten sprake was van doorgemaakte Q-koorts als additionele risicofactor voor ernstige COVID-19 en sterfte, naast de bekende risicofactoren als mannelijk geslacht, obesitas en diabetes mellitus.

Methoden

In het serum van vijftig patiënten die in het Canisius Wilhelmina Ziekenhuis waren opgenomen met een PCR-bevestigde SARS-CoV-2-infectie werden Q-koorts fase II-IgG-titers bepaald met IFA-techniek (Focus diagnostics, Diasorin USA).

Ziekte-uitkomst werd gedefinieerd als: 1) opgenomen op de COVID-19-afdeling in het ziekenhuis en ontslagen zonder intensivereopname; 2) opgenomen op de intensivereafdeling van het

CWZ; 3) overleden op de COVID-19-afdeling. Gegevens over comorbiditeiten werden opgevraagd uit het patiëntendossier.

Voor dit onderzoek werd toestemming verleend door de medisch-ethische toetsingscommissie van het CWZ (CWZ-nr. 027-2020; datum toestemming 12 maart 2020). Er werd geen schriftelijke toestemming gevraagd, maar patiënten konden kiezen om niet deel te nemen aan de studie nadat zij mondeling waren geïnformeerd.

Resultaten

In dit onderzoek werden 50 patiënten geïnccludeerd, 37 (74 procent) mannen met een gemiddelde leeftijd van 70 jaar (figuur 2). Van hen waren 27 (54 procent) op het moment van opname woonachtig in Brabant en 23 (46 procent) in andere provincies, met name Gelderland.

De seroprevalentie van fase II-IgG (doorgemaakte Q-koorts) was 16 procent, met een serologisch aangetoonde prevalentie van 18,5 procent bij Brabantse en 13 procent bij Gelderlandse patiënten.

Onder de 20 patiënten opgenomen en ontslagen vanaf de COVID-19-afdeling zonder intensivereopname, waren er vier (20 procent) seropositief. Bij de IC-patiënten waren dit er drie van de 19 (15,7 procent) en van de overleden patiënten één van de 11 (9 procent) (figuur 3). Binnen de verschillende patiëntencategorieën was per provincie geen opvallend verschil waarneembaar.

Discussie

Het is onduidelijk of doorgemaakte Q-koorts een additionele risicofactor vormt voor het doormaken of de ernst van COVID-19. Bij deze preliminaire studie onder patiënten in een ziekenhuis buiten de Q-koortsregio werd wel een hoge seroprevalentie van Q-koorts onder COVID-19-patiënten vastgesteld.

Eerdere studies schatten de seroprevalentie op 12 tot 15 procent.[3-5] Deze zijn echter gebaseerd op serum verzameld onder populaties in hoogrisicogebieden. Er zijn nog weinig data over doorgemaakte Q-koorts in andere regio's. Gezien het relatief kleine aantal patiënten in de huidige studie en het ontbreken van een geschikte controlegroep zonder COVID-19 is het niet mogelijk te concluderen of Q-koorts een risicofactor vormt, of dat er mogelijk andere risicofactoren een rol spelen.

Binnenkort start het RIVM een studie naar de

luchtkwaliteit, met name naar fijnstof als risicofactor. Tevens zullen er waarschijnlijk serologische studies worden verricht om de daadwerkelijke omvang van de COVID-19-epidemie in Noord Brabant beter in kaart te brengen. Wellicht is het, gezien de hoge prevalentie in dit onderzoek, zinvol om in dergelijke brede serologische studies ook doorgemaakte Q-koorts als risicofactor te evalueren.

Referenties

1. Reusken CB, Buiting A, Bleeker-Roovers C, et al. Rapid assessment of regional SARS-CoV-2 community transmission through a convenience sample of healthcare workers, the Netherlands. *Euro Surveill.* 2020;25:12.
2. RIVM, Epidemiologische situatie COVID-19 in Nederland. 2020.
3. van der Hoek W, Morry G, Renders MHN, et al. Epidemic Q fever in humans in the Netherlands. *Adv Exp Med Biol.* 2012;984:329-64.
4. Hogema BM, Slot E, Molier M, et al. Coxiella burnetii infection among blood donors during the 2009 Q-fever outbreak in The Netherlands. *Transfusion.* 2012;52:144-50.
5. van der Hoek W, Schneeberger PM, Oomen T, et al. Shifting priorities in the aftermath of a Q fever epidemic in 2007 to 2009 in The Netherlands: from acute to chronic infection. *Euro Surveill.* 2012;17:20059.

De immunologie achter SARS-CoV-2-afweerrespons, B en T!

Michiel Heron, Ailko Bossink, Hendrik Gremmels, Chantal Reusken, Johan Reimerink, Gijs Limonard, Kristin Kremer, Steven Thijsen

Samenvatting

Eind februari werd in Nederland de eerste COVID-19-patiënt gediagnosticeerd. Hoe het immuunsysteem de SARS-CoV-2-infectie precies bestrijdt en in hoeverre de respons adequaat is en langdurige bescherming biedt, is op dit moment nog niet duidelijk. In samenwerking met het RIVM is het Diaconessenhuis Utrecht een studie gestart om de immunorespons bij mensen met verschillende ernst van COVID-19 in kaart te brengen. In het laboratorium van de medische microbiologie van het Diaconessenhuis is een ELISpot ontwikkeld voor het meten van T-celreactiviteit tegen SARS-CoV-2-antigenen. Een recentelijk gepubliceerd artikel over de resultaten van de SARS-CoV-2-ELISpot wordt besproken, evenals de mogelijke rol van (geheugen) T-cellen in de afweer tegen SARS-CoV-2 en gerelateerde virussen.

Abstract

The first COVID-19 patient was diagnosed in the Netherlands at the end of February. Exactly how the immune system fights the SARS-CoV-2 infection and to what extent the response is adequate, is not yet clear. The Diaconessenhuis Utrecht, in collaboration with the RIVM, has started a study to map the immune response in people with different severity of COVID-19 disease. In the medical microbiology laboratory of the Diaconessenhuis, an ELISpot has been developed for measuring T-cell reactivity against SARS-CoV-2 antigens. A recently published article on the results of the SARS-CoV-2 ELISpot is discussed, as well as the recent insights regarding the role of (memory) T-cells in the immune defense against SARS-CoV-2 and related viruses.

In Nederland zijn tot en met 1 september in totaal 71.129 COVID-19-patiënten gemeld en zijn 6230

mensen overleden.[1] Hoge leeftijd is een risicofactor voor een ernstig beloop van COVID-19; van de opgenomen patiënten was de helft 68 jaar of ouder en van de overleden patiënten was de helft 83 jaar of ouder. Zeventig procent van de mensen die jonger dan 70 jaar waren bij overlijden hadden onderliggend lijden, waarvan cardiovasculaire aandoeningen en hypertensie, diabetes en chronische longaandoeningen het vaakst voorkwamen.[1] In veel gevallen verloopt COVID-19 mild en/of symptomeloos. Naast deze risicofactoren speelt het humane afweersysteem waarschijnlijk een belangrijke rol in het beloop van de ziekte, die door het SARS-CoV-2-virus wordt veroorzaakt.

Hoe het immuunsysteem de SARS-CoV-2-infectie precies bestrijdt en in hoeverre de respons adequaat is en langdurige bescherming biedt, is op dit moment nog niet duidelijk. Ook is nog onbekend wat de rol en het belang is van de aangeboren en verworven humorale (B-lymfocyten, antistoffen) en cellulaire (T-lymfocyten, cytokines) afweer. Daarom zijn wij een studie gestart om de immunorespons bij mensen met verschillende ernst van COVID-19-ziekte in kaart te brengen. Daarnaast willen we inzicht krijgen in hoeverre de

Diakonessenhuis, Utrecht, afdeling Medische Microbiologie, M. Heron, medisch immunoloog, H. Gremmels, afdeling medische microbiologie, S. Thijsen, arts-microbioloog; Diaconessenhuis, Utrecht, afdeling Longziekten, A. Bossink, longarts, G. Limonard, longarts; Centrum Infectieziektebestrijding, WHO referentielaboratorium voor COVID-19, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven, C. Reusken, viroloog, J. Reimerink, onderzoeker emerging en zeldzame virussen, K. Kremer, coördinator bacteriële serologie. Correspondentieadres: M. Heron (mheron@diakhuis.nl).

verworven humorale en cellulaire respons in de tijd aantoonbaar blijft. Mogelijk biedt dit aanknopingspunten om te beoordelen of deze respons bescherming biedt tegen herinfectie, en om de effectiviteit van een vaccin mede te kunnen beoordelen.

Interactie tussen B- en T-lymfocyten

Drainerende lymfeklieren vormen een ontmoetingsplek voor antigeenpresenterende cellen en B- en T-lymfocyten. De interactie tussen deze cellen maakt herkenning van lichaamsvreemde antigenen mogelijk en kan de aanzet vormen tot een afweerrespons tegen een nieuw coronavirus.

Elke B-lymfocyt heeft een unieke B-celreceptor, die door willekeurige genherschikking tot stand is gekomen. De B-celreceptoren herkennen zowel oplosbare antigenen als membraangebonden antigenen van micro-organismen en kunnen deze na internalisatie verwerken. Vervolgens komen peptidefragmenten van het antigeen terecht in het 'major histocompatibility'-complex (MHC) klasse II-complex. B-lymfocyten zullen na de eerste herkenning van het antigeen IgM-antistoffen gaan produceren. Om vervolgens tot IgG-antistofproductie te worden aangezet, moeten de door de B-lymfocyten in het MHC klasse II-complex gepresenteerde antigenen worden herkend door specifieke receptoren op geactiveerde CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten, ook aanwezig in de lymfeklieren. De interactie tussen de B- en T-lymfocyten wordt versterkt door co-stimulerende signalen, en vindt plaats in aanwezigheid van specifieke cytokines (onder meer interleukine (IL)-6 en IL-21). Dit stelt de B-lymfocyten in staat tot het maken van de isotypeswitch van IgM- naar IgG-antistoffen.[2] Daarnaast vindt affiniteitsrijping van de B-lymfocyten plaats, door selectie op grond van bindingssterkte van de B-celreceptor met het antigeen, en de vorming van geheugen-B-lymfocyten. De specifieke CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten zijn tevens noodzakelijk voor het activeren van antigeenspecifieke CD8⁺-T_{cytotoxische}-lymfocyten die zorgen voor het opruimen van virusgeïnfecteerde cellen. De productie van interferon-gamma (IFN-gamma) door de geactiveerde T-lymfocyten is essentieel voor de effectiviteit van de afweerrespons tegen intracellulaire bacteriële en virale infecties.

Humorale afweer tegen SARS-CoV-2

Voor het stellen van de diagnose COVID-19 wordt meestal gebruikgemaakt van de detectie van SARS-CoV-2-RNA via real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Voor detectie van SARS-CoV-2-specifieke antistoffen zijn in korte tijd verschillende testmethoden beschikbaar gekomen. Deze maken gebruik van verschillende, specifieke SARS-CoV-2-antigenen (S1-domein van het spike-eiwit, combinatie S1/S2-domein, receptorbindend domein van het spike-eiwit, nucleocapside-eiwit) die op unieke wijze gekoppeld zijn aan verschillende soorten vaste dragers (cellulose-strip, gecoat op een plastic plaat, gebonden aan beads). Verschillende substraatreacties worden gebruikt om de binding van antistoffen aan te tonen. Testen gebaseerd op het principe van laterale flow immuno assay (LFIA) en enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) kwamen het eerst op de markt, gevolgd door onder meer chemoluminescentie immuno assay (CLIA)-testen op geautomatiseerde systemen.

Inmiddels zijn diverse wetenschappelijke publicaties verschenen waarin serologische testen met elkaar worden vergeleken, en waarin de sensitiviteit van deze testen ten opzichte van PCR-bewezen ziekte en ernst van de ziekte en de specificiteit ten opzichte van andere coronavirussen zijn vastgesteld. Bovendien is er steeds meer inzicht in de correlatie tussen serologische routinetesten en de aanwezigheid van functionele antistoffen zoals neutraliserende antistoffen.[3] De testspecificaties zijn verschillend, afhankelijk van de ziekteduur en de ernst van de ziekte. Dit hangt ook samen met het type immunoglobuline dat wordt aangetoond, IgM, IgA, IgG of totaal-Ig-antistoffen. Globaal blijken SARS-CoV-2-antistoffen tussen 7 en 14 dagen na begin van de ziektesymptomen aantoonbaar. Naarmate het aantal ziektedagen langer en de ziekte ernstiger is, nadert de sensitiviteit van de meeste laboratorium IgG-testen de 95 procent of hoger. In Nederland verzamelt en deelt de Taskforce Serologie validatiedata, die worden aangeleverd door deelnemende medisch-microbiologische laboratoria. De rapportage van deze data is vrij toegankelijk en regelmatig worden geactualiseerde versies uitgebracht.[4]

Cellulaire afweer tegen SARS-CoV-2

Over de verworven cellulaire T-celrespons gericht tegen SARS-CoV-2-eiwitten is nog weinig bekend. Verschillende studies suggereren een onderdrukte T-celimmunititeit bij patiënten met ernstige COVID-19, gebaseerd op een verlaagd absoluut aantal circulerende T-lymfocyten of afwijkende IFN-gamma-expressie door T-lymfocyten gemeten met behulp van flowcytometrie. [5,6]

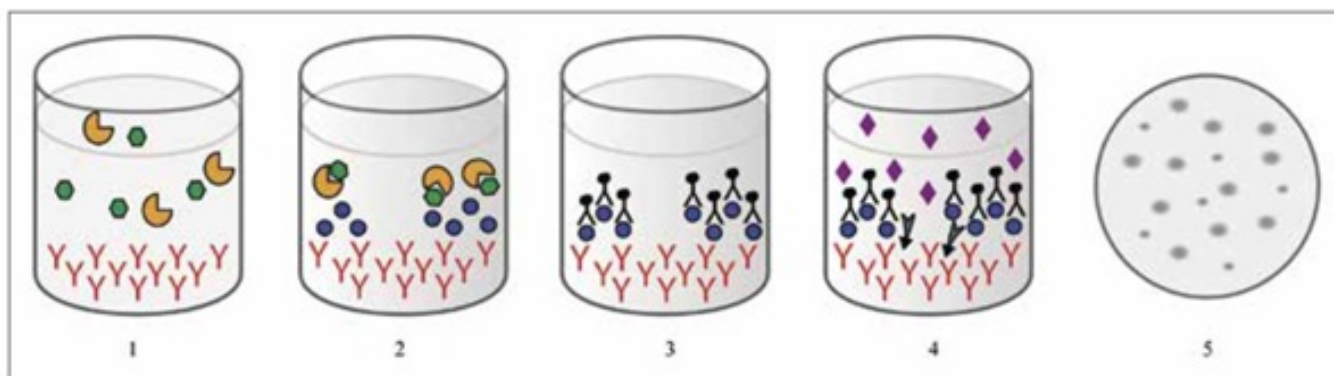
Zeer recent is een studie verschenen waarin SARS-CoV-2-eiwitpools zijn ingezet om te ontdekken welke SARS-CoV-2-eiwitten door specifieke T-lymfocyten van COVID-19-patiënten worden herkend, wederom gemeten met behulp van flowcytometrie. De resultaten lieten zien dat SARS-CoV-2-membraan-, spike- en nucleocapside-eiwitten codominant waren in herkenning door CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten. Bij CD8⁺ T_{cytotoxische}-lymfocyten was de reactie tegen het spike-eiwit minder dominant en werd significante reactiviteit aangetoond tegen membraan-, nucleocapside- en andere SARS-CoV-2-eiwitten. [7] In een andere recente studie werd aangetoond dat CD4⁺ T_{helper}-lymfocyten van COVID-19-patiënten reageren met het SARS-CoV-2-spike-eiwit maar dat deze ook aantoonbaar waren bij SARS-CoV-2-seronegatieve gezonde donoren. [8] In beide artikelen wordt

gediscussieerd over de samenhang tussen aangetoonde T-celreactiviteit en gemeten antistoffen tegen het SARS-CoV-2-spike-eiwit en de mogelijke kruisreactiviteit met andere coronavirussen.

Een andere methode om de functionele T-celrespons tegen SARS-CoV-2-antigenen te bepalen is het meten van IFN-gamma-productie met behulp van een enzymelinked immunospot (ELISpot)-methode. In het laboratorium van de medische microbiologie van het Diaconessenhuis is een ELISpot ontwikkeld voor het meten van T-celreactiviteit tegen SARS-CoV-2- nucleocapside-antigenen en tegen een SARS-CoV-2-mozaïekproteïne, dat bestaat uit membraan-, nucleocapside- en spike-eiwitten (figuur 1).

De methode bestaat uit het isoleren van mononucleaire cellen uit het perifere bloed (peripheral blood mononuclear cells (PBMC's)) en het toevoegen van een bepaald aantal cellen in een well van een plaat die is gecoat met IFN-gamma-vangende antistoffen. De cellen worden gestimuleerd met een bepaalde concentratie SARS-CoV-2-specifieke antigenen, met medium als negatieve controle en een polyklonale activator als positieve controle (anti-humaan CD3-monoklonale antistof). Indien de antigenen worden herkend door de antigeenspecifieke T-lymfocyten zullen

Figuur 1. Schematische weergave van het principe van de ELISpot test



- (1) De ELISpotplaat bestaat uit welltjes gecoat met antistoffen (rood) tegen IFN-gamma. Op de plaat worden mononucleaire cellen uit het perifere bloed ('peripheral blood mononuclear cells', PBMC's) (oranje) en SARS-CoV-2-eiwitten (groen) toegevoegd.
- (2) De PBMC's verwerken de SARS-CoV-2-eiwitten en presenteren stukjes van deze eiwitten aan de T-lymfocyten, die daarop IFN-gamma (blauw) produceren. De IFN-gamma wordt vervolgens gebonden aan de antistoffen tegen IFN-gamma op de bodem van de welltjes.
- (3) Na een incubatietijd van een nacht worden de welltjes gewassen, om ze van overvloedige PBMC's te ontdoen. Vervolgens wordt conjugaat toegevoegd (zwart), dat zich bindt aan het IFN-gamma-antistofcomplex.
- (4) Na opnieuw wassen wordt enzymsubstraat (paars) toegevoegd.
- (5) Na wassen en drogen zijn bij een positief resultaat stipjes zichtbaar op de bodem van de welltjes, waarbij elke stip overeenkomt met één SARS-CoV-2-specifieke IFN-gamma-producerende T-lymfocyt.

ze IFN-gamma uitscheiden dat kan worden gevangen door de anti-IFN-gamma-antistoffen gecoat op de plaat. Na 16 tot 20 uur stimulatie wordt het gebonden IFN-gamma gedetecteerd met behulp van een chromogeen substraat waardoor een gekleurde 'spot' ontstaat rond IFN-gamma producerende SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten. Een groot voordeel van deze test is dat het relatief eenvoudig is om spotvormende units te kwantificeren.

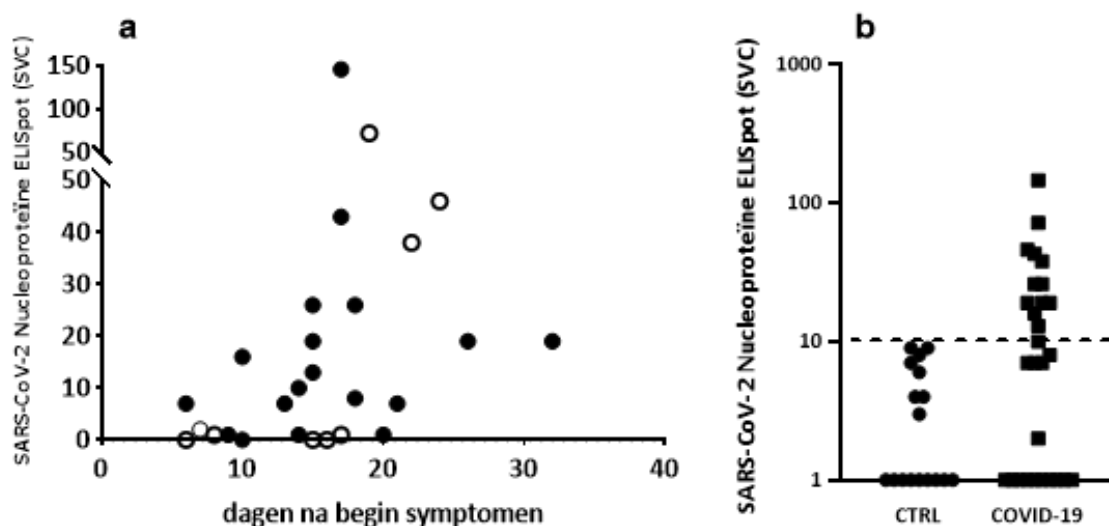
SARS-CoV-2-immunresponsstudie (SIR-studie)

Een recent in het *Journal of Infection* gepubliceerde studie, uitgevoerd in het Diakonessenhuis, toonde een robuuste T-celrespons tegen SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit meetbaar met behulp van de ELISpot test na circa 10 ziekte-dagen bij COVID-19-patiënten opgenomen op de intensive care (IC) of op de longafdeling (n = 27) (figuur 2a). In een gezonde controlegroep (n = 16) waren nooit meer dan negen spots meetbaar. Tien of meer spots tegen SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit werd dan ook beschouwd als diagnostisch voor COVID-19 (figuur 2b). Opvallend genoeg toonde een subset van de COVID-19-patiënten een vertraagde of onderdrukte respons. Vijf patiënten toonden vrijwel geen respons

en vier toonden een zwakke T-celrespons, aantoonbaar na 18 tot 32 ziekte-dagen.[9] De patiënten met de vertraagde of onderdrukte respons waren niet significant lymfopener, terwijl de respons op de positieve controle (polyklonale activator) wel significant lager was dan bij de COVID-19-patiënten zonder vertraagde of onderdrukte respons. Dit laatste zou kunnen wijzen op een vorm van uitputting van de T-lymfocyten.[10] In hoeverre dit correleert met ziekte-duur en ernst moet uit nader onderzoek blijken.

In samenwerking met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) zal in een vervolgstudie de waarde van de SARS-CoV-2-ELISpot verder worden onderzocht. In de SARS-CoV-2-immunresponsstudie (SIR-studie) zullen COVID-19-patiënten worden vergeleken met gezonde deelnemers. COVID-19-patiënten worden een jaar gevolgd, en op vijf momenten gedurende het jaar zullen niet alleen SARS-CoV-2- (virus-neutraliserende) antistoffen maar ook de functionele T-celrespons met de SARS-CoV-2-ELISpot worden bepaald en gekwantificeerd. Hiermee hopen we inzicht te krijgen in de ontwikkeling van de immunrespons tegen SARS-CoV-2 bij patiënten met ernstige, matige en milde COVID-19. Met name in deze laatste groep zijn er

Figuur 2. T-celrespons tegen SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit meetbaar met behulp van de ELISpot test, na circa 10 ziekte-dagen bij COVID-19 patiënten opgenomen op de intensive care (IC) of op de longafdeling



- a) SARS-CoV-2-ELISpot nucleoproteïne IFN-gammaspotvormende cellen (SVC) in relatie tot het aantal dagen na begin van ziekte-symptomen. Open en gesloten rondjes betreffen COVID-19-patiënten opgenomen op respectievelijk de IC en de longafdeling.
 b) SARS-CoV-2-ELISpot nucleoproteïne IFN-gammaspotvormende cellen (SVC) bij een gezonde controlegroep (CTRL) en bij COVID-19-patiënten. De gestreepte lijn toont de afkapwaarde die is vastgesteld voor COVID-19.

aanwijzingen dat de humorale respons afwezig of vertraagd is en lijkt de virusneutraliserende capaciteit van het serum beperkt.[11] Het is echter opvallend dat in een Zweedse en een Franse studie (de laatste als preprint beschikbaar op internet) ook na langere tijd SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten zijn gemeten bij seronegatieve familieleden van COVID-19-patiënten en bij individuen die asymptomatische of milde COVID-19 hebben doorgemaakt. Bij een deel van niet aan SARS-CoV-2 blootgestelde individuen uit de controlegroep bleken SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten aantoonbaar specifiek voor het membraan en spike-eiwit, maar niet gericht tegen het nucleocapside-eiwit. [12,13] In een Singaporese studie werd echter aangetoond dat bij patiënten die hersteld waren van SARS of COVID-19, de specifieke T-lymfocyten juist gericht waren tegen het SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit. Bij hen waren er nauwelijks T-lymfocyten detecteerbaar die gericht waren tegen niet-structurele eiwitten (NSP), gecodeerd door ORF1-regio. In tegenstelling tot deze bevindingen bij herstelde patiënten, bleek bij donoren die niet aan SARS-CoV of SARS-CoV-2 waren blootgesteld, de specifieke T-celrespons voornamelijk gericht te zijn tegen niet-structurele eiwitten van SARS-CoV-2. Omdat de ORF1-regio van SARS-CoV, SARS-CoV-2 en andere dierlijke bètacoronavirussen vrijwel volledige homologie vertoont, leidt blootstelling aan dierlijke coronavirussen waarschijnlijk tot priming van deze T-lymfocyten. Dit is een mogelijke verklaring voor de aangetoonde kruisreactiviteit. In hoeverre kruisreactie van eventueel al aanwezige specifieke T-lymfocyten tegen het nucleocapside-eiwit of de NSP-ORF1-eiwitten van invloed zijn op SARS-CoV-2-infectie of COVID-19-ziektebeloop zal onderzoek moeten uitwijzen.[14] Er zijn al overzichtsartikelen verschenen van de gepubliceerde studies waarin SARS-CoV-2-specifieke T-cel-responsen zijn geanalyseerd.[15,16] De hierboven beschreven data laten zien dat blootstelling aan SARS-CoV-2 een virusspecifieke T-celrespons kan induceren met of zonder aantoonbare seroconversie. Detectie van SARS-CoV-2-specifieke T-lymfocyten in monsters van voor de COVID-19-pandemie (niet blootgesteld aan SARS-CoV of SARS-CoV-2) wijst mogelijk op kruisreactiviteit ten gevolge van blootstelling aan gewone humane verkoudheids-coronavirussen (HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-NL63 en

HCoV-229E) en/of dierlijke coronavirussen. T-celreactiviteit tegen het SARS-CoV-2-nucleocapside-eiwit wordt bij individuen die niet zijn blootgesteld aan SARS-CoV of SARS-CoV-2, in de verschillende studies niet of minder dominant aangetoond.

De in het Diaconessenhuis ontwikkelde SARS-CoV-2-ELISpot biedt dus mogelijk aanvullende diagnostische waarde voor het bepalen van blootstelling aan en de immunusstatus tegen SARS-CoV-2. Of de aanwezigheid van een duurzame specifieke T-celrespons met of zonder antistoffen bescherming biedt tegen herinfectie met SARS-CoV-2 zal vervolgonderzoek moeten uitwijzen.

Referenties

1. RIVM. Epidemiologische situatie COVID-19 Nederland 01-09-2020. https://www.rivm.nl/sites/default/files/2020-09/COVID-9_WebSite_rapport_wekelijks_20200901_1353_0.pdf
2. den Haan JMM, Arens R, Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: Cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Imm Lett.* 2014;162:103-12.
3. Geurts-van Kessel CH, Okba NMA, Igloi Z, et al. An evaluation of COVID-19 serological assays informs future diagnostics and exposure assessment. *Nat Comm.* 2020;11:3436.
4. Taskforce Serologie, Landelijke Coördinatiestructuur Testcapaciteit, Status of the validation of ELISA and auto-analyser antibody tests for SARS-CoV-2 diagnostics: considerations for use. 2 July, 2020.
5. Chen G, Wu D, Guo W, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest.* 2020;130(5):2620-9.
6. Xu B, Fan CY, Wang AL, et al. Suppressed T cell-mediated immunity in patients with COVID-19: A clinical retrospective study in Wuhan, China. *J Infect.* 2020;81(1):e51-e60.
7. Grifoni A, Weiskopf D, Ramirez SI, et al. Targets of T cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell.* 2020;181:1489-501.
8. Braun J, Loyal L, Frensch M, et al. Presence of SARS-CoV-2-reactive T cells in COVID-19 patients and healthy donors. Preprint at medRxiv doi.org/10.1101/2020.04.17.20061440 (2020).
9. Thijsen S, Heron M, Gremmels H, et al. Elevated nucleoprotein-induced interferon- γ release in COVID-19 patients detected in a SARS-CoV-2 enzyme-linked immunosorbent spot assay. *Journal of Infection.* 2020;81:452-82.
10. Diao B, Wang C, Tan Y, et al. Reduction and functional exhaustion of T cells in patients with Coronavirus disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol.* 11:827.
11. Rijkers G, Murk JL, Wintermans B, et al. Differences in antibody kinetics and functionality between severe and mild SARS-CoV-2 infections. Preprint at medRxiv doi.org/10.1101/2020.06.09.20122036.
12. Sekine T, Perez-Potti A, Rivera-Ballesteros O, et al. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell.* 2020; doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.017>.

13. Gallais F, Velay A, Wendling MJ, et al. Intrafamilial exposure to SARS-CoV-2 induces cellular immune response without seroconversion. Preprint at medRxiv doi.org/10.1101/2020.06.21.20132449.
14. Le Bert N, Tan AT, Kunasegaran K, et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020;584:457-62.
15. Altmann M, Boyton RJ. SARS-CoV-2 T cell immunity: Specificity, function, durability, and role in protection. *Science Immunology*. 2020;5(49):eabd6160.
16. Chen Z, Wherry EJ. T cell responses in patients with COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020;1-8.

Promoties

12 oktober 2020 - H. Aardema

Prevention and treatment of infections in intensive care patients - challenges and potential improvements

Promotoren: prof. dr. A.M.G.A. de Smet en prof. dr. J.G. Zijlstra
Copromotoren: dr. ir. H.J.M. Harmsen en dr. W. Bult
UMCG Groningen,
afd. Intensive Care Volwassenen.
UMC Utrecht, Divisie Vitale functies

4 november 2020 - Margarita Bernal Cabas

Bacterial protein secretion: applications & stress

Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Co-promotor: dr. G. Buist
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

11 november 2020 - B.C.G.C. Slingerland

Golden Staph, colonization, carriage and transmission

Promotor: prof. dr. M.C. Vos
Copromotor: dr. W.J.B. van Wamel
Erasmus MC Rotterdam,
afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten

16 november 2020 - Y. Mora-Hernandez

Exploring the *Staphylococcus aureus* cell wall for invariant immunodominant targets

Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Copromotor: dr. G. Buist
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

25 november 2020 - B. Prajapati

Snap shots of bacterial adaptation

Promotoren: prof. dr. J.M. van Dijk en prof. dr. A.W. Friedrich
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

27 november 2020 - Y.R. Saharman

ICU-acquired carbapenem non-susceptible bacilli in Indonesia

Promotor: prof. dr. H.A. Verbrugh (em.)
Copromotoren: dr. J.A. Severin en dr. A. Karuniawati
Erasmus MC Rotterdam,
afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten

2 december 2020 - R.Y. Yahiaoui

Streptococcus pneumoniae carriage and effect of vaccination on prevalence, serotypes and antibiotic resistance

Promotor: prof. dr. A. Verbon
Copromotor: dr. E.E. Stobberingh
Erasmus MC Rotterdam,
afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten

9 december 2020 - R. Aguilar Suárez

Less is more: Genome-reduced *Bacillus subtilis* for protein production

Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Copromotor: dr. G. Buist
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie