

NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR  
**MEDISCHE MICROBIOLOGIE**



### Thema Tuberculose

Niet-specifieke effecten van het BCG-vaccin  
Tuberculoseonderzoek en casuïstiek  
Non-tuberculeuze mycobacteriële infecties  
De toekomst van tuberculosediagnostiek

### Ingezonden

*Nocardia*-infecties in Nederland

### Artikel

Uitbraken van voedselinfecties

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 congres-  
verslagen en cursusaankondigingen.

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

Hoofredactie  
Dr. Bert Mulder

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

Redactiesecretariaat  
Alphatekst, Marina Kapteyn  
Baronie 42  
2404 XG Alphen aan den Rijn  
tel. 06 12076835  
[marina@alphatekst.nl](mailto: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 verveelvoudigd,  
opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens-  
bestand 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

## Pagina

### Van de redactie

Een pandemie in slow motion 3  
*Doortje Heemskerk, Maarten Scholing*

Een advies van een wetenschapper 4  
*Bert Mulder*

### Transmissieroute

Reizen tijdens de pandemie 5  
*John W.A. Rossen*

### Thema Tuberculose

Niet-specifieke effecten van het BCG-vaccin 6  
*Simone Moorlag, Mihai Netea*

Ontwikkelingen in tuberculoseonderzoek 12  
*Doortje Heemskerk, Coen Kuijl, Wilbert Bitter*

Een meisje met orbitale tuberculose 20  
*Cornelis van der Torren, Marceline van Furth,  
Martijn van der Kuip*

Niet-tuberculeuze mycobacteriële longinfecties 24  
*Arthur Lemson, Jakko van Ingen, Onno Akkerman,  
Wouter Hoefsloot*

De toekomst van tuberculosedagnostiek in Nederland 30  
*Jakko van Ingen, Arjan Jansz, Ed J. Kuijper, Alewijn Ott,  
Maarten Scholing, Jurriaan de Steenwinkel*

### Ingezonden

Epidemiologie en laboratoriumdiagnostiek van 34  
*Nocardia*-infecties in Nederland  
*Iris Tabak, Karola Waar, Jakko van Ingen*

### Artikel

The Times They Are A-Changin' 37  
*Eelco Franz, Menno van der Voort, Roan Pijnacker,  
Coen van der Weijden, Thijs Bosch*

### Voortgangstoets

Opgave 43  
Antwoord en uitleg 40  
*Mohammed Saadulla, Frans Verduyn Lunel*

### Promoties & oraties

47

# Een pandemie in slow motion

Doortje Heemskerk, Maarten Scholing

Op donderdag 24 maart 2022 was het Wereldtuberculosedag, exact 140 jaar nadat Robert Koch in Berlijn presenteerde dat hij de tuberkelbacil had ontdekt. Deze dag dient om wereldwijde bewustwording te creëren rond het ziektebeeld tuberculose.

Voor velen van ons lijkt het een ziekte uit het verleden; beelden van sanatoria in Zwitserland, levertraan en zonlicht als enige bestrijding. De helft van de slachtoffers, veelal kinderen, overleed. Door de verbetering van levensomstandigheden in de rijkere regio's van de wereld, focus op openbare gezondheidszorg maatregelen, vaccinatie en pas daarna de ontwikkeling van de gerichte antibiotica, verdween de witte dood uit ons dagelijks leven.

In dit themanummer Tuberculose van het *NTMM* vragen wij aandacht voor deze schijnbaar vergeten, maar niet in het verleden woedende pandemie, ook al speelt deze zich met name op afstand en langzaam af. Spoed is de boodschap voor jaarlijks 10 miljoen mensen die actieve tuberculose ontwikkelen.

De Covid-19-pandemie heeft, volgens de WHO, de wereldwijde inspanningen om tuberculose te elimineren ongeveer vijf jaar terug in de tijd geworpen. Door gebrek aan toegang tot zorg en opsporing zijn de vastgestelde besmettingen dramatisch gedaald en daarmee is de kans op transmissie en sterfte voor het eerst weer toegenomen.

Een antieke pijler onder bestrijding is vaccinatie. Het Bacillus Calmette Guérin (BCG)-vaccin, het meest toegediende vaccin ter wereld, is vrij ineffectief in het voorkomen van pulmonale tuberculose. Toch is het succesvol, ten eerste omdat het ernstige vormen van tuberculose bij kinderen voorkomt (miliaire tuberculose en tuberculeuze meningitis), en ten tweede omdat, na de introductie van het vaccin, de kindersterfte door andere infecties afnam. Moorlag en Netea beschrijven in hun artikel het fenomeen 'trained immunity', waarbij het bcg-vaccin optreedt als epigenetische trainer van stamcellen. Zij suggereren dat bij (re)vaccinatie op

volwassen leeftijd dit fenomeen zich voordoet, kan leiden tot een reductie van Covid-19-infecties en daarmee de toepassing van het vaccin in de toekomst wellicht nog breder zal zijn.

Momentum in translationeel onderzoek naar tuberculose komt in de vorm van zebra-vissen. Heemskerk et al. beschrijven hoe in het Amsterdam UMC gebruik wordt gemaakt van een zebra-visseninfectiemodel om de pathogenese van onder andere tuberculeuze meningitis in beeld te brengen. Het belang van het ESX-1-secretiesysteem voor virulentie is in dit model bevestigd, en op grote schaal kunnen nieuwe geneesmiddelen op effectiviteit en toxiciteit gescreend worden op zebra-visslarven. Gentechnieken zoals CRISPR/Cas9 en CRISPRi kunnen dergelijk onderzoek verder bespoedigen.

In de klinische praktijk is het soms erg lastig om extrapulmonale tuberculose (naast *Treponema pallidum* is *Mycobacterium tuberculosis* een mooie tweede voor de titel 'the great imitator') te herkennen en te diagnosticeren. Opmerksaamheid van behandelaar en (arts-)microbioloog zijn geboden. Aan de hand van de casus over orbitale tuberculose van Van der Torren et al. wordt duidelijk dat vaak pas laat in het diagnostisch proces aan tuberculose gedacht wordt. Microbiologische bevestiging lukt dikwijls niet op niet-pulmonale samples.

De kweek op *Mycobacterium tuberculosis*-complex wordt door velen nog steeds gezien als de gouden standaard in de microbiologische bevestiging van tuberculose. Van Ingen et al. geven een kritische beschouwing op de kwaliteit van dienstverlening in het langzaam veranderende landschap van laboratorium-diagnostiek in Nederland.

Amsterdam UMC, dr. A.D. Heemskerk, aios medische microbiologie.  
OLVG Lab BV, M. Scholing, arts-microbioloog.  
Correspondentieadres: dr. A.D. Heemskerk,  
(a.heemskerk@amsterdamumc.nl)

Andere spelers in de differentiaaldiagnose van pulmonale tuberculose zijn de non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) en *Nocardia*. De artikelen van Lemson et al. en Tabak et al. bieden een helder overzicht rondom de identificatie, gevoeligheidsbepaling en behandeling van deze verwekkers met toenemende importantie. De parallellen tussen tuberculose en de huidige

pandemie zijn groot, de verschillen in respons schrijnend. Nieuwe (resistente) genotypen, die vanuit 'high-burden' continenten de wereld overgaan, zullen de gezondheid van veel mensen nog lange tijd ondermijnen. In de volgende editie van het *NTMM* volgen daarom nog enkele artikelen binnen dit thema, met de jongste inzichten en discussies over tuberculose.

---

## Een advies van een wetenschapper maakt dat nog niet tot een wetenschappelijk advies

Bert Mulder, hoofdredacteur

Precies twee jaar geleden schreef ik in de editorial van het *NTMM*: "Ik geloof dat Nederland als enige land ter wereld een strategie van groepsimmunititeit nastreeft." Los van de vraag of het strategie of bijeffect van beleid was: groepsimmunititeit als strategie om de Covid-19-pandemie te bestrijden blijkt nu, twee jaar later, niet haalbaar omdat er geen steriele immunititeit optreedt. Maar ook toen, aan het begin van de pandemie, was er geen enkele aanwijzing dat dit nastrevenswaardig was. "Using the principle of herd immunity to stem the Covid-19 pandemic is unethical and not an option", zei WHO directeur-generaal Tedros Ghebreyesus in oktober 2020. Farrar noemt het in zijn boek *Spike* "ideologie verpakt als wetenschap" en benadrukt verder dat het ontkennen van de mogelijkheid van asymptomatische besmettingen in de beginfase problematisch was. Nederland kende bovendien een afwijkend mondneusmaskerbeleid, waarbij maskers zelfs als schijnveilig werden afgeschilderd. Er ontbrak aandacht voor virusverspreiding via aerosolen, er werden geen eisen gesteld aan de kwaliteit van mondkapjes en campagnes voor ventilatie en maatregelen op scholen waren gebrekkig en traag. Bij exponentiële groei van besmettingen is het zinvol om indammaatregelen snel in te voeren; anders stopt weliswaar de groei van het aantal besmettingen, maar blijven die lange tijd op hun hoge niveau, zoals we in de winter van 2020/2021 hebben meegemaakt.

Indammaatregelen als bron- en contactonderzoek zijn bovendien makkelijker uit te voeren bij een laag aantal besmettingen dan bij 'gecontroleerd razen' met 10.000 besmettingen per dag. Ook zullen er dan geen 600 mensen op de IC belanden, de reden dat Nederland in december 2021 als enige EU-land alsnog in lockdown moest. Dat een strenge indamstrategie bij het afschalen van maatregelen steeds voor nieuwe ervaringen van het virus zou zorgen, zoals in de kamerbriefing op 18 maart 2020 werd gesteld, bleek in de praktijk nog veel sterker op te gaan voor de strategie van 'gecontroleerd razen'. Zelfs vaccins, hoe effectief ook tegen ernstige ziekte, bleken niet te beschermen tegen herinfectie met nieuwe varianten en gevaccineerden blijken het virus nog steeds te kunnen verspreiden. Door de hoge viruscirculatie bestaat er een voortdurend risico op het ontstaan van nieuwe varianten, die kunnen zorgen voor verhoogde ziektelast. De alfa- en deltavariant waren daar voorbeelden van. Hoewel omikron alles op z'n kop heeft gezet, zien we dat BA.2 (al dan niet met S:11221T of H78Y) het alweer van BA.1 en BA1.1 overneemt. Een betere monitoring van varianten, leren van de gemaakte fouten en de dialoog over de langetermijnstrategie verbreden zijn nu de eerste stappen die gezet moeten worden.



# Reizen tijdens de pandemie

John W.A. Rossen

Begin 2020 verliet ik de academie en maakte ik de sprong naar het bedrijfsleven. Van een afstand volgde ik de perikelen rondom de coronaviruspandemie, het virus waar ik in 1996 op promoveerde aan de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Mijn promotor, wijlen prof. dr. M.C. Horzinek, zal regelmatig hebben moeten glimlachen bij wat er gebeurde. Ineens bleek iedereen verstand te hebben van dit virus en de te nemen maatregelen. Leken (voor het gemak schaar ik hier ook de politici onder), (medisch) moleculair biologen, epidemiologen, artsen-microbioloog, dierenartsen en specialisten infectieziekten, velen wilden hun zegje doen op sociale media en in de krant, maar het liefst op radio en tv. Het lukte me niet altijd om me te onthouden van commentaar en ik nam waar dat we binnen microbiologisch Nederland in ieder geval niet op één lijn staan.

Werkend voor een Amerikaans bedrijf was ik een van de ‘gelukkigen’ die tijdens de pandemie konden blijven reizen. Gedurende de laatste twee jaar reisde ik naar België, Duitsland, Zweden, Portugal en de Verenigde Staten (VS). Ik voerde gesprekken met personeel van trein en luchtvaart. Wat mensen al niet verzinnen om toch vooral dat mondkapje maar niet op te moeten doen. Een conducteur vertelde me dat je net zo lang met één zakje chocoladenootjes kunt doen als de tijd die het kost om een treinreis van Schiphol naar Groningen te maken. En natuurlijk al die tijd geen mondkapje op, want “je bent aan het eten”. Raar woord trouwens “mondkapje” – mijn Amerikaanse vrienden vonden dat ook en spraken liever over een ‘face-mask’, waarna ik dan maar weer uitlegde dat dit iets is wat een schoonheidsspecialist bij je aanbrengt. Erg verwarrend. In de meer dan tien keer dat ik in de VS was gebeurde daar overigens ook van alles. Naast de heisa rondom de verkiezingen van de Amerikaanse president en de bestorming van het Capitool (al die keren was ik in de VS), had ook daar iedereen een mening over de pandemie. En dan was er natuurlijk het testen om er zeker van te zijn dat je niet coronaviruspositief was bij het instappen in het vliegtuig. Vaak werd mijn negatieve testbewijs niet gecontroleerd op de luchthavens – kennelijk was iedereen blij een reiziger te zien. Ik herinner me in een Boeing 747-400 te hebben gevlogen met maar 35 passagiers. De keren

dat ik me in de VS liet testen mocht ik zelf mijn nasofaryngeale wattenstok inbrengen. Mijn grootste angst was dat ik positief zou testen en niet terug naar huis kon, dus erg mijn best om de wattenstok diep af te nemen deed ik niet (inderdaad, niet verantwoord en egoïstisch). Mijn meest angstige moment was aan het begin van de pandemie. Vlak voor het vliegveld van Salt Lake City maakte de Uber-driver een rare zwieper. We stapten uit, maar er bleek niets met de auto aan de hand te zijn. Eenmaal binnen in de vertrekhal was het chaos. Ik stond een uur voor de (gesloten) security toen het hele gebouw begon te trillen en te bewegen. Coronavirus of niet, iedereen begon te rennen, mondkapje op de enkels, en maakte dat hij of zij buiten kwam. Daar vergat men vervolgens de 1 meter 80-maatregel te handhaven (in de VS is nu eenmaal alles groter, dus ook de te houden afstand) en viel men elkaar huilend en vol angst in de armen. Velen hadden geen jas aan en dat is in maart in Salt Lake City geen pretje. Dus stond iedereen dicht bij elkaar om warm te blijven. Het bleek een aardbeving te zijn met een kracht van 5,7 op de schaal van Richter. Hoewel aardbevingen op zichzelf niet overdraagbaar zijn, is de daarmee gepaard angst dat wel. Daar helpt geen 1,5 meter of mondkapje tegen. Ik kan me niet herinneren ooit zo blij te zijn geweest als toen ik – uiteindelijk twee dagen later dan gepland – mijn vrouw en jongens in de armen kon sluiten. Voor even waren het gevaar en de zorgen rondom de pandemie verdwenen en besefte ik pas echt hoe kwetsbaar en waardevol het leven is.

De pen van deze *Transmissieroute* geef ik door aan Sylvia Debast.

Isala, Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten (LMMI), Zwolle, prof. dr. J.W.A. (John) Rossen, medisch moleculair microbioloog. University of Utah School of Medicine, Salt Lake City, Utah, USA, Department of Pathology, Adjunct Professor. Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, adjunct-hoogleraar.  
Correspondentieadres: john.rossen@gmail.com.

# Niet-specifieke effecten van het BCG-vaccin

Simone Moorlag, Mihai Netea

## Samenvatting

Het *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-vaccin is het meest gebruikte vaccin ter wereld. Bij meer dan 4 miljard mensen is het BCG-vaccin toegediend en jaarlijks ontvangen meer dan 100 miljoen pasgeborenen het vaccin. Behalve dat het gedeeltelijke bescherming biedt tegen tuberculose blijkt het BCG-vaccin ook werkzaam als immunotherapie bij patiënten met blaaskanker. Daarnaast heeft onderzoek aangetoond dat het BCG-vaccin bescherming biedt tegen infecties die niet door mycobacteriën worden veroorzaakt. Deze niet-specifieke effecten ontstaan doordat het vaccin langdurige veranderingen in het aangeboren immuunsysteem teweegbrengt, een effect dat 'getrainde immuniteit' wordt genoemd. Dit artikel geeft een kort overzicht van de niet-specifieke effecten van het BCG-vaccin op infecties en bespreekt de mogelijke rol van BCG in de Covid-19-pandemie.

## Abstract

The *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-vaccine is the most widely used vaccine in the world. More than 4 billion individuals have been vaccinated with BCG and the vaccine is administered to more than 100 million children around the world every year. Besides offering limited protection against disseminated forms of tuberculosis, BCG is used as a non-specific immunotherapy in bladder cancer. More recently, it was shown that BCG also offers protection against various non-mycobacterial infections. These non-specific effects are mediated via the induction of long-term functional reprogramming of innate immune cells, a process termed 'trained immunity'. This article gives a short overview of the evidence for non-specific protection against infections induced by BCG and discusses its potential role in the Covid-19 pandemic.

## Introductie

Honderd jaar geleden hebben de Franse onderzoekers

Albert Calmette en Jean-Marie Camille Guérin het *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG)-vaccin tegen tuberculose ontwikkeld. Het vaccin bestaat uit een levend verzwakte stam van de *Mycobacterium bovis*-bacterie en wordt in de meeste landen waar tuberculose endemisch voorkomt, intracutaan toegediend bij pasgeborenen. Daarmee is het BCG-vaccin, of kortweg BCG, het meest toegediende vaccin ter wereld. Volgens schattingen ontvangt ongeveer 75 procent van de 130 miljoen pasgeborenen wereldwijd het tuberculosevaccin [1]. De effectiviteit van BCG-vaccinatie tegen tuberculose is echter beperkt, is afhankelijk van veel verschillende factoren en varieert tussen de 0 en 80 procent [2].

Na een infectie of vaccinatie bouwen de T- en B-lymfocyten van het adaptieve immuunsysteem een immunologisch geheugen op. Na het ontstaan van deze cellen verloopt de immunrespons efficiënter en krachtiger bij een secundaire infectie met hetzelfde micro-organisme. Recent heeft onderzoek echter aangetoond dat het BCG-vaccin naast bescherming tegen tuberculose, ook bescherming kan bieden tegen niet-mycobacteriële infectieziekten door het aangeboren immuunsysteem te 'trainen'. Lange tijd werd gedacht dat de cellen van het aangeboren immuunsysteem (onder meer monocyten, 'natural killer' (NK)-cellen, neutrofielen en macrofagen) geen immunologisch geheugen kunnen opbouwen en, in tegenstelling tot lymfocyten, op dezelfde manier reageren bij een tweede infectie. Uit studies met gezonde vrijwilligers die met het BCG-vaccin werden gevaccineerd bleek dat dit niet juist is. De afweercellen van het aangeboren immuunsysteem zijn na BCG-vaccinatie niet alleen in staat om meer afweerstoffen

Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie,  
S.J.C.F.M. Moorlag, aios Medische Microbiologie,  
promovendus.  
Radboudumc, afdeling Experimentele Interne  
Geneeskunde, M.G. Netea, internist-infectioloog.  
Correspondentieadres: S.J.C.F.M. Moorlag  
(simone.moorlag@radboudumc.nl).

te produceren tegen antigenen van de tuberkelbacil; ze vertonen ook een sterkere immuunrespons tegen andere niet-tuberculeuze bacteriën, virussen en schimmels. Naast de verhoogde productie van pro-inflammatoire cytokines en zuurstofradicalen, neemt het aantal receptoren waarmee monocyt en neutrofielen pathogenen herkennen sterk toe na BCG-vaccinatie [3,4]. Dit niet-specifieke immunologische geheugen van het aangeboren immuunsysteem wordt 'getrainde immuniteit' (Engels: *trained immunity*) genoemd (figuur 1) [5].

### Epigenetische en metabole modificaties

De laatste jaren is steeds meer duidelijk geworden over de mechanismen die ten grondslag liggen aan het proces van getrainde immuniteit. Zo is gebleken dat na BCG-vaccinatie de RNA-transcriptie en de productie van eiwitten betrokken bij de afweer bij een tweede infectie sneller en efficiënter verlopen. Dit wordt mogelijk gemaakt door veranderingen in de manier waarop het chromatine ligt opgevouwen in de celkern, ook wel epigenetische modificaties genoemd. Na BCG-vaccinatie kan het chromatine makkelijker worden afgelezen waardoor bij een tweede infectie de

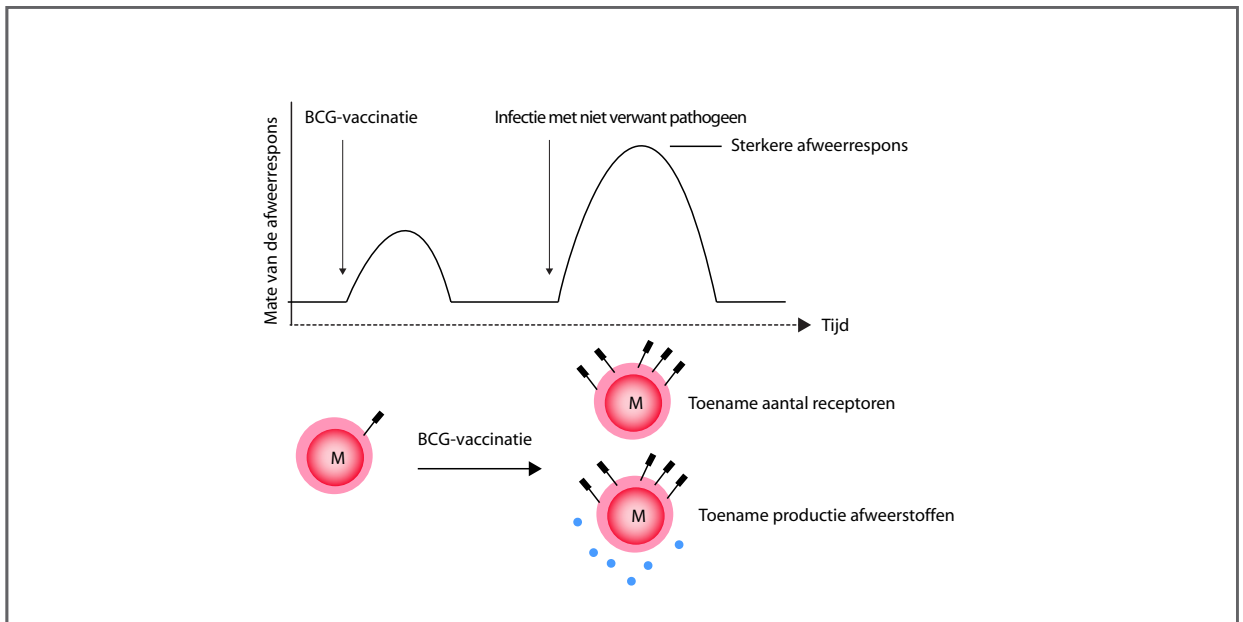
cellen van het aangeboren immuunsysteem sneller en sterker kunnen reageren, ongeacht het type pathoog. Naast epigenetische modificaties spelen veranderingen in het metabolisme van de cel een belangrijke rol [6]. Deze effecten zijn tot ten minste één jaar na vaccinatie meetbaar [7]. Aangezien immunocellen zoals monocyt en neutrofielen slechts een aantal dagen in de bloedsomloop circuleren, zou dit betekenen dat BCG veranderingen induceert op het niveau van de stamcellen in het beenmerg. Studies hebben inderdaad bevestigd dat BCG epigenetische en metabole veranderingen induceert in de stamcellen en in de myeloïde voorlopercellen in het beenmerg van de mens. Dit verklaart hoogstwaarschijnlijk de relatief lange duur van de door BCG geïnduceerde effecten op immunocellen in de circulatie [8,9].

### Klinische effecten

#### Effecten bij kinderen

De niet-specifieke effecten van het BCG-vaccin hebben belangrijke klinische gevolgen. Vlak na de introductie van het BCG-vaccin merkte de Zweedse

**Figuur 1.** Schematische weergave van de door BCG geïnduceerde getrainde immuniteit.



M = macrofaag

arts Carl Naeslund op dat de neonatale sterfte na de introductie van het BCG-vaccin met meer dan 50 procent daalde, een afname die niet kon worden verklaard door een daling van het aantal doden ten gevolge van tuberculose [10]. Dit opmerkelijke resultaat werd later bevestigd in verschillende epidemiologische studies in Europa, Noord- en Zuid-Amerika, en later in gerandomiseerde klinische onderzoeken in Afrika. Uit deze studies bleek dat kinderen die direct na de geboorte met BCG worden gevaccineerd een betere overleving hebben vanwege met name lagere sterfte door luchtweginfecties (anders dan tuberculose) en sepsis [11,12].

In een andere studie, uitgevoerd in Guinee-Bissau, werd gevonden dat BCG de incidentie verlaagt van luchtweginfecties als gevolg van het respiratoir syncytieel virus (RSV) [13]. Daarnaast zijn er aanwijzingen dat BCG bescherming kan bieden tegen parasitaire infecties. Bij kinderen onder de vijf jaar woonachtig in landen ten zuiden van de Sahara is BCG-vaccinatie geassocieerd met een verminderde malariaprevalentie [14].

Dergelijke positieve effecten van BCG op de incidentie van infecties bij kinderen werden niet gevonden in een grootschalig onderzoek uitgevoerd onder 4262 kinderen in Denemarken. Ten opzichte van niet-BCG-gevacceerde kinderen verlaagde BCG-vaccinatie bij de geboorte in deze studie niet het aantal gerapporteerde infecties en het aantal ziekenhuisopnames in het eerste levensjaar [15,16]. Verdere subgroepanalyses toonden aan dat BCG-vaccinatie van de moeder een rol speelt bij deze resultaten. Bij kinderen van BCG-gevacceerde moeders werden minder infecties gerapporteerd in de eerste drie maanden na de geboorte (incidence rate ratio 0,62; 95% BI 0,39-0,98) en werden de kinderen minder vaak vanwege infecties in het ziekenhuis opgenomen (hazardratio 0,65; 95% BI 0,45-0,94). Een andere grote gerandomiseerde studie die momenteel loopt in Australië geeft mogelijk meer inzicht in het effect van BCG bij kinderen in landen met hoge inkomens (MISBAIR, ClinicalTrials.gov NCT01906853). In deze studie zijn in totaal 1272 pasgeborenen bij de geboorte met BCG of een placebo gevaccineerd en wordt het effect van BCG op de incidentie van infecties, allergie en eczeem onderzocht.

### Effecten bij volwassenen

Over de niet-specifieke effecten van BCG bij

volwassenen is minder bekend. Vergelijkbare resultaten omtrent het effect van BCG op luchtweginfecties zijn echter ook gerapporteerd bij volwassenen. In een klinisch onderzoek in Indonesië werden personen tussen de 60 en 75 jaar oud voor drie opeenvolgende maanden gevaccineerd met BCG, de controlegroep ontving een placebo. Het aantal bovensteluchtweginfecties was significant lager in de BCG-groep [17]. Onderzoek bij 155 ouderen die verbleven in een verpleeghuis in Japan suggereert dat BCG-vaccinatie het risico op een pneumonie verlaagt [18]. In deze studies werd geen onderscheid gemaakt tussen infecties van virale of bacteriële oorsprong. Daarnaast is er recent een gerandomiseerd klinisch onderzoek uitgevoerd in Griekenland, waarin het effect van BCG-vaccinatie op de ontwikkeling van luchtweginfecties bij ouderen is onderzocht [19]. In dit onderzoek ontvingen 198 deelnemers met een leeftijd boven de 60 jaar op de dag van hun ontslag uit het ziekenhuis het BCG-vaccin of een placebo en werden ze vervolgens gedurende één jaar gevolgd. In de placebogroep ontwikkelde 42 procent een nieuwe infectie, in de BCG-groep was dit 25 procent. De sterkste bescherming in de BCG-groep was tegen luchtweginfecties van vermoedelijk virale origine (hazardratio 0,21,  $p = 0,013$ ). Deze effecten waren geassocieerd met een fenotype passend bij getrainde immuniteit, gekenmerkt door epigenetische modificaties en een toename in de productie van pro-inflammatoire cytokines. Naast het effect op luchtweginfecties zijn beschermende effecten van BCG-vaccinatie tegen infecties veroorzaakt door hsv en hpv beschreven [20-22]. Vanwege het beperkte aantal studies en de relatief kleine onderzoeksgroepen is verder onderzoek naar de klinische effecten van BCG-vaccinatie bij volwassenen nodig.

### Direct bewijs

In twee onderzoeken waarin gebruik werd gemaakt van gecontroleerde infectiemodellen werd aangetoond dat door BCG geïnduceerde getrainde immuniteit daadwerkelijk bijdraagt aan een betere bescherming tegen andere infecties. In de eerste studie werden gezonde volwassenen gevaccineerd met het BCG-vaccin of een placebo [23]. Een maand later ontvingen alle deelnemers het gelekoortsvaccin als een model voor een virale infectieziekte. De deelnemers die met BCG waren gevaccineerd, hadden na toediening van het gelekoortsvaccin, waarmee verzwakt virus in de

circulatie wordt geïntroduceerd, minder circulerend virus in het bloed in vergelijking met de placebogroep. De lagere viremie was geassocieerd met een toename in de productie van pro-inflammatoire cytokines na BCG-vaccinatie. Er werd geen verschil waargenomen tussen beide groepen in de hoeveelheid neutraliserende antistoffen tegen gele koorts. In een tweede gecontroleerde studie met twintig gezonde vrijwilligers, kregen de deelnemers het BCG-vaccin toegediend of een placebo. Alle deelnemers werden vijf weken later volgens een gecontroleerd infectiemodel geïnfecteerd door met *Plasmodium falciparum* besmette muggen. Bij de helft van de BCG-gevaccineerde vrijwilligers was de immuunrespons van monocyten en NK-cellen sterker en geassocieerd met een lagere parasitemie [24]. Deze in-vivo-onderzoeken suggereren dat hoe beter het aangeboren immuunsysteem is getraind door BCG, hoe sterker de reactie van het lichaam op een tweede infectieziekte.

### Verhoogde productie van antistoffen

Tot slot hebben studies aangetoond dat BCG ook van invloed kan zijn op de productie van antistoffen bij toekomstige vaccinaties. In een studie naar het effect van BCG op de immuunrespons tegen influenza werden gezonde personen gevaccineerd met BCG (n = 20) of placebo (n = 20) [25]. Twee weken later ontvingen alle deelnemers het trivalente influenzavaccin dat in dat jaar gebruikt werd. De BCG-groep ontwikkelde een grotere hoeveelheid antistoffen tegen de A(H1N1)pdm09-component van het influenzavaccin, maar niet tegen de beide andere componenten (A(H3N2) en B/2012). Een effect van BCG op de toename van geproduceerde antistoffen is ook beschreven voor andere vaccins, zoals het hepatitis B-vaccin en het pneumokokkenvaccin [26,27].

### BCG en Covid-19

Gezien de effecten van het BCG-vaccin op (virale) infecties, ontstond al vroeg na de uitbraak van de Covid-19-pandemie de vraag of BCG ook bescherming kan bieden tegen Covid-19. Er zijn verschillende ecologische studies gepubliceerd waarin een correlatie wordt gerapporteerd tussen vroege BCG-vaccinatie en Covid-19-gerelateerde morbiditeit en mortaliteit. In landen waar BCG-vaccinatie onderdeel is van het standaard vaccinatieprogramma, is de incidentie van Covid-19 en de mortaliteit lager dan in landen waarin BCG geen onderdeel uitmaakt van het

vaccinatieprogramma [28-30]. Deze studies kennen echter methodologische beperkingen en zijn gevoelig voor bias. Zo toonde een andere studie aan dat er geen significant verschil was tussen de landen wanneer er gecorrigeerd werd voor het aantal testen [31]. Inmiddels zijn er verschillende ecologische studies gepubliceerd die geen correlatie tussen vroege BCG-vaccinatie en Covid-19 aantonen [32,33].

Terwijl de ecologische studies tegenstrijdige resultaten opleveren, suggereren de resultaten van een nog niet gepubliceerde gerandomiseerde klinische studie dat recente BCG-(re)vaccinatie mogelijk bescherming kan bieden tegen Covid-19. In een Grieks cohort bestaande uit volwassenen boven de 50 jaar met diverse vormen van comorbiditeit (n = 190) was BCG-revaccinatie geassocieerd met een reductie van de incidentie van Covid-19 van 68 procent (oddsratio 0,32, 95% BI 0,13-0,79) [34].

Gerandomiseerde placebogecontroleerde klinische onderzoeken met grote aantallen deelnemers zijn uiteindelijk nodig om het effect van BCG-vaccinatie op het aantal SARS-CoV-2-infecties en het beloop van Covid-19 vast te stellen. Wereldwijd lopen er momenteel meer dan 15 studies die het effect van BCG op Covid-19 onderzoeken (ClinicalTrials.gov). In Nederland zijn er drie placebogecontroleerde klinische onderzoeken gestart waarin het effect van BCG bij zorg-personeel, gezonde ouderen en ouderen met comorbiditeit (ClinicalTrials.gov NCT04417335, NCT04328441, NCT04537663) wordt onderzocht. Ook met de komst van effectieve Covid-19-specifieke vaccins zijn de uitkomsten van deze studies relevant. In de landen waar Covid-19-specifieke vaccins nog niet voorhanden zijn zou BCG-vaccinatie, bij gebleken effectiviteit, de periode kunnen overbruggen tot er Covid-19-specifieke vaccins beschikbaar zijn.

Daarnaast is de duur van de vaccinatierepons en de mate waarin de respons beïnvloed wordt door leeftijd en de aanwezigheid van comorbiditeit grotendeels onbekend. Verschillende studies hebben echter al aangetoond dat de bescherming van de Covid-19 specifieke vaccins na verloop van tijd sterk afneemt [35,36]. BCG-vaccinatie in combinatie met een Covid-19-specifiek vaccin versterkt mogelijk de immuunrespons en zou potentieel de duur van de beschermende vaccinatierepons kunnen verlengen.

### Conclusie

Het BCG-vaccin is al 100 jaar in gebruik ter bescher-



ming tegen tuberculose. De laatste jaren is er meer aandacht gekomen voor de niet-specifieke bescherming van het BCG-vaccin tegen infectieziekten die niet door mycobacteriën worden veroorzaakt. Bovendien is er meer duidelijkheid ontstaan over de onderliggende mechanismen die bijdragen aan de niet-specifieke beschermende effecten.

Hoewel er grote vooruitgang is geboekt, is verder onderzoek nodig. Gerandomiseerde placebogecontroleerde studies met grote aantallen deelnemers zijn noodzakelijk om de werkzaamheid van BCG op de incidentie en het beloop van infecties, waaronder Covid-19, bij volwassenen te beoordelen. Daarnaast zijn vervolgstudies nodig waarin onderzocht wordt hoe het effect van BCG-geïnduceerde getrainde immuniteit vergroot kan worden. De uitkomsten van deze studies leiden mogelijk tot nieuwe klinische toepassingen om infectieziekten te voorkomen en/of de ernst van infectieziekten te verminderen.

## Referenties

1. Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006;367:1173-80.
2. Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, et al. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*. 2014;58:470-80.
3. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109:17537-42.
4. Moorlag SJCFM, Rodriguez-Rosales YA, Gillard J, et al. BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. *Cell reports*. 2020;33:108387-.
5. Netea MG, Dominguez-Andres J, Barreiro LB, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020;20:375-88.
6. Arts RJW, Carvalho A, La Rocca C, et al. Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity. *Cell Rep*. 2016;17:2562-71.
7. Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, et al. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *J Innate Immun*. 2014;6:152-8.
8. Cirovic B, de Bree LCJ, Groh L, et al. BCG Vaccination in Humans Elicits Trained Immunity via the Hematopoietic Progenitor Compartment. *Cell Host Microbe*. 2020;28:322-34.
9. Kaufmann E, Sanz J, Dunn JL, et al. BCG Educates Hematopoietic Stem Cells to Generate Protective Innate

Immunity against Tuberculosis. *Cell*. 2018;172:176-90.e19.

10. Naeslund C, Expérience de vaccination par le bcg dans la province du Norrbotten (Suède) *Revue de la Tuberculose*. 12:617-36.

11. Aaby P, Roth A, Ravn H, et al. Randomized trial of BCG vaccination at birth to low-birth-weight children: beneficial nonspecific effects in the neonatal period? *J Infect Dis*. 2011;204:245-52

12. Biering-Sørensen S, Aaby P, Lund N, et al. Early BCG-Denmark and Neonatal Mortality Among Infants Weighing <math>\geq 2500\text{ g}</math>: A Randomized Controlled Trial. *Clin Infect Dis*. 2017;65:1183-90.

13. Stensballe LG, Nante E, Jensen IP, et al. Acute lower respiratory tract infections and respiratory syncytial virus in infants in Guinea-Bissau: a beneficial effect of BCG vaccination for girls community based case-control study. *Vaccine*. 2005;23:1251-7.

14. Berendsen ML, van Gijzel SW, Smits J, et al. BCG vaccination is associated with reduced malaria prevalence in children under the age of 5 years in sub-Saharan Africa. *BMJ Global Health*. 2019;4:e001862.

15. Stensballe LG, Sørup S, Aaby P, et al. BCG vaccination at birth and early childhood hospitalisation: a randomised clinical multicentre trial. *Archives of disease in childhood*. 2017;102:224-31.

16. Kjaergaard J, Birk NM, Nissen TN, et al. Nonspecific effect of BCG vaccination at birth on early childhood infections: a randomized, clinical multicenter trial. *Pediatric Research*. 2016;80:681-5.

17. Wardhana, Datau EA, Sultana A, et al. The efficacy of Bacillus Calmette-Guerin vaccinations for the prevention of acute upper respiratory tract infection in the elderly. *Acta Medica Indonesiana*. 2011;43:185-90.

18. Ohru T, Nakayama K, Fukushima T, et al. Prevention of elderly pneumonia by pneumococcal, influenza and BCG vaccinations. *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 2005;42:34-6.

19. Giamarellos-Bourboulis EJ, Tsiilika M, Moorlag S, et al. Activate: Randomized Clinical Trial of BCG Vaccination against Infection in the Elderly. *Cell*. 2020;183:315-23.

20. Anderson FD, Ushijima RN, Larson CL. Recurrent herpes genitalis. Treatment with Mycobacterium bovis (BCG). *Obstet Gynecol*. 1974;43:797-805.

21. Hippmann G, Wekkeli M, Rosenkranz AR, et al. Nonspecific immune stimulation with BCG in Herpes simplex recidivans. Follow-up 5 to 10 years after BCG vaccination. *Wiener klinische Wochenschrift*. 1992;104:200-4.

22. Podder I, Bhattacharya S, Mishra V, et al. Immunotherapy in viral warts with intradermal Bacillus Calmette-Guerin vaccine versus intradermal tuberculin purified protein derivative: A double-blind, randomized controlled trial comparing effectiveness and safety in a tertiary care center in Eastern India. *Indian J Dermatol, Venereol Leprol*. 2017;83:411.

23. Arts RJW, Moorlag S, Novakovic B, et al. BCG Vaccination Protects against Experimental Viral Infection in Humans through

the Induction of Cytokines Associated with Trained Immunity. *Cell Host Microbe*. 2018;23:89-100 e5.

24. Walk J, de Bree LCJ, Graumans W, et al. Outcomes of controlled human malaria infection after BCG vaccination. *Nat Commun*. 2019;10:874.

25. Leentjens J, Kox M, Stokman R, et al. BCG Vaccination Enhances the Immunogenicity of Subsequent Influenza Vaccination in Healthy Volunteers: A Randomized, Placebo-Controlled Pilot Study. *J Infect Dis*. 2015;212:1930-8.

26. Ota MO, Vekemans J, Schlegel-Haueter SE, et al. Influence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin on antibody and cytokine responses to human neonatal vaccination. *J Immunol*. 2002;168:919-25.

27. Ritz N, Mui M, Balloch A, et al. Non-specific effect of Bacille Calmette-Guerin vaccine on the immune response to routine immunisations. *Vaccine*. 2013;31:3098-103.

28. Berg MK, Yu Q, Salvador CE, et al. Mandated Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination predicts flattened curves for the spread of COVID-19. *Sci Adv*. 2020;6(32):eabc1463.

29. Ozdemir C, Kucuksezer UC, Tamay ZU. Is BCG vaccination affecting the spread and severity of COVID-19? *Allergy*. 2020;75:1824-7.

30. Escobar LE, Molina-Cruz A, Barillas-Mury C. BCG vaccine protection from severe coronavirus disease 2019 (COVID-19).

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2020;117:17720-6.

31. Hensel J, McAndrews KM, McGrail DJ, et al. Protection against SARS-CoV-2 by BCG vaccination is not supported by epidemiological analyses. *Scientific Reports*. 2020;10:18377.

32. Hamiel U, Kozler E, Youngster I. SARS-CoV-2 Rates in BCG-Vaccinated and Unvaccinated Young Adults. *Jama*. 2020;323:2340-1.

33. de Chaisemartin C, de Chaisemartin L. Bacille Calmette-Guérin Vaccination in infancy does not protect against coronavirus disease 2019 (COVID-19): Evidence from a natural experiment in Sweden. *Clin Infect Dis*. 2021;72:e501-e5.

34. Tsilika M, Taks E, Dolianitis K, et al. Activate-2: a double-blind randomized trial of bcg vaccination against covid19 in individuals at risk. *Medrxiv*. 2021:2021.05.20.21257520.

35. Pouwels KB, Pritchard E, Matthews PC, et al. Effect of Delta variant on viral burden and vaccine effectiveness against new SARS-CoV-2 infections in the UK. *Nature Medicine*. 2021;27:2127-35.

36. Goldberg Y, Mandel M, Bar-On YM, et al. Waning Immunity after the BNT162b2 Vaccine in Israel. *N Eng J Med*. 2021;385:e85.

# Ontwikkelingen in tuberculoseonderzoek

## De rol van zebravissen en nieuwe genetische technieken

Doortje Heemskerk, Coen Kuijl, Wilbert Bitter

### Samenvatting

Hoewel er in de afgelopen jaren enkele nieuwe middelen voor de behandeling van tuberculose (tbc) en meer sensitieve diagnostiek van tbc zijn bijgekomen, zijn er nog steeds belangrijke stappen te nemen. Gelukkig zijn er veel interessante bevindingen uit fundamenteel en toegepast onderzoek, op het gebied van pathogenese, diagnostiek en behandeling, die uiteindelijk moeten leiden tot het stoppen van deze voortdurende pandemie. In het Amsterdam UMC wordt veel onderzoek gedaan naar potentieel nieuwe middelen, gebruikmakend van het relatief jonge zebrafisemodel. Gentechnieken, zoals het recent ontwikkelde CRISPR/Cas9 en CRISPRi leveren een enorme winst in tijd en kosten op in de studie naar zowel pathogeen als gastheer. De impact van deze vernieuwingen op het onderzoek naar tbc en daarmee de zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen wordt in dit artikel uiteengezet.

### Abstract

Although we do have some new antimycobacterial drugs and new, more sensitive diagnostics, new findings from fundamental and applied research are urgently required to aid in the combat of this ongoing pandemic. Fortunately, promising new developments in fundamental and applied research may lead to improvements in diagnosis and treatment and our understanding of pathogenesis, and ultimately the end of the tuberculosis pandemic. The mycobacterial research unit in the Amsterdam UMC has focused on the identification of new potential antimycobacterial targets, using the relatively recent zebrafish model. Genetic techniques, such as the recently developed CRISPR/Cas9 and CRISPRi are a major advance in host and pathogen research. Moreover, this zebrafish model and these new genetic techniques can be combined to form a very powerful research tool. The impact of these novelties in tuberculosis research and drug discovery will be discussed in the following article.

### Introductie

*“Geen onaangenamer onderzoek voor den microbioloog dan die van den tuberkelbacil. De herkomst omslachtig, vaak onzeker; de vindplaats weezinwekkend, tot medelijden stemmend; de algemeenheid schrikbarend; de biologische eigenschappen niet leerrijk, de vorm gewoon, de afmetingen tegelijk te klein en te groot om interessant te zijn, de systematische verwantschap twijfelachtig, de groei traag, de cultuur moeilijk en langzaam; de somtijds noodzakelijke proeven op dieren uit hun aard treurig, en, geheel ten onrechte, door een deel van het publiek afgekeurd en veracht; de therapie, trots reusachtig onderzoek onvolkomen, en vol teleurstelling voor de beste navorschers.”* (M.W. Beijerinck, Het Gulden Boek voor de Tuberculeuse kinderen, 1908)

Hoe kijkt de microbioloog, nu de arts-microbioloog, ruim een eeuw later, naar de studie van *Mycobacterium tuberculosis (Mtb)*? Er zijn nog altijd grote lacunes in de bestrijding van tuberculose (tbc): een goed werkend vaccin ontbreekt, in de laatste 60 jaar is er slechts een beperkt aantal nieuwe therapeutische middelen bijgekomen - de sensitiviteit van diagnostiek laat nog steeds te wensen over en het is lastig te voorspellen welke 5 tot 10 procent van de (latent) geïnfecteerde patiënten een actieve infectie zal ontwikkelen. In dit overzichtsartikel beschrijven wij een aantal belangrijke ontwikkelingen die een optimistischer beeld geven van het fundamentele onderzoek naar tbc, en het belang daarvan voor de pijlers van bestrijding: vaccinatie, diagnostiek en behandeling.

Amsterdam UMC, afdeling Medische Microbiologie en Infectie Preventie, locatie AMC, dr. A.D. Heemskerk, aios medische microbiologie; locatie VU Medisch Centrum, dr. C. Kuijl, prof. dr. W. Bitter, die tevens verbonden is aan de afdeling Moleculaire Microbiologie, Amsterdam Institute of Molecular and Life Sciences (AIMMS), Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam. Correspondentieadres: dr. A.D. Heemskerk (a.heemskerk@amsterdamumc.nl).

### Diermodellen in tuberculoseonderzoek

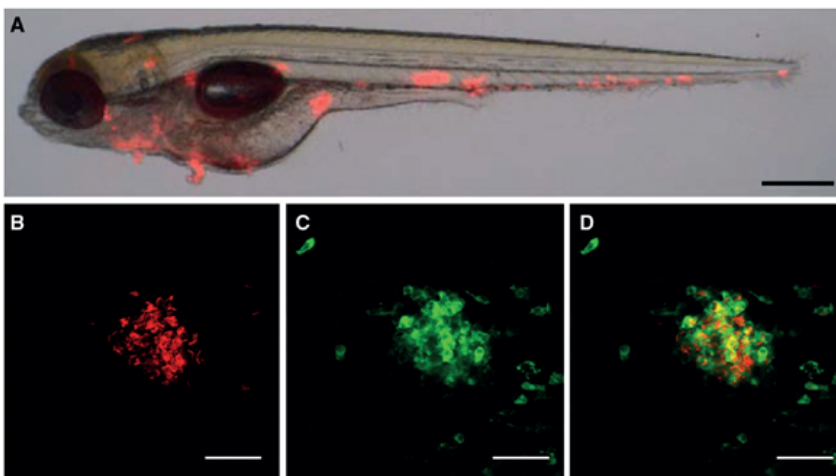
Hoe 'treurig' ook, diermodellen hebben een essentiële bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van diagnostiek, vaccins en geneesmiddelen. Hoewel muizen vaak het favoriete diermodel zijn - gezien de relatief lage kosten en overeenkomstige immunologie aan de mens - is het nadeel bij tbc-onderzoek dat de meeste muizen geen typische kenmerken vertonen zoals granuloomvorming en necrose, in tegenstelling tot cavia's en konijnen [1]. Ter illustratie: aan het begin van de twintigste eeuw werden diagnostische kweken op *Mtb* gedaan bij cavia's, door het specimen (sputum, pus, urine of lumbaalvocht) subcutaan in te spuiten en af te wachten of het kenmerkende ziekteverloop zou optreden. Aangezien dit veel tijd in beslag nam, heeft Charlotte Ruys in 1938 deze kweekmethode vergeleken met die op de recent ontwikkelde vaste voedingsbodems van Löwenstein en Jensen. Zij concludeerde dat de caviakweek wel iets sensitiever en specifiek was, maar dat het wenselijk was beide methoden in te zetten om sneller tot een diagnostische conclusie te komen [2]. Cavia's en konijnen hebben dus wel een pathofysiologie die overeenkomt met die van mensen, maar zijn duurder en er zijn minder immunologische reagentia aanwezig om deze respons goed te bestuderen [1]. Niet-humane primaten, zoals de makaak, zijn immunologisch het meest verwant aan de mens en het gebruik ervan heeft geleid tot belangrijke doorbraken in tbc-onderzoek; infectie bij deze dieren kan gedetailleerd gevolgd worden met PET/CT. Hieruit is gebleken dat progressie van tuberculose een zeer variabel beloop heeft, waarbij de

lokale immuunrespons doorslaggevend is voor het ziekteproces [3]. Ook blijkt uit onderzoek bij makaken dat mucosale bcg-vaccinatie een veel betere bescherming geeft tegen tbc dan de gebruikelijke intradermale vaccinatie [4]. Het gebruik van makaken is echter ethisch bezwaarlijk en ook zeer kostbaar. Dierproeven worden nog steeds door een deel van de bevolking veracht en kosten daarbij veel tijd vanwege de langzame groei van *Mtb*. Er is dus behoefte aan een aanvullend model dat snel, goedkoop, flexibel, ethisch verantwoord en immunologisch valide is.

### Zebravissen als diermodel

Sinds begin van deze eeuw zijn zebravissen (*Danio rerio*) succesvol gebleken als diermodel in de studie naar infectieziekten. Ondanks de afwezigheid van longen en de koudbloedige constitutie van de vis, is tbc een ziekte die hierin goed onderzocht kan worden [5]. Infectie met *Mtb* leidt niet tot ziekte bij koudbloedige dieren, maar infectie met *Mycobacterium marinum* (*Mmar*) veroorzaakt een systemische op tbc lijkende ziekte bij zebravissen [6] (figuur 1).

Zebravissen reproduceren snel (tot wel 300 eitjes per week), zijn in grote hoeveelheden te onderhouden en in het larvestadium zijn ze transparant. Dat maakt dat gastheer-pathogeeninteracties in vivo te volgen zijn. In de eerste weken van de ontwikkeling hebben zebravissen alleen een aangeboren afweersysteem. Het adaptieve immuunsysteem ontwikkelt zich later, zodat beide systemen apart van elkaar bestudeerd kunnen worden [7]. Alle componenten van het aangeboren en adaptieve immuunsysteem van de



**Figuur 1.** Vroege granuloomvorming in zebravisslarven (met toestemming overgenomen uit ref. 6).

A. Zebravisslarve geïnfecteerd met rood fluorescerende *Mmar* vijf dagen na infectie. B-D. Hogere vergroting van beginnende granulomen. B. *Mmar* in rood. C. Fagocyten (L-plastine gelabeld) in groen. D. Samengevoegde beelden om co-localisatie van bacteriën met fagocyten te tonen. (Schaal: witte streep = 35µm).

mens zijn aanwezig in het genoom van de zebravis (7). Van ongeveer 70 procent van alle humane genen is een ortholoog in de zebravis aanwezig [8]. Een groeiende beschikbaarheid van transgene lijnen en het gebruik van knockdownvarianten met behulp van CRISPR/Cas9-technieken maken het een enorm flexibel model waarbij cellulaire processen in detail in beeld gebracht kunnen worden [9].

### *Mycobacterium marinum als modelpathogeen*

*Mmar* is genetisch zeer verwant aan *Mtb*; beide bacteriën delen 3.000 orthologen, hebben overeenkomstige virulentiemechanismen en beide zijn voornamelijk terug te vinden in geïnfecteerde macrofagen [10]. Tevens veroorzaakt *Mmar* ziekte bij de mens, maar gezien de voorkeurstemperatuur van 30 tot 33°C, blijven de granulomateuze laesies beperkt tot de huid. Dit geeft dan aanleiding tot aquarium- of zwembadgranuloom. Bij immuungecompromitteerde patiënten (die met name TNF $\alpha$ -remmers en steroïden gebruiken) zijn gedissemineerde infecties gerapporteerd, met granuloomvorming in verschillende orgaansystemen, radiologisch en histo-pathologisch vergelijkbaar met (extra pulmonale) tbc [11]. Gezien het ziektebeeld bij vissen en de overleving in (humane) macrofagen lijkt de temperatuur de voornaamste reden waarom *Mmar* geen groter probleem vormt. Een groot voordeel is de tijdwinst die het gebruik van *Mmar* als pathogeen oplevert. Dankzij de *Mmar*-varianten die fluorescerende eiwitten tot expressie brengen, zijn infecties met *Mmar* (verdubbelingstijd 4 tot 6 uur ten opzichte van 20 tot 24 uur voor *Mtb*) bij de zebravislarve al na enkele dagen zichtbaar [6]. Mycobacteriën kunnen in verschillende stadia en via meerdere routes geïnjecteerd worden (6). Door gebruik te maken van specifieke mutanten kunnen zebravissen ook latent geïnfecteerd raken [12].

## Onderzoek naar tuberculose bij zebravissen

Wat heeft het zebravismodel ons geleerd over tbc?

### *Fagosoomescape*

Met behulp van het *Mmar*-zebravismodel zijn de afgelopen decennia nieuwe gastheer-pathogeen-interacties ontrafeld. De eerste was al meteen spectaculair; vrij snel werd aangetoond dat *Mmar* na opname in de macrofaag op den duur ontsnapt aan het fagosoom binnen in de macrofaag en hiermee dus ontkomt aan intracellulaire doding [13]. Dit was nieuw

en aanleiding voor tbc-onderzoekers om het model niet serieus te nemen. Enkele jaren later liet Nicole van der Wel echter zien dat ook *Mtb* ontsnapt, zij het iets later in de infectiecyclus, waardoor een dogma in het tbc-veld omver werd geworpen [14]. In beide bacteriën was hiervoor hetzelfde eiwitsecretiesysteem nodig, dat nu bekend is onder de naam ESX-1 [14]. Dit systeem ontbreekt in het tuberculosevaccin BCG en is deels verantwoordelijk voor de attenuatie [15].

### *Granuloomvorming*

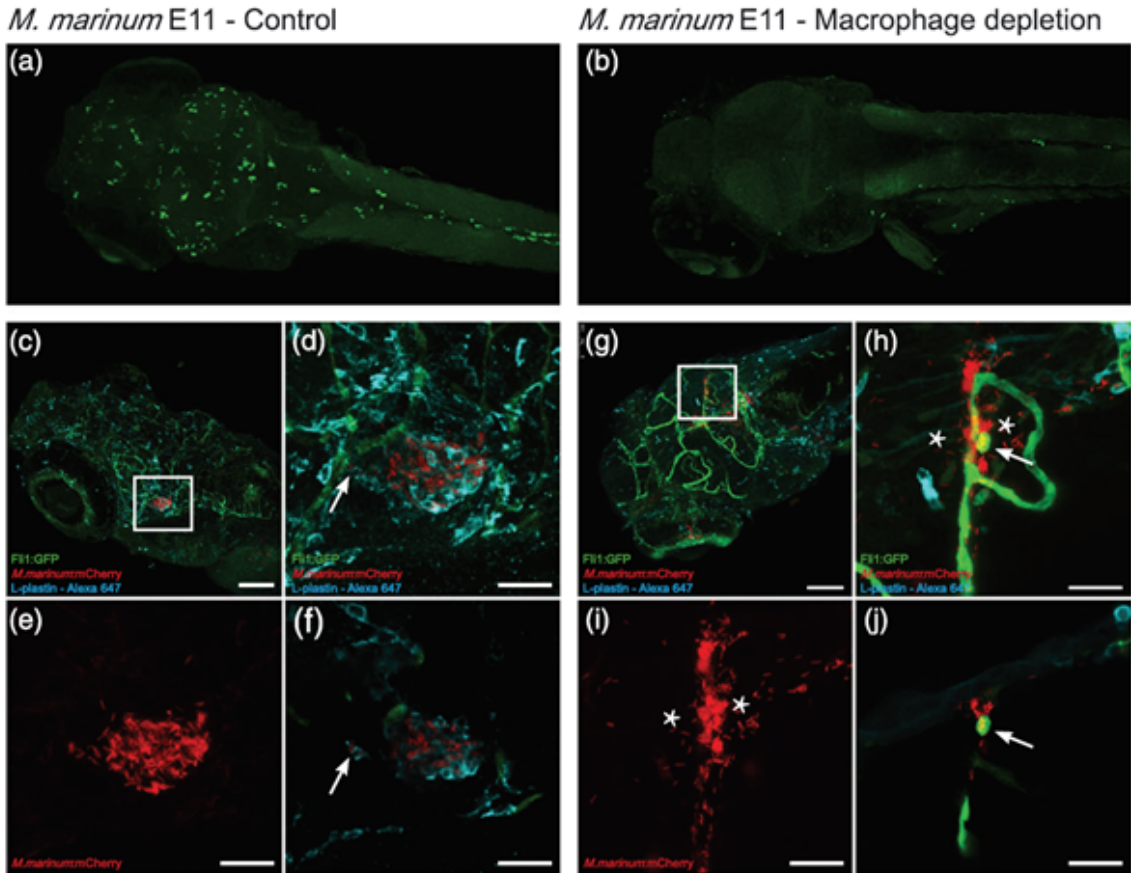
De formatie van granulomen, het kenmerk van tbc, kan door visualisatie op celniveau in de zebravis gedetailleerd in kaart gebracht worden. Zo blijkt granuloomvorming een zeer dynamisch proces te zijn dat mede wordt gedreven door virulentiefactoren van de mycobacterie, waaronder het ESX-1-secretiesysteem. Virulentiefactoren van het ESX-1-systeem interageren met gastheer matrix-metallo-proteïnase9 (MMP9) en zijn zo van invloed op granuloomvorming [16]. Granuloomvorming komt al snel na de infectie op gang, zelfs in zebravislarven die nog geen adaptief immuunsysteem hebben. Initiële granuloomvorming is dus niet afhankelijk van T-cellen, zoals lang gedacht werd. Granulomen dienen om mycobacteriën in te kapselen en verdere verspreiding te voorkomen. Ze vormen ook een proliferatieniche voor bacteriën. Bij zebravissen is aangetoond dat vooral in de vroege fase van granuloomvorming het aangeboren immuunsysteem door mycobacteriën geëxploiteerd wordt voor verdere verspreiding [17].

### *Mycobacteriële passage van de bloed-hersenbarrière*

Tuberculeuze meningitis is de dodelijkste vorm van tbc. Bij zebravissen kan *Mmar* ook het centraal zenuwstelsel infecteren [18]. In Amsterdam is in beeld gebracht dat mycobacteriën via diverse routes de bloed-hersenbarrière kunnen passeren: meeliftend in macrofagen ('Trojan horse'-methode) of als vrije bacteriën via opname en groei in endotheelcellen. Opvallend was dat in afwezigheid van macrofagen 'vrije' passage via de endotheelcellen afhankelijk was van opnieuw een functioneel ESX-1-secretiesysteem. Deze vrije passage ging gepaard met vasculitis (zie figuur 2) [19]. Vasculitis is een kenmerkend pathologisch verschijnsel bij tbc-meningitis bij mensen en ligt ten grondslag aan de intracraniale pathologie en morbiditeit van de ziekte [20].



**Figuur 2.** Mycobacteriële passage van de bloed-hersenbarriere (met toestemming overgenomen uit ref. 19). Wildtype *M. marinum* kan nog steeds hersenweefsel infecteren bij afwezigheid van macrofagen.



Het linkerpaneel laat onbehandelde zebrafislarve zien (controle) en het rechterpaneel laat behandelde zebrafislarve zien, waarbij de macrofagen zijn uitgedund.

(a) Controlelarve 5 dpf, waarbij macrofagen in groen te zien zijn (anti-L-plastine gelabeld). (b) Behandelde larve 5 dpf, waarbij macrofagen uitgedund zijn. (c) Dorsale opname van een Fli1:GFP-larve, dit is een transgene lijn waarbij de vasculatuur groen fluorescerend is, op 5 dpi, met *M. marinum* (rood) en macrofagen in blauw (anti-L-plastine gelabeld). Hier is vroege granuloomvorming zichtbaar. (d) Uitvergroting van witte vak in (c), om lokalisatie van *M. marinum* en macrofagen preciezer in beeld te brengen. (e) Corresponderend rood fluorescent kanaal om distributie van *M. marinum* te zien. (f) In aanwezigheid van macrofagen verlaat *M. marinum* (rood gekleurd) het bloedvat (groen) in fagocyten (blauw) (aan pijlpunt is een losse macrofaag zichtbaar) en vormt vroege granulomen in hersenweefsel. Schaal afbeelding c = 100  $\mu$ m, schaal afbeelding d t/m f = 25  $\mu$ m. (g) Dorsale opname van macrofagen (in blauw, anti-L-plastine gelabeld) gedepleteerde Fli1:GFP larve, na systemische infectie met *M. marinum* (rood). Het wit-omkaderde gebied is uitvergroot in afbeelding h, i en j. (h). In afwezigheid van fagocyterende cellen zijn er mycobacteriën zichtbaar buiten de bloedvaten. Er is een suggestie dat mycobacteriën zich in endotheelcellen bevinden (\*). (i) Corresponderende rode kanaal laat weefselinfiltratie zien dat de distributie van de bloedvaten volgt. (j) Intracellulair fenotype van *M. marinum* co-lokalisatie met een bloedvat, in afwezigheid van macrofagen. Schaal afbeelding g = 100  $\mu$ m, schaal h t/m j = 25  $\mu$ m.

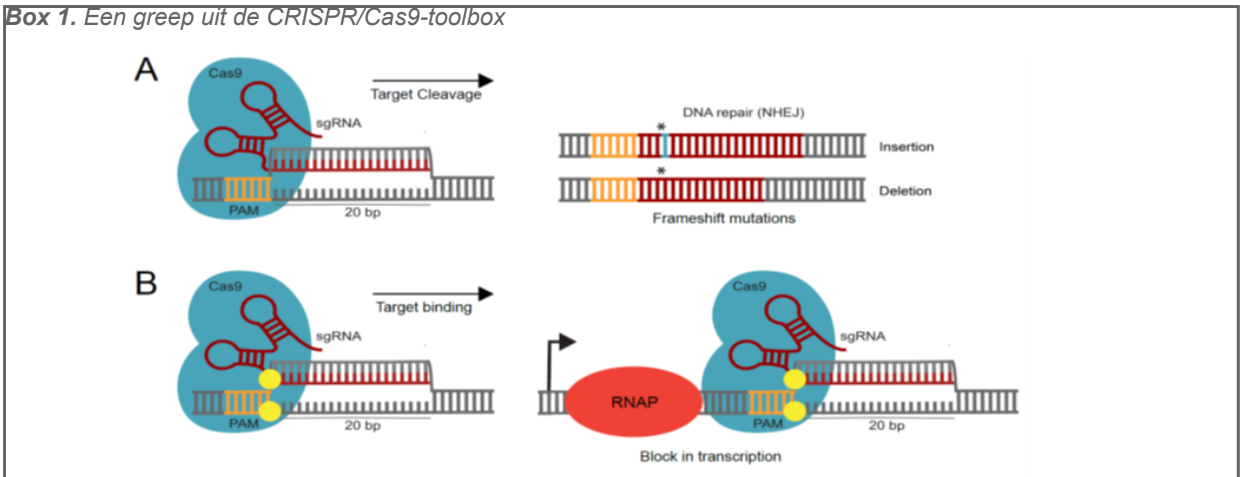
Dpf = days post fertilisation (aantal dagen na bevruchting), dpi = days post infection (aantal dagen na infectie).

### Translationeel onderzoek

Een bijzonder voorbeeld van hoe bevindingen bij zebrafissen vertaald kunnen worden naar klinisch onderzoek, is de ontdekking van de rol van de leukotriene-A4 hydrolase (LTA4H)-locus van de gastheer. Door genetische screening van zebrafissen op vatbaarheid voor infectie met Mmar bleken mutaties in het LTA4H-gen te leiden tot een hypergevoelig fenotype [21]. LTA4H is een enzym dat de balans reguleert tussen de pro- en anti-inflammatoire eicosanoïden (immuunregulerende hormonen), en is daarmee bepalend voor de geproduceerde hoeveelheid pro-inflammatoire tumornecrosefactor alfa (TNF- $\alpha$ ). Mutaties in de vis kunnen enerzijds leiden tot een hyperinflammatoir profiel met hoge TNF- $\alpha$ -productie, en anderzijds tot een hypo-inflammatoir profiel met lage TNF- $\alpha$ -productie; beide zijn geassocieerd met ernstiger infectie ten opzichte van een wildtype vis [21]. Bij patiënten met tbc-meningitis lijkt sprake te zijn van een vergelijkbaar beeld. In de normale bevolking komen mutaties (SNP's) in de

promotor van het LTA4H-gen voor en kan een onderverdeling gemaakt worden tussen mensen met een gemiddelde, hoge en lage LTA4H-productie, analoog aan de mutaties bij zebrafissen. Bij Vietnamese patiënten met tbc-meningitis lijkt de uitkomst van aanvullende behandeling met dexamethason voor deze drie LTA4H-categorieën verschillend. Patiënten met een profiel passend bij hoge LTH4A-productie (circa 10 procent van de patiënten), hadden een disproportioneel betere overleving met dexamethason in vergelijking met de gemiddelde (circa 40 procent van de patiënten) en lage (circa 50 procent van de patiënten) LTA4H [22]. Dat zou betekenen dat adjuvante behandeling met dexamethason wellicht bij een minderheid van de patiënten tot relevante afname in mortaliteit leidt en mogelijk contraproductief is bij patiënten met een hypo-inflammatoir profiel. Deze bevindingen hebben geleid tot de opzet van een nieuwe gerandomiseerde studie, waarin LTA4H toegepast wordt als een marker voor behandelingsucces van dexamethason [23].

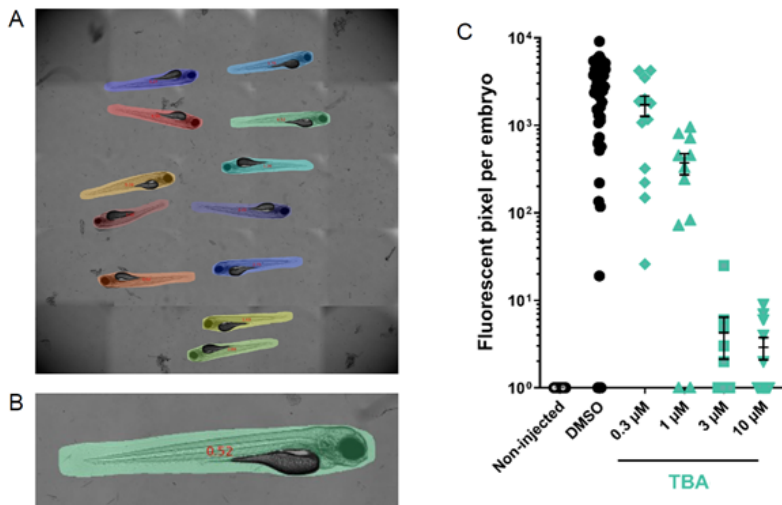
Box 1. Een greep uit de CRISPR/Cas9-toolbox



CRISPR-technologie een moleculaire genetische manipulatietechniek die kan worden toegepast in zowel prokaryoten als eukaryoten. Twee van de vele toepassingen worden hierboven afgebeeld.

(A) Met het wildtype Cas9-enzym is het mogelijk om het genoom met grote precisie aan te passen. Een RNA-molecuul (guide RNA of sgRNA), dat voor nagenoeg ieder targetgen ontworpen kan worden, vormt samen met het eiwit Cas9 (blauw) een complex dat precies knipt op de plek waar een deel van het RNA-molecuul complementair is aan het genoom (altijd in juxtapositie van een PAM-sequentie, in afbeelding oranje). Uiteindelijk leidt deze knipactiviteit tot een somatische mutatie, doordat het eigen DNA-reparatiemechanisme van de cel inserties of deleties veroorzaakt. De frameshiftmutaties leiden tot het elimineren van de genfunctie. (B) Ook is het mogelijk om de knipactiviteit van Cas9 te elimineren (dCas9) zodat het complex gebonden blijft aan het genoom en het RNA-polymerase (RNAP) verhindert RNA te maken voor eiwittranslatie. Deze techniek wordt CRISPRinterference (CRISPRi) genoemd.

**Figuur 3.** Automatische analyse van zebravislarvenplaatjes met behulp van deep learning (DL)-software.



A. Een masker (kleur) geeft de identificatie van de zebravis weer met behulp van DL. Iedere individuele vissenlarve krijgt een eigen masker, gebaseerd op de in DL gedefinieerde vorm van een zebravis. De getallen (in rood op de zebravislarven) geven de mate van infectie met fluoresceentiemycobacteriën aan, die gemeten wordt in een fluorescent kanaal (niet getoond).  
 B. Een vergrote weergave van één zebravislarve. De dooierzak (druppelvormig grijs oppervlak in de larve) wordt automatisch uitgesloten van analyse omdat deze autofluorescentie vertoont en dus niet meegeteld dient te worden.  
 C. Activiteit van de nieuwe inhibitor TBA, een aspartyl-tRNA synthetase (AspS) inhibitor (elk punt is een zebravislarve); fluorescentie (mate van infectie) neemt af bij toenemende concentraties TBA.

## Zoektocht naar nieuwe geneesmiddelen

### Doelwitidentificatie met CRISPRi

Rond de eeuwwisseling was target-based drug discovery (TBDD) de belangrijkste strategie om nieuwe antibiotica te ontdekken. Hierbij wordt een essentieel 'targeteiwit', een mogelijk doelwit voor nieuwe antibiotica, gezuiverd waarna een stof wordt gezocht die dit eiwit in vitro remt. Helaas is deze aanpak voor antibioticumontwikkeling vrij onsuccesvol gebleken [24]. Veel van de stoffen falen in vivo, bijvoorbeeld omdat ze niet de bacteriële membraan kunnen passeren of door effluxpomp uit de bacterie worden verwijderd. Daarnaast is de mate van inhibitie van het essentiële targeteiwit van belang. Eiwitten die bij geringe inhibitie al een duidelijke remming in groei laten zien zijn de meest interessante targets. Door genexpressie in bacteriën gecontroleerd te verlagen met CRISPRi (BOX 1, B) is het nu mogelijk om de beste targets te identificeren. Met deze methode hebben Bosch et al. [25] laten zien dat voor veel essentiële eiwitten bijna 100 procent inhibitie nodig is voordat groei wordt geremd, wat betekent dat dit geen goede antibioticumtargets zijn. Het meest interessant voor TBDD zijn de eiwitten die slechts deels geremd hoeven te worden voor groeionderbreking. In tegenstelling tot

TBDD kan met behulp van dezelfde methode ook een onbekend target gevonden worden voor een nieuwe werkzame stof. Men kan een mycobacteriële bank maken waarin de expressie van alle potentiële targets met behulp van CRISPRi verlaagd wordt (hypomorf). Wanneer een specifieke hypomorf gevoeliger is voor de nieuwe stof, acteert deze stof zeer waarschijnlijk op het gen met de verlaagde expressie of een gen met een verwante functie.

### In vivo naar geneesmiddelen zoeken

Hoewel bovengenoemde fenotypische onderzoeken een stap in de goede richting zijn, zijn er nog andere hindernissen te nemen voor de doorontwikkeling van nieuwe antimicrobiële middelen. Om de werking en toxiciteit in vivo te controleren, is weer de zebravis interessant, gebruikmakend van de voordelen van dit infectiemodel. Met behulp van een speciale injectie-robot kunnen honderden zebravisembryo's in een experiment geïnfecteerd worden, waarna stoffen in het water kunnen worden toegevoegd om het in vivo-effect te testen [26]. De effectiviteit wordt uitgelezen met behulp van fluorescentiemicroscopie en op 'deep learning' gebaseerde software die de zebravislarven herkent en de mate van besmetting kan uitlezen.

Deze software kan ook aangeven of de vissen een afwijkende vorm hebben, wat kan duiden op toxiciteit (figuur 3). In eerste instantie zijn alle eerste- en tweedelijns-middelen getest in dit systeem, met goede resultaten; *Mmar* bleek bij de vis vaak dezelfde gevoeligheid te vertonen voor middelen als *Mtb* bij mensen [27]. In een vervolgstudie zijn 240 nieuwe stoffen getest die in vitro goed werkten tegen *Mtb* en *Mmar*. Van deze stoffen werken er bij zebravissen maar 14 tegen *Mmar*, wat bevestigt dat dit een belangrijke bottleneck is in de ontwikkeling van nieuwe antibiotica. Onder deze werkzame stoffen bevond zich een nieuwe remmer van het essentiële aspartyl-tRNA synthetase *AspS* (figuur 3) [28]. De volgende stap is om deze in vivo-activiteit te bevestigen in een muizenmodel.

## Meer toepassingen van het zebravismodel met CRISPR/Cas9

### Gastheegerichte therapie

Naast het gebruik van antibiotica die direct aangrijpen op *Mtb* is er steeds meer interesse in het gebruik van medicijnen die aangrijpen op de gastheerrespons. Met CRISPR/Cas9 (BOX 1) in combinatie met next-generation sequencing is het mogelijk om een biologisch effect direct te koppelen aan een gen of een set genen. Recentelijk heeft een CRISPR/Cas9-screen met macrofagen aangetoond dat de aryl hydrocarbon receptor (AhR) in de gastheer essentieel is voor de groei van *Mtb*. Remming van deze signaleringsroute met behulp van het klinisch goedgekeurde medicijn cerdulatinib remt dan ook de groei van *Mtb* in vitro [29]. Een voorbehoud is dat deze studie is uitgevoerd met de niet-virulente bacterie BCG. Aangezien het gedrag van deze vaccinstam erg verschilt van dat van virulente tuberculosebacteriën is de verwachting dat er in de toekomst meer en nieuwe gastheer-eiwitten geïdentificeerd worden die een belangrijk effect hebben op de groei of invasie van gastheercellen. De identificatie van deze eiwitten en bijbehorende cellulaire signaleringsroutes kan leiden tot hergebruik (repurposing) van bestaande medicijnen. Naar verwachting zal het klinische effect van deze gastheegerichte therapieën wel kleiner zijn dan van conventionele antibiotica. Daarnaast zullen ze alleen ingezet worden als er geen andere behandelopties zijn of als aanvulling op antimycobacteriële therapie.

### Knock-downmodellen

De CRISPR-techniek is niet alleen geschikt voor het screenen van gastheercellen maar ook voor het maken van mutanten bij muizen en zebravissen. Vooral bij zebravissen is het een krachtige techniek, omdat injectie van het systeem in het stadium van een- of tweecellige embryo's kan leiden tot wel 80 procent homozygote deletie [30]. Het is dus niet altijd nodig om vissen te laten doorgroeien tot volwassen exemplaren of om nakomelingen te gebruiken, wat een groot verschil is met andere diersystemen zoals de muis. Met het CRISPR-systeem bestaat nu de mogelijkheid om de rol van de humane SNP's die is geassocieerd met een ander verloop van *Mtb*-infecties, direct te bestuderen bij zebravissen. In deze context kunnen dan ook direct verschillende behandelingen worden getest. Dit biedt mogelijkheden om aanvullende therapieën te ontwikkelen gericht op de genetische predispositie van de patiënt.

## Conclusie en toekomstvisie

Quote Beijerinck: *“De eenige lichtstraal in de duistere geschiedenis van dit voorwerp der ontzetting, is de gerechtigde hoop op het verdwijnen daarvan van de aarde, in een niet te verre toekomst, door de samenwerking van alle wetenschappen”*.

Concluderend is de progressie van onderzoekstechnieken zodanig, dat er inderdaad een lichtstraal is die verder reikt dan in de tijd van Beijerinck. De kruisbestuiving tussen verschillende onderzoeksvelden is essentieel geweest voor de ontwikkeling van het zebravismodel en CRISPR-gerelateerde moleculaire technieken. Ruim een eeuw later is het formaat van de bacterie van ondergeschikt belang, aangezien recombinante technieken het toelaten om de 'vindplaats' fluorescent in beeld en de pathogenese verder in kaart te brengen. De identificatie van het ESX-1-systeem, dat essentieel is voor virulentie, heeft geleid tot een exponentiële groei van het onderzoek naar dit secretiesysteem, een uiterst leerrijke biologische eigenschap. Met behulp van het zebravissenmodel, dat een aanzienlijke kostenbesparing en tijdwinst met zich meebrengt, zijn de interacties tussen gastheer en mycobacterie verder in kaart gebracht. Het risico op teleurstelling is afgenomen, ook in het onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen door gebruik te maken van CRISPR-technieken en het zebravisscreeningsmodel. De WHO



heeft een zeer ambitieus plan om in 2030 al een reductie te hebben van 90 procent van het aantal mensen dat overlijdt aan tbc ten opzichte van 2015. Met behulp van meer onderzoek en nieuwe middelen is dit hopelijk nog steeds haalbaar.

## Referenties

1. Gupta UD, Katoch VM. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis*. 2005;85:277-93.
2. Ruys AC. De betrouwbaarheid van cavia-en kweekproef voor het aantoonen van tuberkelbacillen. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1938;1:18-23.
3. Lin PL, Ford CB, Coleman MT et al. Sterilization of granulomas is common in active and latent tuberculosis despite within-host variability in bacterial killing. *Nat Med*. 2014;20:75-9.
4. Dijkman K, Sombroek CC, Vervenne RAW, et al. Prevention of tuberculosis infection and disease by local BCG in repeatedly exposed rhesus macaques. *Nat Med*. 2019; 25:255-62.
5. Phillips JB, Westerfield M. Zebrafish models in translational research: tipping the scales toward advancements in human health. *Dis Model Mech*. 2014;7:739-43.
6. van Leeuwen LM, van der Sar AM, Bitter W. Animal models of tuberculosis: zebrafish. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014. 5:a018580.
7. Bouz G, Al Hasawi N. The zebrafish model of tuberculosis - no lungs needed. *Crit Rev Microbiol*. 2018;44:779-92.
8. Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 2013;496:498-503.
9. Cronan MR, Tobin DM. Fit for consumption: zebrafish as a model for tuberculosis. *Dis Model Mech*. 2014;7:777-84.
10. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, et al. Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*. 2008;18:729-41.
11. Ho PL, Ho P, Fung BK, Ip WY, Wong SS. A case of disseminated *Mycobacterium marinum* infection following systemic steroid therapy. *Scand J Infect Dis*. 2001;33:232-3.
12. Commandeur S, Iakobachvili N, Sparrius M, et al. Zebrafish Embryo Model for Assessment of Drug Efficacy on Mycobacterial Persisters. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64:e00801-20.
13. Stamm LM, Morisaki JH, Gao L, et al. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med*. 2003;198:1361-8.
14. van der Wel N, Hava D, Houben D, et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129:1287-98.
15. Groschel MI, Sayes F, Shin SJ, et al. Recombinant BCG Expressing ESX-1 of *Mycobacterium marinum* Combines Low Virulence with Cytosolic Immune Signaling and Improved TB Protection. *Cell Rep*. 2017;18:2752-65.
16. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, et al. Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*. 2010;327:466-9.
17. Ramakrishnan L. Looking within the zebrafish to understand the tuberculous granuloma. *Adv Exp Med Biol*. 2013;783:251-66.
18. van Leeuwen LM, van der Kuip M, Youssef SA, et al. Modeling tuberculous meningitis in zebrafish using *Mycobacterium marinum*. *Dis Model Mech*. 2014;7:1111-22.
19. van Leeuwen LM, Boot M, Kuijl C, et al. Mycobacteria employ two different mechanisms to cross the blood-brain barrier. *Cell Microbiol*. 2018;20:e12858.
20. Lammie GA, Hewlett RH, Schoeman JF, Donald PR. Tuberculous cerebrovascular disease: a review. *J Infect*. 2009;59:156-66.
21. Tobin DM, Vary JC Jr, Ray JP, et al. The *Ita4h* locus modulates susceptibility to mycobacterial infection in zebrafish and humans. *Cell*. 2010;140:717-30.
22. Tobin DM, Roca FJ, Oh SF, et al. Host genotype-specific therapies can optimize the inflammatory response to mycobacterial infections. *Cell*. 2012;148:434-46.
23. Donovan J, Phu NH, Thao LTP, et al. Adjunctive dexamethasone for the treatment of HIV-uninfected adults with tuberculous meningitis stratified by Leukotriene A4 hydrolase genotype (LAST ACT): Study protocol for a randomised double blind placebo controlled non-inferiority trial. *Wellcome Open Res*. 2018;3:32.
24. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, Pompliano DL. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:29-40.
25. Bosch B, DeJesus MA, Poulton NC, et al. Genome-wide gene expression tuning reveals diverse vulnerabilities of *M. tuberculosis*. *Cell*. 2021;184:4579-92 e24.
26. Spaink HP, Cui C, Wiweger MI, et al. Robotic injection of zebrafish embryos for high-throughput screening in disease models. *Methods*. 2013;62:246-54.
27. Ho VQT, Verboom T, Rong MK, Habjan E, Bitter W, Speer A. Heterologous Expression of *ethA* and *katG* in *Mycobacterium marinum* Enables the Rapid Identification of New Prodrugs Active against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65:e01445-20.
28. Habjan E, Ho VQT, Gallant J, et al. Anti-tuberculosis Compound Screen using a Zebrafish Infection Model identifies an Aspartyl-tRNA Synthetase Inhibitor. *Dis Model Mech*. 2021;14:dmm049145.
29. Lai Y, Babunovic GH, Cui L, et al. Illuminating Host-Mycobacterial Interactions with Genome-wide CRISPR Knockout and CRISPRi Screens. *Cell Syst*. 2020;11:239-251 e7.
30. Naert T, Tulkens D, Edward NA, et al. Maximizing CRISPR/Cas9 phenotype penetrance applying predictive modeling of editing outcomes in *Xenopus* and zebrafish embryos. *Sci Rep*. 2020;10:14662.



# Een meisje met orbitale tuberculose

Cornelis van der Torren, Marceline van Furth, Martijn van der Kuip

## Samenvatting

Een meisje van 16 jaar, recent geïmmigreerd uit Somalië, presenteerde zich met erythemateuze conjunctiva van het rechteroog en zwelling van het ooglid. Zij had geen visusklachten of systemische symptomen. De CT-scan was suggestief voor infectie van de orbita, waarop werd gestart met intraveneuze behandeling met amoxicilline/clavulaanzuur met als werkdiagnose orbitale cellulitis. Onder deze behandeling nam de ontsteking echter toe. Een MRI-scan van de orbita liet een subperiostale massa met centrale vervalping in de orbita zien. Een biopsie van de orbitale massa toonde een necrotiserende granulomateuze ontsteking waarbij de auraminekleuring positief was en de PCR positief voor *Mycobacterium tuberculosis*. Behandeling met isoniazide, ethambutol, pyrazinamide en rifampicine leidde tot het slinken van de zwelling rond het oog. Een MRI-scan ter controle na drie maanden toonde nog slechts minimale restafwijkingen. Orbitale cellulitis is een zeldzame uitingsvorm van extrapulmonale tuberculose (tbc). Extrapulmonale tbc vormt circa 16 procent van alle tbc-gevallen wereldwijd.

## Summary

A 16-year old girl, recently immigrated to the Netherlands from Somalia, presented with erythema of the conjunctiva of the right eye and swelling of the eyelid. She had no visual complaints or systemic symptoms. A CT-scan was suggestive of inflammation in the orbital cavity. Intravenous amoxicillin/clavulanate was started for treatment of orbital cellulitis. However, despite antibiotic therapy, the inflammation was progressive. Magnetic resonance imaging (MRI) was performed, which showed a subperiosteal mass with a central cavity in the extraconal part of the right orbita. A biopsy of the orbital mass showed necrotizing granulomatous inflammation. Auramine staining of the biopsy was positive for acid-fast bacillary, cultures and PCR were positive for *Mycobacterium tuberculosis*. Complete clinical

remission was achieved by treatment with isoniazid, ethambutol, pyrazinamid and rifampicin. A follow-up MRI after three months showed a minimal residual lesion. Orbital cellulitis due to *Mycobacterium tuberculosis* is a rare form of extrapulmonary tuberculosis. Extrapulmonary tuberculosis accounts for 16 per cent of worldwide tuberculosis cases.

## Ziektegeschiedenis

Een meisje van 16 jaar presenteerde zich met een pijnlijk rechteroog en gezwollen ooglid op de polikliniek van een academisch ziekenhuis. Zij had geen visusklachten. Anamnestic waren er geen aanwijzingen voor koorts, sinusitis, malaiseklachten of gewichtsverlies. Er was geen sprake van recent trauma, een insectenbeet of infectieziekte in haar omgeving. Haar vaccinatiestatus was onbekend. Zij was een jaar eerder uit Somalië geïmmigreerd en verbleef in een asielzoekerscentrum. Het lichamenlijk onderzoek toonde roodheid en zwelling van de conjunctivae van haar rechteroog. Daarbij had zij unilaterale ptosis en proptosis (3 mm), waarbij ze haar rechterooglid niet volledig kon sluiten. Aan de laterale zijde was een ophoping van purulent exsudaat met korsten zichtbaar (*figuur 1*). Haar pupilreacties en oogbewegingen waren ongestoord en er was geen sprake van diplopie. Haar visus was 0,8 aan het rechteroog, en 1,25 aan het linkeroog. Overig lichamenlijk onderzoek was niet afwijkend. Initieel werd een CT-scan verricht, die suggestief was voor ontsteking met uitbreiding in de orbita.

Emma Kinderziekenhuis, Amsterdam Universitair Medisch Centrum (AUMC), afdeling kinderimmunologie, kinder-reumatologie en -infectieziekten, Amsterdam, dr. C.R. van der Torren, arts-assistent kindergeneeskunde, prof. dr. A.M. van Furth, hoogleraar kindergeneeskunde, i.h.b. infectieziekten, dr. M. van der Kuip, kinderarts-infectioloog/immunoloog. Correspondentieadres: dr. M. van der Kuip (m.vanderkuip@amsterdamumc.nl).

**Figuur 1.** Foto bij presentatie met roodheid en zwelling van de conjunctivae van het rechteroog. Daarbij had patiënt unilaterale ptosis en proptosis. Aan de laterale zijde was een ophoping van purulent exsudaat met korsten zichtbaar.

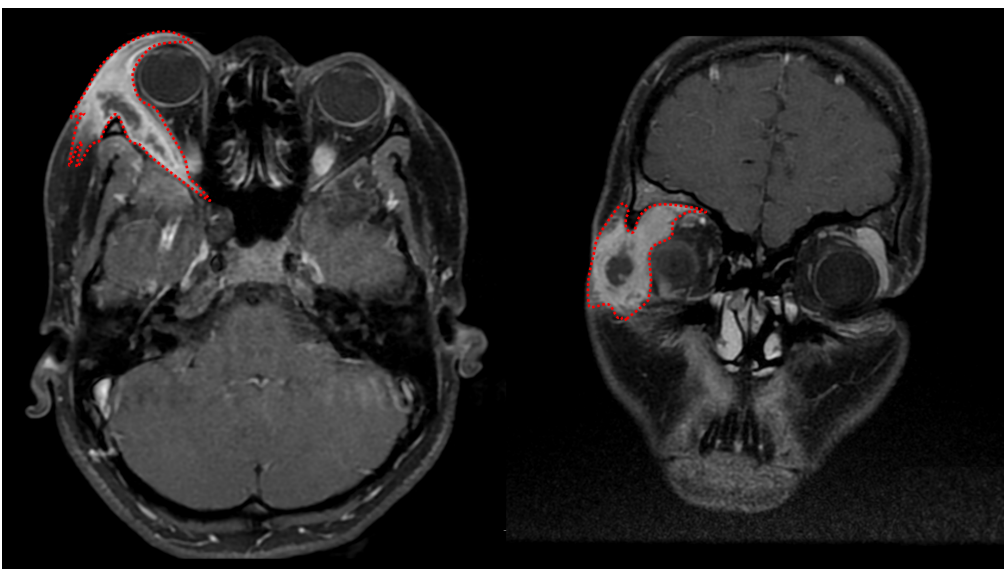


Met als werkdiagnose cellulitis orbitae met meest aannemelijk een bacteriële verwekker, werd gestart met intraveneus amoxicilline in combinatie met clavulaanzuur.

Onder deze behandeling namen de afwijkingen echter toe, waarna aanvullend onderzoek werd verricht. In het bloed werd een milde lymfopenie ( $3900 \text{ cel/mm}^3$ ), een verhoogde bezinking (72 mm/uur) en een normaal C-reactief proteïne gevonden. De antistreptolysinetiter was laag en antistoffen tegen het humaan immuno-

deficiëntievirus (hiv) waren niet aantoonbaar. MRI-onderzoek van de orbita toonde een subperiostale zwelling (4,5 x 1,3 cm) met centrale vervloeiing in het extraconale deel van de rechter orbita (figuur 2). De afwijkingen liepen door tot in de preseptale weke delen en de huid van het aangedane oog. In de laterale orbitawand was reactieve sclerose zichtbaar, passend bij een reeds langer bestaande inflammatie. Er waren geen aanwijzingen voor sinusitis.

**Figuur 2.** MRI-onderzoek van de orbita toonde een subperiostale zwelling (4,5 x 1,3 cm) met centrale vervloeiing in het extraconale deel van de rechter orbita. De afwijkingen liepen door tot in de preseptale weke delen en de huid van het aangedane oog. In de laterale orbitawand was reactieve sclerose zichtbaar. Er waren geen aanwijzingen voor sinusitis.



De differentiaaldiagnose van een orbitale zwelling is uitgebreid en bevat diverse maligniteiten (onder meer rabdomyosarcoom, Ewing-sarcoom, chloroom (acute myeloïde leukemie), lymfoom, retinoblastoom, gemetastaseerd neuroblastoom), benigne tumoren (dermoidcyste, lymfangioom, hemangioom), infecties (onder meer bacterieel, fungaal) en systemische ziekten (onder meer ziekte van Graves, sarcoïdose en granulomateuze polyangiïtis) [1,2]. De meest voorkomende bacteriële verwekkers zijn streptokokken (*Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*) en stafylokokken (*Staphylococcus aureus*) en bij kinderen ook *Haemophilus influenzae* [2]. Ook fungale infecties, zoals aspergillose of mucormycose, van het oog zijn beschreven [3]. Mycobacteriële infecties zijn zeldzaam [6]. Daarnaast kan een orbitale pseudotumor, een idiopathische benigne ontsteking, overwogen worden als andere onderliggende oorzaken zijn uitgesloten [4].

Biopsie van de orbitale massa toonde een necrotiserende granulomateuze ontsteking. Hierin werden zuurvaste staven aangetoond met behulp van een auraminekleuring en getypeerd als *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) met een PCR. Uit de kweek van het biopt groeide ook *Mtb*. Bij een tuberculinehuidtest (Mantouxreactie) ontstond een zwelling van 5 mm met centrale ulceratie. Op de X-

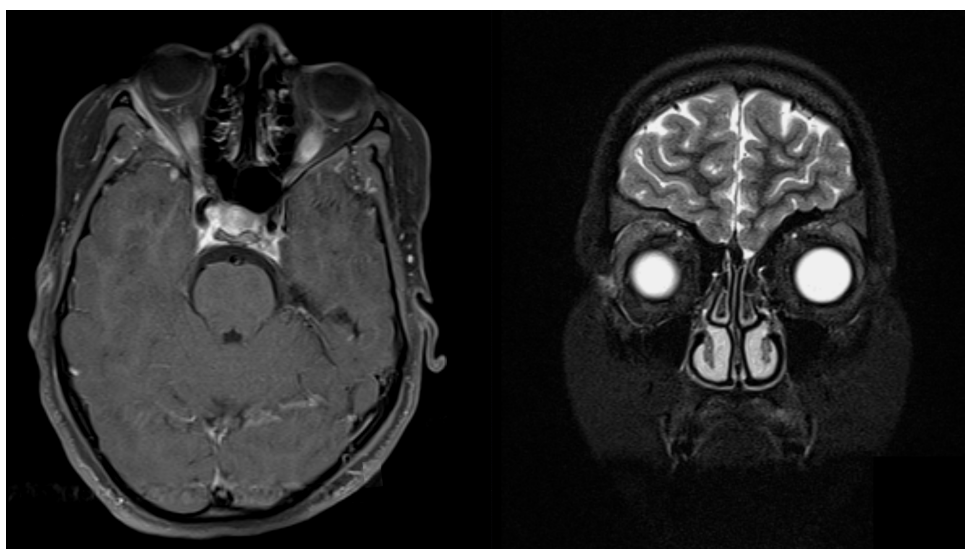
thorax waren geen afwijkingen te zien. De diagnose orbitale tuberculose (tbc) werd gesteld.

De patiënt werd behandeld met isoniazide, ethambutol, pyrazinamide en rifampicine. De uit het biopt gekweekte stam van *Mtb* bleek gevoelig voor alle eerstelijnstuberculostatika. De totale behandelduur voor orbitale tbc is niet anders dan voor pulmonale tbc, met een intensieve fase van twee maanden waarin vier middelen gegeven worden, en een consolidatiefase van vier maanden behandeling met isoniazide en rifampicine. Gedurende twee maanden werd de medicatie gegeven onder directe supervisie van een verpleegkundige. Controle op hepatotoxiciteit en beenmergdepressie toonde geen afwijkingen. Controle na twee maanden toonde volledig herstel van de zwelling van het rechteroog en het ooglid. Na drie maanden toonde de MRI-scan slechts minimale restafwijkingen (figuur 3).

### Bespreking

Orbitale tuberculose werd voor het eerst beschreven in 1881 door Abadie [5]. De incidentie van orbitale tuberculose is niet bekend, maar zeer laag [6]. Van de naar schatting 10 miljoen mensen wereldwijd die besmet zijn met actieve tuberculose, betreft dit in circa 16 procent van de gevallen van extrapulmonale tbc.

**Figuur 3.** Drie maanden na de start van de behandeling werd een MRI-scan herhaald. Hierop werden slechts minimale restafwijkingen gezien.



Het risico op extrapulmonale manifestatie van tbc is hoger bij kinderen (tot 50 procent van de tbc-infecties), en bij een gelijktijdige hivinfectie [7]. De meest voorkomende vorm van extrapulmonale tbc op de kinderleeftijd is lymfklierziekte-tbc, ook bekend als scrofula, de meest ernstige vorm is tbc-meningitis [8]. Orbitale tbc kan ontstaan door hematogene verspreiding vanuit de initiële infectie in de long of door directe uitbreiding van tbc in de paranasale sinussen [6,9]. Bij onze patiënt werd geen ander focus gevonden. Toenemende immigratie en internationale reizen zijn belangrijke oorzaken van de toename van extrapulmonale tbc in landen met een hoog inkomen, zoals ook in deze casus [10].

De presentatie van orbitale tbc is vaak weinig specifiek. Meestal zijn de afwijkingen unilateraal, chronisch en langzaam progressief. Daarbij zijn proptosis, zwelling van het ooglid, orbitale pijnklachten, verminderde visus en afwijkingen in het gezichtsveld belangrijke klachten. Het kan zich ook presenteren als een chronisch abces zonder duidelijke tekenen van ontsteking. Vaak wordt een bacteriële cellulitis of maligniteit vermoed. Complicaties van orbitale tbc zijn uitbreiding van de infectie naar het brein en blindheid [6]]. Het is daarom van groot belang tbc in een vroeg stadium te overwegen bij niet geheel typische ziektepresentaties.

De diagnose orbitale tbc wordt gesteld door middel van histologie, PCR en kweek op een biopt van het proces. De tuberculinehuidtest, een longfoto en een IGRA-test (interferon-gamma release assay) voor tbc kunnen de diagnose ondersteunen. Het gebruik van genetische targets en real-time PCR-technieken heeft de sensitiviteit en specificiteit van de diagnostiek verbeterd [11]. Toch is de sensitiviteit en negatief voorspellende waarde voor alle vormen van extrapulmonale tbc in studies relatief laag [12]. Verbeterde moleculaire resistentiebepalingen kunnen bijdragen aan vroege aanpassingen van behandelregimes bij aangetoonde resistentie. Extrapulmonale tbc bij kinderen wordt doorgaans niet anders behandeld dan pulmonale tbc. Uitzonderingen zijn meningitis, pericarditis en osteoarticulaire infectie met *Mtb*. De standaardbehandeling bestaat uit twee maanden isoniazide, rifampicine, pyrazinamide en ethambutol, gevolgd door vier maanden isoniazide, rifampicine en eventueel ethambutol. De geadviseerde doseringen zijn hoger bij kinderen lichter dan 25 kg [13]. Over de prognose van orbitale tbc is niet veel bekend. Als er nog geen complicaties zijn opgetreden

bij de start van de behandeling lijkt volledig herstel, zoals bij onze patiënt, aannemelijk.

## Dankbetuiging

Wij danken Dennis Stoeltie voor zijn technische assistentie bij het maken van de figuren.

## Referenties

1. Shields JA, Shields CL, Scartozzi R. Survey of 1264 patients with orbital tumors and simulating lesions: the 2002 Montgomery Lecture, part 1. *Ophthalmology*. 2004;111:997-1008.
2. Seltz LB, Smith J, Durairaj VD, Enzenauer R, Todd J. Microbiology and antibiotic management of orbital cellulitis. *Pediatrics*. 2011;127:e566-72.
3. Robinson MR, Fine HF, Ross ML, et al. Sino-orbital-cerebral aspergillosis in immunocompromised pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19:1197-203.
4. Mendenhall WM, Lessner AM. Orbital pseudotumor. *Am J Clin Oncol*. 2010;33:304-6.
5. Abadie C. Tumeurs rares symétriques des paupières (uncommon symmetrical swelling of the eyelids). *Arch Ophthalmol*. 1881;1:432-7.
6. Madge SN, Prabhakaran VC, Shome D, et al. Orbital tuberculosis: a review of the literature. *Orbit*. 2008;27:267-77.
7. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. Geneva (Switzerland): World Health Organization; 2020.
8. Sexual Dimorphism in Tuberculosis Incidence: Children Cases Compared to Adult Cases in Tuscany from 1997 to 2011 – PLOS ONE 2014.
9. Mehta S, Gilada I. In: Schaaf HS and Zumla A. Tuberculosis: A comprehensive clinical reference. Philadelphia, USA: Saunders Elsevier; 2009:479.
10. Hesselink DA, Yoo SM, Verhoeven GT, Brouwers JW, Smit FJ, van Saase JL. A high prevalence of culture-positive extrapulmonary tuberculosis in a large Dutch teaching hospital. *Neth J Med*. 2003;61:65-70.
11. Savelkoul PH, Catsburg A, Mulder S, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis complex with Real Time PCR: comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *J Microbiol Methods*. 2006;66:177-80.
12. WHO consolidated guidelines on tuberculosis, Module 3: Diagnosis – rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020 (<https://www.who.int/publications/i/item/who-consolidated-guidelines-on-tuberculosis-module-3-diagnosis---rapid-diagnostics-for-tuberculosis-detection>).
13. Handboek Tuberculose Nederland 2021. Den Haag: KNCV Tuberculosefonds; 2021.



# Niet-tuberculeuze mycobacteriële longinfecties

## Van diagnostiek tot behandeling

Arthur Lemson, Jakko van Ingen, Onno Akkerman, Wouter Hoefsloot

### Samenvatting

Infecties met niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) manifesteren zich vaak als longinfecties bij patiënten met een onderliggende longziekte of immuun-deficiëntie. Er zijn circa 200 verschillende NTM-species, waarvan slechts een klein percentage klinisch relevant is. Voor diagnosestelling moet er daarom sprake zijn van een trias van passende symptomen, kenmerkende radiologische bevindingen en meer-voudige microbiologische bevestiging. Een NTM-longinfectie presenteert zich vaak met chronische respiratoire en/of systemische symptomen die moeilijk te onderscheiden zijn van de predisponerende longziekte.

De microbiologische diagnostiek omvat microscopie, kweek, speciesidentificatie en gevoeligheidsbepalingen, waarvoor nauwe samenwerking tussen longartsen en arts-microbioloog vereist is. Radiologisch wordt onderscheid gemaakt tussen een nodulair-bronchiëctatisch en holtevormend ziektepatroon, gekenmerkt door een relatief trage en snelle progressie. Behandeling bestaat altijd uit ondersteunende, vaak uit antibiotische en soms uit adjuvante chirurgische therapie. Antibiotische therapie omvat langdurige behandeling met drie of meer middelen, variërend per species, en gaat vaak gepaard met bijwerkingen en interacties. Behandeluitkomsten variëren ook sterk per species, van slecht tot suboptimaal.

Dit artikel biedt een overzicht van de diagnostiek en behandeling van NTM-longinfecties door de meest voorkomende verwekkers, en behandelt recente therapeutische ontwikkelingen uit de nieuwe richtlijn.

### Abstract

Nontuberculous mycobacterial infections often manifest as pulmonary disease in patients with a predisposing lung disease or immunological disorder. To date, some 200 species have been described, with varying clinical significance. To diagnose NTM pulmonary disease (NTM-PD), symptoms and

radiological features compatible with NTM-PD need to be confirmed with positive cultures of the causative NTM species. Clinical signs of NTM-PD comprise of respiratory symptoms such as (productive) cough and dyspnea, which are often hard to differentiate from the predisposing lung condition, and systemic symptoms such as fatigue and weight loss.

The role of the clinical microbiology laboratory is to perform direct microscopy of respiratory specimens to detect acid-fast bacilli, cultures, and organise species identification and drug susceptibility testing. Two major radiologic patterns exist: a nodular-bronchiectatic and fibrocavitary form, characterized by slow and rapid progression of disease, respectively. All patients receive best supportive care, often accompanied by long-lasting and multi-drug antibiotic regimens. Surgery can be indicated for select patients. Altogether, treatment outcomes vary from poor to suboptimal, depending on the causative species.

This article presents an overview of the diagnostic and therapeutic process of NTM-PD, including a closer look at the recently published guideline.

### Inleiding

Het bacteriegeslacht *Mycobacterium* wordt opgedeeld in drie groepen, de obligate pathogenen van het *M. tuberculosis*-complex, *M. leprae* en de restgroep die als geheel de niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) wordt genoemd. NTM-infecties manifesteren zich doorgaans als longinfecties en minder frequent als cervicale lymfadenitis bij kinderen, inoculatie-infecties

Radboud Universitair Medisch Centrum, afdeling Longziekten, Nijmegen, drs. A. Lemson, arts-onderzoeker, dr. W. Hoefsloot, longarts; afdeling Medische microbiologie, dr. J. van Ingen, arts-microbioloog. Universitair Medisch Centrum Groningen, afdeling Longziekten en tuberculose, dr. O.W. Akkerman, longarts. Correspondentieadres: A. Lemson (Arthur.lemson@radboudumc.nl).



van huid- en weke delen of gedissemineerde ziekte bij immuungecompromitteerden [1].

Van oudsher worden de NTM ingedeeld in snelle en langzame groeiers, gedefinieerd door zichtbare groei in respectievelijk minder of meer dan zeven dagen. Verwekkers van NTM-longinfecties behoren voornamelijk tot de laatste groep [2].

De NTM omvatten circa 200 species met uiteenlopende klinische relevantie. Mede doordat vele species in ons leefmilieu voorkomen, is het onderscheid tussen contaminatie na blootstelling uit het milieu en echte infectie cruciaal voor de diagnostiek. Om de diagnose NTM-longinfectie te stellen, moet worden voldaan aan een set van klinische, radiologische en microbiologische criteria (figuur 1) [3].

**Figuur 1.** Criteria voor het stellen van de diagnose NTM-longinfectie

<b>Kliniek</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Passende symptomen; en</li><li>• Exclusie van andere diagnoses</li></ul>
<b>Radiologie</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Nodulair-bronchiëctatische of holtevormende afwijkingen</li></ul>
<b>Microbiologie</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• 2 of meer separate sputum-monsters zijn positief voor dezelfde NTM-species; of</li><li>• Indien sputumproductie niet lukt: 1 kweekpositieve BAL; of</li><li>• Longbiopsie met passende histopathologische kenmerken (granulomateuze ontsteking of zichtbare zuurvaste staven) én 1 NTM positieve weefselkweek of 2) 1 of meer kweekpositieve sputa of BAL.</li></ul>

NTM = niet-tuberculeuze mycobacteriën;  
BAL = broncho-alveolaire lavage.

## Klinische diagnostiek

NTM zijn opportunisten en leiden daarom vaak tot infecties bij een verstoorde lokale of systemische immuniteit.

Belangrijke risicofactoren voor NTM-longinfecties zijn COPD, bronchiëctasieën, cystische fibrose (CF), astma, interstitiële longziekten, gebruik van inhalatiecorticosteroïden en immuundeficiënties. Daarnaast bestaat het zogenaamde 'Lady Windermere' syndroom [1], een uniek fenotype van NTM-longinfecties bij met name postmenopauzale vrouwen met een laag BMI, skeletafwijkingen met een marfanoid habitus, mitralisklepinsufficiëntie en bovenal de afwezigheid van pre-existent longlijden dat de klinische en radiologische afwijkingen verklaart. De verklaring voor de verhoogde gevoeligheid voor NTM-longinfecties lijkt te berusten op subtiële immunologische én genetische afwijkingen [8].

De klinische presentatie van NTM-longinfecties is vaak aspecifiek en wordt dikwijls vertekend door het onderliggend longlijden. Vaak is sprake van langdurige respiratoire symptomen zoals sputumproductie, hoesten, hemoptoë en thoracale pijn.

Daarnaast worden systemische symptomen zoals vermoeidheid en gewichtsverlies frequent beschreven. Progressieve longklachten en onvoldoende reactie op conventionele therapie kunnen ook op een NTM-longinfectie wijzen.

## Radiologische diagnostiek

We onderscheiden grofweg twee radiologische ziektepatronen binnen de NTM-longinfecties, al dan niet gecombineerd voorkomend: nodulair-bronchiëctatische en holtevormende ziekte [9].

De typische nodulair-bronchiëctatische verschijningsvorm bevindt zich in de middelste en onderste longvelden, heeft een lage bacteriële dichtheid, wordt frequent gezien bij Lady Windermere-patiënten en kent een stabiel ziektebeloop met een relatief laag mortaliteitsrisico [10].

Holtevormende ziekte manifesteert doorgaans in de bovenste longvelden bij mensen met COPD, longfibrose of gebruik van inhalatiecorticosteroïden en wordt gekenmerkt door een progressief ziektebeloop, hoge bacteriële dichtheid, verminderde reactie op antibiotische therapie en een relatief hoog mortaliteitsrisico [11-13].

## Microbiologische diagnostiek

Microbiologische diagnostiek is essentieel voor het bepalen van de klinische relevantie en therapiekeuze van NTM-infecties. De betrouwbaarheid is echter sterk afhankelijk van de kwaliteit van het verkregen materiaal. Hieronder worden enkele laboratorium-technieken en belangrijke stappen binnen de NTM-longinfectie diagnostiek toegelicht.

### Collectie

Differentiatie tussen infectie en contaminatie vereist twee of meer positieve sputumkweken op basis van drie afzonderlijke kweken met een minimaal tijdsinterval van zeven dagen, of een positieve broncho-alveolaire lavagekweek wanneer er geen sputumproductie is, ook niet na sputuminductie. *M. goodnae*, *M. chelonae*, *M. simiae* en *M. terrae* die aangetroffen worden in pulmonale isolaten van Nederlandse patiënten zijn NTM-species met een lage klinische relevantie en kunnen als contaminanten worden beschouwd [14].

### Microscopie

Het sputum moet beoordeeld worden op purulentie en de aanwezigheid van plaveiselcelepitheel. De aanwezigheid van veel plaveiselcelepitheel duidt op een orofaryngeale origine en moet als niet-representatief worden beschouwd. De bacteriële dichtheid wordt bepaald met auramine en/of Ziehl-Neelsen kleuring en deze heeft zowel een prognostische als een vergelijkende functie [12]. Naast de microscopie worden steeds vaker PCR-technieken ingezet om snel een NTM-infectie van longtuberculose te onderscheiden.

### Kweek

De sensitiviteit van de NTM-kweek wordt grotendeels bepaald door het kweekmedium en de incubatietemperatuur. NTM-species hebben hun groeioptimum bij verschillende incubatietemperaturen. Veroorzakers van huid- en lymfeklierinfecties (onder meer *M. fortuitum* en *M. marinum*) hebben een groeioptimum bij 30 graden Celsius, terwijl species die longinfecties veroorzaken gedijen bij 37 graden Celsius. Kortom, incubatie in het vloeibare MGIT ('Mycobacterial Growth Indicator Tubes') of BacTAlert én vaste Löwenstein-Jenssen medium bij 36-37 graden Celsius heeft de hoogste sensitiviteit voor pulmonale isolaten [15].

Kweekomslag is de eerste stap naar eradicatie van het pathogeen en wordt gedefinieerd door drie achtereenvolgende negatieve kweken met vierweeke tussentijdse intervallen, tijdens antibiotische therapie [16]. Een voorspeller van sputumkweekomslag is een lage bacteriële dichtheid, blijkend uit een lange 'time-to-positivity (TTP)', voorafgaand aan en drie maanden na start van de behandeling [13]. Het rapporteren van deze TTP is dus ook nuttig voor de kliniek.

### Identificatie

Identificatie van het NTM-(sub)species is essentieel voor de bepaling van de klinische relevantie en therapiekeuze. Identificatie vindt voornamelijk plaats via moleculaire technieken, waaronder zogeheten line probe assays, partiële en multiplexe gensequentie-analyse en meer recentelijk whole-genome sequencing (WGS). Sequentieanalyse van onder meer de 16S-rRNA, 16S-23S ITS, hsp65 en rpoB-genen maakt identificatie op speciesniveau mogelijk. Identificatie tot subspeciesniveau is vooral relevant voor *M. abscessus*, waarbij behandeluitkomsten slechter zijn bij *M. abscessus* subsp. *abscessus* dan bij *M. abscessus* subsp. *massiliense* door verschillen in induceerbare macrolideresistentie [17]. WGS maakt het ook mogelijk genmutaties op te sporen die geassocieerd zijn met antibioticum-resistentie bij NTM, hoewel deze niet zo uitgebreid onderzocht zijn als bij *M. tuberculosis*.

### Gevoeligheidsbepalingen

De gouden standaard voor gevoeligheidsbepalingen van NTM is de microdilutiemethode, met de door het Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) voorgestelde breekpunten (een EUCAST-methode is nog in ontwikkeling). Op basis van correlaties tussen in-vitrogevoeligheid en behandeluitkomsten wordt aanbevolen om de gevoeligheid te testen van macroliden (met claritromycine als vertegenwoordiger uit deze klasse) en amikacine bij MAC en *M. abscessus* en rifampicine bij *M. kansasii*; voor andere middelen en andere NTM-species is voorzichtigheid bij de interpretatie van in-vitrogevoeligheden geboden. Hoewel duidelijke correlaties tussen in vitro en in vivo ontbreken, zijn recent ook voorlopige breekpunten beschreven voor linezolid en moxifloxacin in de derde editie van de betreffende CLSI-richtlijn [18].

## Behandeling

De behandeling van NTM-longinfecties begint altijd met ondersteunende zorg, wordt vaak aangevuld met antibiotische therapie en vereist in selecte gevallen adjuvante longchirurgie. Een multidisciplinaire evaluatie tussen longarts, arts-microbioloog, paramedicus en zo nodig infectioloog bepaalt de meest geschikte behandeling. Mogelijke behandeldoelen zijn symptoomreductie, eradicatie van het pathogeen en voorkomen van ziekteprogressie.

Een belangrijk verschil met tuberculose is dat 'watchful waiting' met ondersteunende therapie dus ook kan volstaan. De rol van de arts-microbioloog blijft ook tijdens de behandeling essentieel voor de evaluatie van kweekuitslagen, verandering in bacteriële dichtheid, het optreden van verworven resistentie en het samenstellen van (alternatieve) behandelregimes.

### Eerstelijnsbehandeling

De internationale richtlijn uit 2020 adviseert over behandelindicaties, eerstelijns- en intensievere behandelregimes voor de vijf meest voorkomende verwekkers van NTM-longinfecties [3].

*Figuur 2* (pag. 28) geeft een tijdlijn van een succesvolle eerstelijnsbehandeling weer en *tabel 1* vat de behandelregimes uit de internationale richtlijn samen. Gezien de verschillende behandelregimes tussen NTM-species dient de determinatie bekend te zijn voordat antibiotische behandeling wordt gestart. Indicaties voor het snel beginnen met antibiotische behandeling zijn de aanwezigheid van zuurvaste staven bij directe microscopie en holtevormende ziekte.

De eerstelijnsbehandeling bestaat uit drie of meer middelen die tot 12 maanden na kweekomslag gecontinueerd moeten worden om het risico op recidief te beperken. In de praktijk is een therapieduur van meer dan 18 maanden dus niet ongewoon.

Macroliden vormen de hoeksteen van de behandeling. De combinatie met rifampicine en ethambutol bewerkstelligt een synergistische interactie die de kans op macrolidenresistentie verkleint.

Lopende studies onderzoeken momenteel of rifampicine volledig weggelaten of vervangen kan worden door een even effectief middel met minder bijwerkingen en interacties zoals clofazimine. Longchirurgie moet bij ernstige of gelokaliseerde ziekte tijdig overwogen worden. Gezien de zeldzaamheid van NTM-longinfecties en de complexe perioperatieve zorg wordt geadviseerd hiervoor te verwijzen naar een NTM-expertisecentrum.

### Intensivering

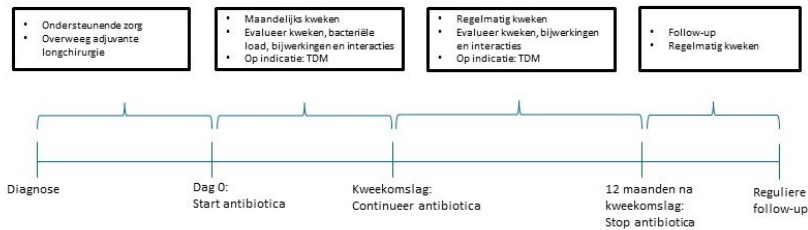
Intensivering wordt aanbevolen bij holtevormende, ernstige nodulair-bronchiëctatische, macrolide-resistente, refractaire en recidiverende longinfecties met MAC, *M. abscessus* en *M. xenopi*, *M. kansasii* en *M. malmoense*. Ook wordt intensivering aanbevolen voorafgaand aan adjuvante longchirurgie bij MAC-longinfecties, omdat deze geassocieerd is met een hogere postoperatieve kans op eradicatie van het pathogeen [19]. De definitie van refractaire ziekte is afwezigheid van kweekomslag ondanks zes maanden richtlijnconforme antibiotische therapie [16]. Intraveneuze of intramusculaire amikacine is een veel-

**Tabel 1.** Behandelprogramma NTM-longinfecties

Verwekker	Behandelprogramma	Toevoegen bij ernstige ziekte
MAC	R-E-Azi	Ami / ALIS
<i>M. xenopi</i>	R-E-Azi	Ami
<i>M. kansasii</i>	R-E-H	Ami
<i>M. malmoense</i>	R-E-Azi	Ami / Mox
<i>M. abscessus</i>	Inductiefase (1-3 antibiotica): Ami-Ti-Imi	Oraal regime: Op basis van in vitro gevoeligheid en na overleg met een expertisecentrum

MAC = Mycobacterium avium complex; R = Rifampicine; E = Ethambutol; Azi = Azitromycine; H = Isoniazide; Ami = Amikacine; Ti = Tigecycline; Imi = Imipenem; Clo = Clofazimine; ALIS = Liposomale amikacine inhalatietherapie; Mox = Moxifloxacin.

**Figuur 2.** Tijdlijn van een succesvolle NTM-longinfectiebehandeling



TDM = Therapeutic drug monitoring

gebruikt intensiverend middel en recent wordt ook amikacine liposomale suspensie voor inhalatie (ALIS) bij MAC-longinfecties toegediend. Deze vernieuwde toe-dieningswijze verhoogt de beschikbaarheid in het longweefsel door toegenomen penetratie van biofilms en alveolaire macrofagen en vermindert tegelijkertijd de systemische bijwerkingen. Zo resulteerde de toevoeging van ALIS aan eerstelijns therapie bij patiënten met refractaire MAC-longinfecties in een significant hogere kweekomslag (29 versus 9 procent) en blijvende eradication van het pathogeen (63 versus 30 procent) ten opzichte van alleen eerstelijns therapie [20,21]. Op dit moment is ALIS geïndiceerd voor amikacinegevoelige, refractaire MAC-longinfectie en 'relapse' [16] na zes maanden richtlijnconforme therapie in het verleden [3].

In vitro studies tonen synergisme tussen amikacine en clofazimine, waardoor in potentie betere klinische uitkomsten behaald kunnen worden [22].

Een klinisch relevant verschil in eradication van het pathogeen tussen een regime met amikacine en clofazimine en eerstelijns therapie is retrospectief beschreven voor ernstige MAC-longinfecties (74 versus 52 procent,  $p = 0,337$ ) en zal prospectief bevestigd moeten worden [23].

### Behandeluïtkomsten

De kans op kweekomslag met de huidige eerstelijns-behandeling is sterk afhankelijk van het NTM-species, de antibioticumgevoeligheid en het ziektepatroon; gemiddeld 65 procent bij macrolide-gevoelige MAC, 21 procent bij macrolideresistente MAC, 41 procent bij *M. abscessus* subsp. *abscessus* en 70 procent bij *M. abscessus* subsp. *massiliense* [24-26]. Bijwerkingen

en geneesmiddelinteracties verhinderen dikwijls een optimaal behandelregime en dragen daarom bij aan de beperkte succeskans. Overige prognostisch ongunstige factoren zijn mannelijk geslacht, hogere leeftijd, laag BMI, roken, systemische symptomen, verhoogde ontstekings-parameters, anemie, hoge bacteriële dichtheid, chronische pulmonale aspergillose, actuele maligniteit, chronische hart- en leverziekte [10,12].

### Conclusie

De diagnose NTM-longinfectie vereist een passende kliniek, herkenbaar radiologisch beeld én meerdere positieve sputumkweken. WGS is een nieuwe ontwikkeling binnen de NTM-diagnostiek waardoor nauwgezette identificatie plaatsvindt en mutatiegedreven resistentie opgespoord wordt. De eerstelijns-behandeling van NTM-longinfecties heeft slechte tot suboptimale uitkomsten, maar de komst van intensiverende en alternatieve middelen zoals liposomaal amikacine en clofazimine is een stap in de goede richting. Een doorlopende samenwerking tussen arts-microbioloog en longarts, bij voorkeur binnen een multidisciplinair team, is essentieel voor een adequaat diagnostisch en therapeutisch proces.

### Referenties

1. Honda JR, Knight V, Chan ED. Pathogenesis and risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. Clin Chest Med. 2015;36:1-11.
2. Tortoli E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. Clin Microbiol Infect. 2009;15:906-10.
3. Daley CL, Iaccarino JM, Lange C, et al. Treatment of

- nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an official ATS/ERS/ESCMID/IDSA clinical practice guideline. *Eur Respir J.* 2020;56:2000535.
4. Hoefsloot W, van Ingen J, Andrejak C, et al. The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *Eur Respir J.* 2013;42:1604-13.
  5. Schildkraut JA, Gallagher J, Morimoto K, et al. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in Europe and Japan by Delphi estimation. *Respir Med.* 2020;173:106164.
  6. Schildkraut JA, Zweijpfenning SMH, Nap M, et al. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in the Netherlands. *ERJ Open Research.* 2021:00207-2021.
  7. Ingen J van. Diagnostiek en behandeling van infecties door nontuberculeuze mycobacteriën. *Ned Tijdschr Med Microbiol.* 2014;22:2.
  8. Olivier KN. Lady Windermere Dissected: More Form Than Fastidious. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13:1674-6.
  9. Anjos L, Parreira PL, Torres P, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP, Rabahi MF. Non-tuberculous mycobacterial lung disease: a brief review focusing on radiological findings. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020;53:e20200241.
  10. Jhun BW, Moon SM, Jeon K, et al. Prognostic factors associated with long-term mortality in 1445 patients with nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: a 15-year follow-up study. *Eur Respir J.* 2020;55.
  11. Koh WJ, Moon SM, Kim SY, et al. Outcomes of Mycobacterium avium complex lung disease based on clinical phenotype. *Eur Respir J.* 2017;50.
  12. Hwang JA, Kim S, Jo KW, Shim TS. Natural history of Mycobacterium avium complex lung disease in untreated patients with stable course. *Eur Respir J.* 2017;49.
  13. Danho R, Schildkraut JA, Zweijpfenning SMH, et al. Mycobacterium Growth Indicator Tube Time-To-Positivity Can Serve As an Early Biomarker of Treatment Response in Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease. *Chest.* 2021.
  14. van Ingen J, Bendien SA, de Lange WC, et al. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax.* 2009;64:502-6.
  15. Cruciani M, Scarparo C, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of BACTEC MGIT 960 and BACTEC 460 TB, with or without solid media, for detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2321-5.
  16. van Ingen J, Aksamit T, Andrejak C, et al. Treatment outcome definitions in nontuberculous mycobacterial pulmonary disease: an NTM-NET consensus statement. *Eur Respir J.* 2018;51(3).
  17. Park J, Cho J, Lee C-H, Han SK, Yim J-J. Progression and Treatment Outcomes of Lung Disease Caused by Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense. *Clin Infect Dis.* 2016;64:301-8.
  18. Woods GL, Brown-Elliott BA, Conville PS, et al. CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence. Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute; 2011.
  19. Griffith DE, Brown-Elliott BA, Langsjoen B, et al. Clinical and molecular analysis of macrolide resistance in Mycobacterium avium complex lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:928-34.
  20. Griffith DE, Eagle G, Thomson R, et al. Amikacin Liposome Inhalation Suspension for Treatment-Refractory Lung Disease Caused by Mycobacterium avium Complex (CONVERT). A Prospective, Open-Label, Randomized Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2018;198:1559-69.
  21. Griffith DE, Thomson R, Flume PA, et al. Amikacin Liposome Inhalation Suspension for Refractory Mycobacterium avium Complex Lung Disease: Sustainability and Durability of Culture Conversion and Safety of Long-term Exposure. *Chest.* 2021;160:831-42.
  22. van Ingen J, Totten SE, Helstrom NK, Heifets LB, Boeree MJ, Daley CL. In vitro synergy between clofazimine and amikacin in treatment of nontuberculous mycobacterial disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:6324-7.
  23. Zweijpfenning SMH, Kops SEP, Boeree MJ, et al. Treatment of severe Mycobacterium avium complex pulmonary disease with adjunctive amikacin and clofazimine versus standard regimen alone, a retrospective study. *ERJ Open Research.* 2021:00466-2021.
  24. Diel R, Ringshausen F, Richter E, Welker L, Schmitz J, Nienhaus A. Microbiological and Clinical Outcomes of Treating Non- Mycobacterium Avium Complex Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Chest.* 2017;152:120-42.
  25. Park Y, Lee EH, Jung I, Park G, Kang YA. Clinical characteristics and treatment outcomes of patients with macrolide-resistant Mycobacterium avium complex pulmonary disease: a systematic review and meta-analysis. *Respir Res.* 2019;20:286.
  26. Diel R, Nienhaus A, Ringshausen FC, et al. Microbiologic Outcome of Interventions Against Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease: A Systematic Review. *Chest.* 2018;153:888-921.



# De toekomst van tuberculosediagnostics in Nederland

Jakko van Ingen, Arjan Jansz, Ed J. Kuijper, Alewijn Ott, Maarten Scholing, Jurriaan de Steenwinkel

Er is al jaren een daling in de incidentie van actieve tuberculose in Nederland gaande, van 6,4/100.000/jaar in 2010 tot 3,6/100.000/jaar (concreet 623 patiënten) in 2020 [1]. De basis voor de laboratoriumdiagnose tuberculose is een positieve kweek en/of een NAAT met een bevestiging en typering via het kweken van de bacteriën van het *Mycobacterium tuberculosis*-complex (*Mtb*). Vanwege van de veiligheid van laboratoriumpersoneel wordt deze kweek verricht in gespecialiseerde laboratoria waarin gewerkt wordt met specifieke veiligheids- en inperkingsmaatregelen, het zogeheten BioSafetyLevel 3 (BSL-3). Dit houdt onder andere in dat er gewerkt wordt in een alleen via een sluis te betreden afgescheiden ruimte met glad afgewerkte constructies van niet-absorberende materialen, waarin alle (werk)oppervlakken bestand zijn tegen reinigings- en ontsmettingsmiddelen en waarin een trapsgewijs opgebouwde onderdruk gehandhaafd wordt tussen laboratorium, sluis en de rest van het gebouw [2]. Op deze wijze kan bioveiligheid (zowel biosafety als biosecurity) bereikt worden.

## Wat doen Nederlandse medisch-microbiologische laboratoria?

Op basis van deelname aan rondzendingen van Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML) en eerdere enquêtes lijken er momenteel 28 medisch-microbiologische laboratoria te zijn die mycobacteriële diagnostiek uitvoeren in BSL-3-faciliteiten [3]; zeven hiervan zijn gevestigd binnen universitair medische centra. Een aantal van deze laboratoria is momenteel onderdeel van fusieplannen of -processen. De afname van BSL-3-faciliteiten valt samen met een al langer zichtbare trend. In het jaar 2000 waren er 44 laboratoria met een BSL-3-faciliteit voor tuberculosediagnostics [3], tijdens de laatste European Centers for Disease Control (ECDC) audit in 2019 was dit gereduceerd naar 31

[2,4,5]. Een rondgang langs de BSL-3-laboratoria leerde dat er in 2018 mediaan 1858 kweken per jaar (spreiding 500-5454) werden ingezet per laboratorium, door gemiddeld zeven analisten. Dit leverde mediaan 15 positieve kweken voor *M. tuberculosis*-complex-organismen op per laboratorium (spreiding 7-218), dus 1,7 procent kweekpositiviteit (spreiding 0,5-5,5 procent) en daarnaast mediaan 41 (spreiding 8-161) positieve kweken met niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) [3].

Dit past bij de geobserveerde stijging van het aantal infecties door niet-tuberculeuze mycobacteriën (NTM), tot een geschatte prevalentie van 2,3-5,9/100.000/jaar in 2019 [3,4]. Deze twee ontwikkelingen (minder *M. tuberculosis*-complex maar meer NTM) compenseren elkaar en kunnen er netto toe leiden dat het aantal materialen dat wordt aangeboden voor mycobacteriële kweken in het BSL-3-laboratorium niet verandert. Helaas zijn er over het exacte aantal aangeboden materialen over tijd in Nederland geen gegevens beschikbaar.

Los van het volume aan materialen is het waarschijnlijk dat de aard van de uit te voeren secundaire testen (identificatie, whole-genome sequencing, gevoelig-

Radboudumc, Nijmegen, afdeling Medische Microbiologie, dr. J. van Ingen, arts-microbioloog.

PAMM, Veldhoven, Laboratorium voor Medische Microbiologie, A. Jansz, arts-microbioloog.

LUMC, Leiden, afdeling Medische Microbiologie, prof. dr. E.J. Kuijper, arts-microbioloog, tevens werkzaam bij RIVM, Bilthoven, Centrum Infectieziekte-bestrijding.

Certe, Groningen, afdeling Medische Microbiologie, dr. A. Ott, arts-microbioloog.

OLVG Lab BV, Amsterdam, afdeling Medische Microbiologie, M. Scholing, arts-microbioloog.

Erasmus MC, Rotterdam, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, dr. J. de Steenwinkel, arts-microbioloog. Correspondentieadres: J. van Ingen (jakko.vaningen@radboudumc.nl).

heidsbepalingen) wel verandert op basis van ontwikkelingen in techniek en epidemiologie. De invoering en uitbreiding van whole-genome sequencing (WGS) en het gebruik voor identificatie en een voorspelling van de resistentie van *M. tuberculosis*-complexisolaten zal hierop ook invloed hebben. De algemene taak van de medisch-microbiologische laboratoria (MML's) in Nederland voor de diagnostiek van tuberculose is nu het uitvoeren van directe diagnostiek, dat wil zeggen microscopie en het gebruik van NAAT voor detectie van *M. tuberculosis*-complexbacteriën, eventueel gevolgd door moleculaire detectie van resistentiemutaties in het patiëntmateriaal. Kweek van mycobacteriën en daarmee ook fenotypische of genotypische (via WGS) gevoeligheidsbepalingen kunnen alleen in BSL-3-laboratoria worden verricht. De NVMM draagt daarbij zorg voor de ontwikkeling van richtlijnen, in samenwerking met het tuberculose-referentielaboratorium van het RIVM en het nationaal programma voor tuberculosebestrijding belegd bij het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM (RIVM/Cib). De meest recente richtlijn voor laboratoriumdiagnostiek van mycobacteriële infecties werd in 2015 gepubliceerd [5], met een officieus addendum over moleculaire detectie van resistentie in 2018. Er wordt momenteel binnen de NVMM een begin gemaakt met de vorming van een subwerkgroep Mycobacteriologie onder de Werkgroep Algemene Medische Microbiologie, om de expertises en inzichten te bundelen en de richtlijn te vernieuwen.

### De rol van het tuberculose-referentielaboratorium

Naast de klinische laboratoria staat het tuberculose-referentielaboratorium van het RIVM, dat zich primair richt op surveillance via moleculair-epidemiologische typeringen voor het nationale programma voor tuberculosebestrijding, maar ook op resistentiebepalingen. Met de invoering van WGS voor moleculair-epidemiologische typeringen en detectie van resistentiemutaties, is de rol van het tuberculose-referentielaboratorium van het RIVM uitgebreid. Vervanging van de fenotypische gevoeligheidsbepalingen door WGS zal, door het beschikbaar komen van deze techniek in steeds meer MML's en mogelijk gebruik voor meer (myco)bacteriën, ook leiden tot een herschikking van taken en diagnostische mogelijkheden. Afstemming tussen de MML's en het

referentielaboratorium rond thema's als rapportages voor epidemiologie en surveillance, maar ook kwaliteitstoetsing wordt dan ook steeds belangrijker.

Het referentielaboratorium is ook vertegenwoordigd bij diverse overlegstructuren in de tuberculosebestrijding, zoals de Commissie Praktische Tuberculosebestrijding (waarin ook de NVMM zitting heeft) en de MDR-TB-commissie. Het RIVM is lid van het internationale ECDC-netwerk van Europese tuberculose-referentielaboratoria, wat belangrijk is voor de internationale inbedding en het voeling houden met de internationale ontwikkelingen in de diagnostiek. In het kader van deze hoedanigheid worden jaarlijks vanuit het RIVM rondzendingen verzorgd in Europa en daarbuiten op het gebied van WGS voor tuberculose-referentielaboratoria.

### Hoe goed doen we het?

WHO en ECDC organiseren landenbezoeken om de hele keten van tuberculosezorg te auditeren. Uit het eerste landenbezoek in 2013 kwam een set aan verbeterpunten, met name voor de borging van de kwaliteit van de microbiologische diagnostiek [6]. De concrete aanbevelingen waren:

- Kweek en gevoeligheidsbepaling van *M. tuberculosis* zou beperkt moeten worden tot een geringer aantal laboratoria, met een richtlijn voor het minimum aantal te verrichten bepalingen om kwaliteit en expertise te borgen, ISO (of vergelijkbare) certificering en aantoonbare deelname aan kwaliteitsrondzendingen.
- Een formeel laboratoriumnetwerk moet worden ingericht, waarin voor alle deelnemers wordt vastgelegd welke diagnostische testen zij verrichten voor de tuberculosedagnostiek en waarin een herkenbaar referentielaboratorium wordt benoemd.
- Nieuwe positieve kweken met *M. tuberculosis*-complexisolaten dienen zo snel mogelijk naar het referentielaboratorium te worden gestuurd.
- Diagnostiek via NAAT-methoden dient altijd vergezeld te gaan van kweekdiagnostiek en gevoeligheidsbepalingen.
- De doorlooptijd van alle gebruikte methoden moet duidelijk vastgelegd zijn voor aanvragers en worden vervolgd.

Voor het formele laboratoriumnetwerk werd destijds door WHO/ECDC een structuur voorgesteld, die bestaat uit lokale laboratoria die microscopie en NAAT-detectie uitvoeren, regionale laboratoria die de kweken, en genotypische en fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor eerstelijns anti-tuberculose-middelen uitvoeren en een nationaal referentielaboratorium dat hieraan de gevoeligheidsbepalingen voor tweedelijnsmiddelen, verificaties van gevonden resistenties en moleculaire typering voor surveillance toevoegt. In een vervolfbezoek in 2019 was dit geen hoofd-onderwerp en werd slechts aangeraden de aandachtspunten uit 2013 te blijven verbeteren [7].

Een kernboodschap van WHO/ECDC is dat het wenselijk zou zijn om het aantal BSL-3-laboratoria voor tuberculosedagnostiek te reduceren en ze beter te laten samenwerken. De argumentatie daarvoor is niet expliciet omschreven [6], maar de recente survey toont aan dat de expositie aan positieve kweken met *M. tuberculosis*-complexorganismen per analist maar ook per arts-microbioloog in de huidige BSL-3-laboratoria laag is, met het risico op verlies van expertise en ervaring [3]. Er is weinig bewijs dat het terugbrengen van het aantal BSL-3-laboratoria direct bijdraagt aan kwaliteitsverbetering. Wel is, juist ook in Nederlands onderzoek, al langer aangetoond dat het risico op laboratoriumkruiscontaminaties door *M. tuberculosis*-complexbacteriën het grootst is in laboratoria die minder dan 3000 materialen op jaarbasis aangeboden krijgen voor kweek, in laboratoria die niet dagelijks maar batchgewijs inzetten en bij onvoldoende training van analisten [3,8,9].

De NVMM heeft zich gebogen over de vraag wat theoretisch de minimale monsterstroom moet zijn om een BSL-3-laboratorium actief te houden. In de ALV van 2014 is dit gesteld op 375 monsters per jaar; dit is ook vastgelegd in de NVMM-richtlijn Mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek in 2015 [5].

## Hoe is het geregeld voor andere BSL-3-pathogenen?

Er zijn meer bacteriële humane pathogenen die alleen onder BSL-3-condities in kweek gebracht mogen worden. Te denken valt aan *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella*-species en *Burkholderia pseudomallei*. Voor al deze pathogenen geldt dat moleculaire sneldiagnostiek beschikbaar is via het RIVM; kweken gebeuren lokaal, mits daar

BSL-3-faciliteiten, geschikte kweekmedia en identificatietechnieken beschikbaar zijn. Naast bovengenoemde bacteriën behoren sommige schimmels tot de BSL-3-klasse micro-organismen. *Histoplasma capsulatum* is bijvoorbeeld belangrijk in de differentiaaldiagnose van op tuberculose lijkende ziektebeelden vanwege overlap in beloop, endemische gebieden en radiologische en histologische presentatie. Voor al deze relatief zeldzame infecties gelden geen restricties voor laboratoria om monsters te kweken, zoals een minimum aantal diagnostiek-aanvragen per jaar.

## Andere voorbeelden van het centraliseren van microbiologische diagnostiek

Voor de opvang en diagnostiek van patiënten verdacht voor hemorrhagische koorts (door bijvoorbeeld het ebola- of lassavirus) zijn in Nederland vijf centra benoemd. Ook de diagnostiek van infecties door deze virussen is gecentraliseerd in twee centra (Erasmus MC en RIVM). Eenzelfde centralisatie werd ook georganiseerd bij het begin van de SARS-CoV-2-pandemie en is nu opnieuw actueel bij het benoemen van de opschalingslaboratoria; interessant hierin is dat het kunnen uitpakken van materialen die mogelijk een BSL-3-organisme bevatten een criterium is in de selectie van deze opschalingslaboratoria [10]. Het centraliseren van diagnostiek voor infectieziekten is dus niet nieuw; de vraag is alleen of dit nodig of wenselijk is voor de kweekdiagnostiek van tuberculose (en daarmee ook NTM-infecties).

## Kritische beschouwing

Er wordt al langer geadviseerd door WHO en ECDC om het aantal BSL-3-laboratoria voor de tuberculosedagnostiek in Nederland te verminderen. Vanuit het oogpunt van een teruglopende incidentie en zorgen over de kwaliteit van diagnostiek is dit invoelbaar. De Nederlandse situatie is echter wel uniek. Het programma voor tuberculosebestrijding is geen aparte pijler in de zorg met een centrale regie, maar deze is ingebed in breder functionerende structuren, zoals de GGD's, ziekenhuizen en de MML's. De MML's nemen een bijzondere plaats in omdat zij deels zelfstandige entiteiten zijn en deels ingebed zijn in ziekenhuizen, en omdat zij wel voor maar niet in opdracht van het nationaal programma voor tuberculosebestrijding werken. MML's en de

Nederlandse microbiologie zijn verbonden via de beroepsvereniging NVMM en belangenvereniging VMML. Helaas is daarbinnen nog geen netwerkstructuur voor de tuberculosedagnostiek, evenmin als een formele relatie met het tuberculosereferentielaboratorium. Deze twee aspecten worden zorgelijk bevonden in de internationale audits. Toch betekent dit geenszins dat er een probleem is in de kwaliteit van tuberculosedagnostiek in Nederland. In onze MML's wordt door hoogopgeleid personeel en met behulp van zelf opgestelde richtlijnen en nationale en internationale programma's voor externe kwaliteitscontrole (SKML, QCMD, UKNEQAS, INSTAND) gestreefd naar optimale kwaliteit.

De eerste vraag is dus of we nog beter kunnen worden als we met minder laboratoria de BSL-3-tuberculosedagnostiek uitvoeren. Als dit zo is, dan vraagt dat offers. De BSL-3-laboratoria zijn onderdeel van MML's en het sluiten van BSL-3-laboratoria voor onder andere tuberculosedagnostiek leidt tot een verschraving van de beroepsuitoefening en een potentieel verlies van kennis en kunde. Daarnaast zijn er financiële consequenties. Een BSL-3-faciliteit is kostbaar en vermindering kan tot besparing leiden. Maar minder BSL-3-laboratoria vergroot mogelijk de kwetsbaarheid bij uitval van een laboratorium of plotselinge toename van de vraag naar BSL-3-capaciteit bij uitbraken. De vraag is dan in hoeverre de voordelen, zoals meer expertise door schaal-vergroting, eenvoudiger nationale afstemming en betaalbaar houden van het zorgsysteem hiertegen opwegen.

De tweede vraag is wat de impact zal zijn van whole-genome sequencing / next-generation sequencing; deze techniek heeft de diagnostiek en met name de resistentiedetectie van *M. tuberculosis*-complex compleet veranderd. Met de toenemende betaalbaarheid en afnemende complexiteit van benodigde infrastructuur van deze techniek zal deze nog meer gebruikt worden in MML's die nu ook al BSL-3-faciliteiten hebben. Daarnaast zijn er technische ontwikkelingen die deze techniek toepasbaar maken op directe patiëntmaterialen, waardoor de noodzaak tot kweken en dus BSL-3-faciliteiten mogelijk afneemt [11]. De kwaliteitsborging van deze moleculaire next-generation sequencing-bepalingen wordt dan erg belangrijk. Daarbij is de vraag of de rol van het tuberculosereferentielaboratorium van het RIVM, dat nu nog deze test routinematig en gratis aanbiedt, gaat verschuiven naar een meer faciliterende en

coördinerende rol. Te denken valt aan het aanbieden van een centrale databank waarin elders verkregen genomesequenties met een 'eenheid van taal'-principe kunnen worden opgeslagen om zowel identificatie als resistentiedetecties te vervolgen, maar ook om nog meer real-time aan surveillance (inclusief kruiscontaminaties in het laboratorium) te kunnen werken. Doordat het directe diagnostiek is lijkt een dergelijke bepaling ook dicht bij de patiënt zijn plaats te moeten hebben. Dit is mogelijk een goede aanleiding om de door WHO/ECDC zo gewenste afspraken rondom verdeling van taken alsnog van de grond te krijgen. De afnemende incidentie van tuberculose roept vragen op over verdergaande centralisatie van diagnostiek, naast bijvoorbeeld het aanbieden van nationaal of regionaal gecentraliseerd onderwijs voor analisten en artsen-microbioloog in opleiding of het gezamenlijk valideren van nieuwe testen. De huidige bewegingen in het landschap van MML's leidt al tot concentratie van tuberculosekweken. In een mycobacteriologie-werkgroep binnen de NVMM/WAMM kunnen alle genoemde vraagstukken, maar ook andere WHO/ECDC-suggesties geadresseerd worden.

## Referenties

1. Slump E, van Beurden KM, van den Boogaard J, et al. Tuberculose in Nederland 2020. Beschikbaar via: <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/2021-0192.pdf>
2. Werkgroep TB diagnostiek NVMM. Veilig werken aan betere kwaliteit. Laboratoriumdiagnostiek van tuberculose in de praktijk. NVMM, 2011.
3. Mourik BC, Kuijper E, van Ingen J, de Steenwinkel J, de Vries G, van Soelingen D. Ned Tijdschr Med Microbiol. 2020;28: 38-40.
4. Schildkraut JA, Zweijffening SMH, Nap M, et al. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in the Netherlands. ERJ Open Res. 2021;7:00207-2021.
5. NVMM Richtlijn Mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek. NVMM, 2015. Beschikbaar via [www.nvmm.nl](http://www.nvmm.nl).
6. World Health Organization and European Centers for Disease Control. Report of the joint WHO and ECDC programme review of the national TB control programme in the Netherlands, 30 September – 4 October 2013. Geneva: WHO; 2014.
7. European Centre for Disease Prevention and Control. Tuberculosis in the Netherlands – Report of the joint ECDC and WHO review of the tuberculosis prevention and care system in the Netherlands, 24–28 June 2019. Stockholm: ECDC; 2020.
8. de Boer AS, Blommerde B, de Haas PE, et al. D. False-positive Mycobacterium tuberculosis cultures in 44 laboratories in The Netherlands (1993 to 2000): incidence, risk factors, and consequences. J Clin Microbiol. 2002;40: 4004-9.
9. Martín A, Herranz M, Lirola MM, et al. Optimized molecular resolution of cross-contamination alerts in clinicalmyco-bacteriology laboratories. BMC Microbiol. 2008;8:30.
10. LCI Richtlijn COVID-19, bijlage, update 11-01-2022. Beschikbaar via: <https://lci.rivm.nl/covid-19/bijlage/aanvullend>
11. Cabibbe AM, Spitaleri A, Battaglia S, et al. Application of Targeted Next-Generation Sequencing Assay on a Portable Sequencing Platform for Culture-Free Detection of Drug-Resistant Tuberculosis from Clinical Samples. J Clin Microbiol. 2020;58: e00632-20.



# Epidemiologie en laboratoriumdiagnostiek van *Nocardia*-infecties in Nederland

Iris Tabak, Karola Waar, Jakko van Ingen

## Inleiding

*Nocardia*-bacteriën zijn aerobe actinomyceten. Het genus *Nocardia* bestaat inmiddels uit 119 officieel erkende species, waarvan er een groot aantal bekend staan als opportunistische pathogenen. De klinische manifestaties van *Nocardia*-infecties variëren van huidinfecties na traumatische inoculatie, longinfecties bij onderliggend longlijden tot gedissemineerde infecties bij ernstig immuungecompromitteerden. De gedissemineerde infecties zijn berucht om de frequente betrokkenheid van het centraal zenuwstelsel, met hersenabcessen als voorname manifestatie [1].

De laboratoriumdiagnostiek van *Nocardia*-infecties is uitdagend, vanwege de lange incubatieduur, moeizame identificatie en taxonomie en de lastig te interpreteren gevoeligheidsbepalingen, waarvoor nog geen EUCAST-consensusmethode bestaat.

Om inzicht te krijgen in de isolatiefrequentie van *Nocardia*-species en de huidige praktijk van identificatie en gevoeligheidsbepalingen, is er in juni/juli 2021 een survey uitgestuurd via de Werkgroep Algemene Medische Microbiologie van de NVMM.

De vragen betroffen a) informatie over het aantal geïsoleerde *Nocardia*-stammen in 2019 en 2020, b) of identificaties en gevoeligheidsbepalingen van *Nocardia*-species werden uitgevoerd en c) of en hoe deze werden uitgevoerd.

## Uitkomsten

Van de 48 medisch-microbiologische laboratoria in de NVMM-databank (via [www.nvmm.nl](http://www.nvmm.nl)) reageerden er 29 op de survey. De 28 deelnemende centra die informatie gaven over isolatiefrequentie vonden in totaal bij 53 patiënten *Nocardia*-isolaten in 2019 (gemiddeld per laboratorium 1,89, bereik 0-7) en bij 55 patiënten in 2020 (gemiddeld 1,96, bereik 0-7). Extrapolerend naar het totaal aantal laboratoria (48) zou dat neerkomen op 91 en 94 patiënten met isolaten in 2019 en 2020 in

heel Nederland. Op basis van de populatiegetallen voor 2019 (17,282,163) en 2020 (17,407,585) van het Centraal Bureau voor de Statistiek (via [www.cbs.nl](http://www.cbs.nl)) is de geschatte incidentie van *Nocardia*-isolatie 0,53/100,000/jaar in 2019 en 0,54/100,000/jaar in 2020.

De meeste centra die aan de enquête deelnamen, voeren de identificatie van *Nocardia*-isolaten zelf uit (26/29; 90 procent), hoewel vier van deze centra wel isolaten doorsturen naar andere centra voor confirmatie. Malditof is de meest gebruikte methode voor identificatie (24/26; 92 procent).

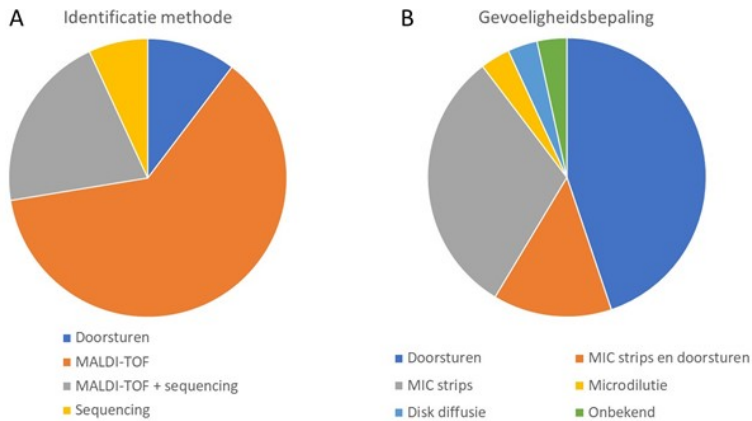
Bij 18 centra (inclusief de vier centra die op indicatie doorsturen voor sequencing) is dit de enige methode van identificatie, zes centra combineren dit met sequencing van één of meerdere genen. Twee centra identificeren via sequencing van 16S of andere, niet-gespecificeerde, targets ( $n = 1$ ) of het hele genoom ( $n = 1$ ). Deze uitkomsten zijn gevisualiseerd in *figuur 1A*.

Gevoeligheidsbepalingen van *Nocardia*-isolaten worden in de meerderheid van de gevallen uitgevoerd door externe centra, en niet door de laboratoria zelf. Twaalf centra doen zelf de gevoeligheidsbepalingen (negen via MIC-strips, één middels diskdiffusie, één middels microdilutie en één zonder opgave van methode), vier centra gaven aan zelf te screenen middels MIC-strips en daarnaast door te sturen naar elders voor aanvullende bepalingen. De overige 13 centra gaven aan isolaten altijd door te sturen voor gevoeligheidsbepalingen (*figuur 1B*).

Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen, mw. I. Tabak, masterstudent microbiologie, dr. J. van Ingen, arts-microbioloog.  
IZORE Laboratorium voor Infectieziekten Friesland, Leeuwarden, mw. K. Waar, arts-microbioloog.  
Correspondentieadres: dr. J. van Ingen ([jakko.vaningen@radboudumc.nl](mailto:jakko.vaningen@radboudumc.nl)).



**Figuur 1.** Verdeling van strategieën voor (A) identificatie en (B) gevoeligheidsbepalingen voor *Nocardia*-isolaten onder deelnemers aan de survey.



Kweekbevestigde *Nocardia*-infecties zijn relatief zeldzaam in Nederland, met een geschatte incidentie van 0,5/100.000/jaar. Goede diagnostiek is essentieel om tot een adequate behandeling te komen. In Nederland is malditof de meest gebruikte techniek, door sommige centra bevestigd door sequensen. Wanneer alleen sequensen wordt gebruikt voor identificatie is het van groot belang om over goede databanken te beschikken; publieke databanken zoals van het NCBI zijn niet op kwaliteit gecontroleerd en bevatten voor sommige targets/genen maar weinig sequenties, wat de identificatie van met name de zeldzamere species belemmert [1]. De kwaliteit van malditofidentificaties is ook afhankelijk van de beschikbare databanken; deze waren initieel matig voor *Nocardia*-species, maar zijn inmiddels sterk verbeterd [1,2]. Zeker bij het vinden van zeldzame *Nocardia*-species wordt confirmatie via sequensen van een of meer genen geadviseerd [1]. Het identificeren van *Nocardia*-species op basis van whole-genome sequencing is nog onvoldoende gevalideerd (slechts beschreven in case reports) [1].

### MIC-strips of microdilutie?

De gevoeligheidsbepaling wordt door veel laboratoria met MIC-strips uitgevoerd. De prestaties van MIC-strips, afgezet tegen microdilutie als gouden standaard, zijn wisselend in studies. In een studie door Biehle en collega's was de categorische overeenkomst (gevoelig, intermediair, resistent) over het geheel 96

procent [3], maar in een studie in Zuid Afrika door Lowman en collega's was de categorische overeenkomst zeer wisselend per antibioticum, tussen 67 en 100 procent; met name voor amikacine, claritromycine en imipenem werden 'very major errors' gezien, met als gevolg interpretatie van MIC-strips als gevoelig, waar de gouden standaard (microdilutie) resistentie toonde [4].

Op basis van eerder vastgestelde goede reproduceerbaarheid [5] adviseert CLSI momenteel het gebruik van microdilutie [6], maar dit is een kostbare bepaling en niet altijd makkelijk in te passen in de praktijk. Het gebruik van MIC-strips is daarom verdedigbaar, zeker als screeningsmethode [1]. Bij gevoeligheidspatronen die afwijken van wat voor het species de norm is, kan worden doorgestuurd voor confirmatie via microdilutie. EUCAST werkt momenteel aan een methode voor *Nocardia*-gevoeligheidsbepalingen [1].

### Conclusie

Deze survey biedt inzicht in de stand van zaken van *Nocardia*-isolatie en gehanteerde technieken voor identificatie en gevoeligheidsbepalingen. Uitdagingen voor de toekomst zijn het verbeteren van malditof en (whole-genome) sequentiedatabanken en het beter standaardiseren van de gevoeligheidsbepaling, bij voorkeur met richtlijnen van EUCAST. Dat biedt uiteindelijk ook de kans om de relatie tussen in vitro gevoeligheid en de uitkomst van therapie in vivo beter in kaart te brengen.

## Referenties

1. Margalit I, Lebeaux D, Tishler O, et al. How do I manage nocardiosis? *Clin Microbiol Infect.* 2021;27:550-58.
2. Blosser SJ, Drake SK, Andrasko JL, et al. Multicenter Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Study for Identification of Clinically Relevant *Nocardia* spp. *J Clin Microbiol.* 2016;54:1251-8.
3. Biehle JR, Cavalieri SJ, Saubolle MA, Getsinger LJ. Comparative evaluation of the E test for susceptibility testing of *Nocardia* species. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1994;19:101-10.
4. Lowman W, Aithma N. Antimicrobial susceptibility testing and profiling of *Nocardia* species and other aerobic actinomycetes from South Africa: comparative evaluation of broth microdilution versus the Etest. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4534-40.
5. Conville PS, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr, et al. Multisite reproducibility of the broth microdilution method for susceptibility testing of *Nocardia* species. *J Clin Microbiol.* 2012;50:1270-80.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Susceptibility testing of mycobacteria, nocardiae, and other aerobic actinomycetes; Approved standard, third edition M24-A3. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.

# The Times They Are A-Changin'

## Uitbraken van voedselinfecties onder de loep

Eelco Franz, Menno van der Voort, Roan Pijnacker, Coen van der Weijden, Thijs Bosch

### Samenvatting

Regelmatig vinden er in Nederland landelijke voedselgerelateerde uitbraken plaats met gastro-intestinale ziekteverwekkers zoals *Salmonella*, *Listeria*, of shigatoxineproducerende *E. coli* (STEC). Deze uitbraken kunnen worden gedetecteerd dankzij een nationale kiemsurveillance die door het RIVM wordt uitgevoerd op basisstammen die worden ingestuurd door medisch-microbiologische laboratoria. Bij een uitbraak wordt samen met de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) en Wageningen Food Safety Research (WFSR) bronopsporing uitgevoerd. Bij het RIVM wordt whole-genome sequencing (WGS) gebruikt als standaard-typeringsmethode zodat clusters en uitbraken beter herkend kunnen worden. Ook stammen uit voedsel worden in toenemende mate door WFSR getypeerd met WGS, die worden gedeeld en samengebracht met de WGS-data van patiënten. Wanneer een stam uit voedsel op basis van WGS overeenkomt met die van patiënten kan nu sneller actie worden ondernomen als het gaat om opsporing en eventuele uitschakeling van de bron. Een ontwikkeling naar meer moleculaire diagnostiek die niet gevolgd wordt door kweek is een belangrijke bedreiging voor de landelijke surveillance en bronopsporing.

### Summary

National food-related outbreaks with enteric pathogens such as *Salmonella*, *Listeria*, or Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) occur in the Netherlands on a regular basis. These outbreaks can be detected thanks to a national isolate-based surveillance carried out by RIVM based on isolates submitted by medical microbiological laboratories. In the event of an outbreak, source tracing is carried out together with the Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA) and Wageningen Food Safety Research (WFSR). Whole-genome sequencing (WGS) is used as a standard

typing method at RIVM so that clusters and outbreaks can be better identified. Also strains from food are increasingly typed by WFSR with WGS which are shared in real-time and brought together with the WGS data of patients. When a strain from food matches that of patients, based on WGS, action can now be taken more quickly regarding the identification and possible elimination of the source. A development towards more molecular diagnostics that is not followed by culture is an important threat to national surveillance and source detection.

### Inleiding

Regelmatig vinden er in Nederland voedselgerelateerde uitbraken plaats met gastro-intestinale ziekteverwekkers. Jaarlijks gaat het om ruim 700 geregistreerde voedselgerelateerde uitbraken en rond de 700.000 voedselgerelateerde infecties in Nederland met een totaal aan maatschappelijke kosten van 170 miljoen euro [1]. Sommige uitbraken zijn zo omvangrijk of bijzonder vanwege bijvoorbeeld economische schade [2] dat er naast wetenschappelijke belangstelling ook aanzienlijke aandacht in de media is, zoals bij de uitbraak van *Salmonella enteritidis*

Centrum Infectieziektebestrijding, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), afdeling Epidemiologie en Surveillance Enterale Infecties en Zoönosen, dr. E. Franz, afdelingshoofd.  
Wageningen Food Safety Research (WFSR), dr. M. van der Voort, programmaleider Microbiologie en projectleider Genomics; dr. R. Pijnacker, epidemioloog enterale infecties en zoönosen; afdeling Bacteriële en Parasitologische Diagnostiek, dr. T. Bosch, afdelingshoofd.  
Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA), ing. C.C. van der Weijden, senior inspecteur Microbiologie. Correspondentieadres: dr. E. Franz (eelco.franz@rivm.nl).

geassocieerd met Poolse eieren in 2016/2017 [3] of de *Listeria*-uitbraak afkomstig van één specifieke productiefaciliteit [4]. In Nederland vindt intensieve monitoring en surveillance plaats om trends te monitoren, risico's te inventariseren en uitbraken vroegtijdig te signaleren. Hierbij werken het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) en Wageningen Food Safety Research (WFSR) intensief samen. In dit artikel geven wij een overzicht hoe we door middel van de huidige technieken landelijk surveillance uitvoeren op voedselinfecties, hoe we in samenwerking uitbraken detecteren en traceren naar de bron, en hoe we het toekomstige surveillance-landschap zien in het licht van de huidige ontwikkelingen en trends.

## Landelijke surveillance humane infecties

Het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM heeft de opdracht van het Ministerie van VWS om adequate surveillance en onderzoek uit te voeren naar gastro-enterale infecties (inclusief voedselinfecties) in Nederland. Landelijke surveillance vormt de basis van vroegtijdige signalering van verheffingen en uitbraken van voedselgerelateerde infecties. Voor een aantal ziekteverwekkers bestaat een meldplicht, voor andere is een laboratoriumsurveillance, kiemsurveillance of combinatie daarvan ingericht.

### Meldplicht

De meldplicht is als instrument opgenomen in de Wet publieke gezondheid om de verspreiding van bepaalde ernstige en/of uitbraakgevoelige infectieziekten te voorkomen. De meldplicht schrijft voor dat artsen en medisch-microbiologische laboratoria deze infectieziekten melden aan de Gemeentelijke Gezondheidsdienst (GGD). De GGD spoort de bron van de infectie op en gaat na of contacten van de patiënt risico lopen op een besmetting. Daarna kan de GGD maatregelen nemen ter bescherming van contacten en ter preventie van verspreiding van de ziekte. In het geval van voedselgerelateerde uitbraken wordt vaak intensief samengewerkt met de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA). Wat betreft de voedselgerelateerde infecties is er een meldplicht voor shigatoxineproducerende *E. coli* (STEC), *Listeria* en hepatitis A. Daarnaast is er een meldplicht voor voedselgerelateerde uitbraken waarbij meer dan twee personen betrokken zijn door een aannemelijk

epidemiologisch verband met eenzelfde voedselbron. De criteria voor het verplicht melden van voedseloverdraagbare en andere enterale ziekteverwekkers zijn te vinden op <https://lci.rivm.nl/meldingsplichtige-ziekten>.

### Laboratoriumsurveillance

Voor een aantal pathogenen zonder meldplicht wordt surveillance uitgevoerd door informatie te verzamelen vanuit het netwerk van medisch-microbiologische laboratoria (MML's). De laboratoriumsurveillance voor virale infecties (zoals norovirus en hepatitis E) bestaat uit het monitoren van trends in de virologische weekstaten ([www.rivm.nl/virologische-weekstaten](http://www.rivm.nl/virologische-weekstaten)). Wat betreft bacteriële ziekteverwekkers wordt er laboratoriumsurveillance uitgevoerd voor *Campylobacter* via de landelijke surveillance-databank voor antibioticumresistentie ISIS-AR, waarbij aantallen positieven, beperkte epidemiologische gegevens en antibioticumresistentiedata van *Campylobacter* verzameld worden.

### Kiemsurveillance

Voor een tijdige en adequate bestrijding van voedselinfecties is het noodzakelijk om zicht te hebben op circulerende pathogentypen. Kiemsurveillance (= fenotypische en/of genotypische detailkarakterisering van het pathogeen volgend op de primaire diagnostiek) speelt hierbij een belangrijke rol. Dit maakt het ook mogelijk om clusters en uitbraken te detecteren. Voor hepatitis A (<https://www.rivm.nl/en/havnet>), hepatitis E (<https://www.rivm.nl/en/hevnet>) en norovirus (<https://www.rivm.nl/en/noronet>) wordt genotypische informatie gegenereerd en verzameld via de zogeheten moleculaire platforms. Dit geldt ook voor niet-humane monsters om inzicht te krijgen in potentiële bronnen en transmissieroutes. Voor de meldingsplichtige ziekteverwekker STEC vindt een kiemsurveillance plaats waarbij MML's op vrijwillige basis isolaten naar het RIVM kunnen sturen, waar deze bevestigd en getypeerd worden. Voor *Listeria*, ook meldingsplichtig, vindt kiemsurveillance plaats in samenwerking met het Nationaal Referentielaboratorium voor Bacteriële Meningitis (NRLBM) bij het Amsterdam UMC. Isolaten worden door het NRLBM naar het RIVM gestuurd voor verdere typering ten behoeve van nationale surveillance. Voor *Salmonella* (geen meldingsplicht) bestaat een landelijke kiemsurveillance waarbij, net zoals bij STEC, isolaten door medisch-micro-

biologische laboratoria op vrijwillige basis naar het RIVM kunnen worden gestuurd, waar deze bevestigd en getypeerd worden. Voor *Campylobacter* is in 2021 begonnen met een landelijke kiemsurveillance waarbij zeven grotere MML's isolaten naar het RIVM sturen voor verdere typering ten behoeve van landelijke clusterdetectie.

## Monitoring voedselketen

Het wettelijke stelsel van voedselveiligheid in Nederland heeft een sterke basis in de Europese en nationale regelgeving. Uitgangspunt van het stelsel is dat de verantwoordelijkheid voor veilig voedsel bij het bedrijfsleven ligt. Dit is wettelijk vastgesteld in de zogeheten Algemene Levensmiddelen Verordening (ALV), die de basis vormt voor het stelsel van de voedselveiligheidsvoorschriften in de Europese Unie (EU). De NVWA ziet erop toe dat bedrijven in de voedselketen zich houden aan de wettelijke vereisten voor productie, transport en handel van veilig voedsel. De hele voedselketen van zowel de plantaardige als dierlijke voedselproductie valt onder dit toezicht.

De ALV (EG nr. 178/2002) maakt het mogelijk schadelijke producten van de markt te weren, en een specifieke verordening (EG nr. 2073/2005) inzake microbiologische criteria geeft aan welke specifieke criteria voedsel minimaal moet voldoen. Voor STEC geldt het criterium van afwezigheid van de serotypen O157, O104:H4, O26, O111, O103, en O145 in kiemgroenten. Dit is naar aanleiding van de grote uitbraak van STEC O104:H4 in Duitsland in 2011 [5]. De monitoring en bestrijding van *Salmonella* begint al in de primaire keten en is op Europees niveau gereguleerd in Verordening (EG) nr. 2160/2003 en de daarop gebaseerde uitvoeringsverordeningen (EG) nr. 200/2010 en (EG) nr. 517/2011. Deze verordeningen bevatten een monitorings- en meldplicht voor verschillende delen van de pluimveeketen (legkoppels, vleeskuikens en vermeerderingskoppels).

Voor voedsel gelden verschillende veiligheidsregels. In gehakt vlees en bereid vlees van pluimvee en andere diersoorten mag geen enkel *Salmonella*-serotype worden aangetroffen. Dat geldt ook voor andere typen levensmiddelen dan vlees waarbij de verwachting is dat ze zonder afdoende verhitting kunnen worden geconsumeerd (groenten, verse kruiden, zuivel, et cetera). Op rauw naturel pluimveevlees mag geen *S. enteritidis* en *S. typhi-murium* aanwezig zijn. Voor alle andere typen rauw vlees (waarbij de verwachting is dat

ze met afdoende verhitting worden geconsumeerd) geldt geen eis voor niet aantoonbaar zijn van *Salmonella*. Voor *Listeria* geldt een drempelwaarde-criterium, waarbij in kant-en-klare levensmiddelen die als voedingsbodem voor *L. monocytogenes* kunnen dienen (met uitzondering van zuigelingenvoeding en voeding voor medisch gebruik, waarin *Listeria* helemaal niet aanwezig mag zijn) *L. monocytogenes* aanwezig mag zijn onder 100 kolonievormende eenheden per gram voor de duur van de houdbaarheidstermijn. Producenten moeten kunnen aantonen ('challenge'-testen) dat *Listeria* gedurende de houdbaarheidstermijn niet kan uitgroeien tot boven de grenswaarde.

## Whole-genome sequencing

Sinds de opkomst van whole-genome sequencing (WGS)-technieken in 2016, waarbij vrijwel het hele genoom van een bacterie in kaart kan worden gebracht, worden deze voor de surveillance van voedselinfecties steeds meer gebruikt.

Het grote voordeel van WGS is dat deze ons in staat stelt om met een universele en reproduceerbare methode diverse klassieke (moleculair-)microbiologische technieken te bundelen en zowel vaker als sneller individuele uitbraken te identificeren. In eerste instantie werd WGS vooral toegepast als verdiepende techniek bij onderzoek van epidemische verheffingen. Clusters die waren gevonden met MLVA (Multi Locus Variable-number of tandem repeats Analysis) werden verder bekeken met WGS, vanwege het hogere onderscheidend vermogen van WGS.

Doordat WGS goedkoper is, is dit sinds 2019 de primaire techniek voor typering en karakterisering van voedselinfecties en vervangt het zowel de klassieke moleculaire typeringen zoals PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) en MLVA, maar ook de serologische O- en H-typeringen.

Bij het RIVM bestaat de huidige workflow uit kweek, gevolgd door DNA-isolatie en sequensen op de Illumina NextSeq. De gehele WGS-workflow is gevalideerd volgens de ISO 15189-norm en sinds 2021 vindt alle typering en karakterisering plaats onder accreditatie. In 2021 zijn op deze manier ruim 3000 isolaten van bacteriële voedselinfecties geanalyseerd. Bij WFSR wordt vanaf 2017 WGS ingezet voor alle *L. monocytogenes* en STEC-isolaten. Het sequensen wordt hierbij onder ISO 17025-accreditatie uitbesteed, en de analyseworkflow is gevalideerd. Hiermee is ook



de klassieke serotypering en moleculaire typering op basis van PFGE voor deze voedselisolaten komen te vervallen.

### Clusterdetectie en uitbraakonderzoek

De belangrijkste functie van de landelijke surveillancestructuren is het vroegtijdig detecteren van regio-overschrijdende clusters van patiënten. Bij zeldzame pathogenen is de meldplicht een goed middel voor de detectie van (zelfs kleine) verheffingen (meer gevallen dan verwacht op basis van langjarige gemiddelden), maar bij meer algemeen voorkomende pathogenen vallen verheffingen minder snel op. Ook komt het voor dat er geen verheffing is in het aantal gevallen van een bepaald pathogeen maar dat er wel clusters zijn van patiënten met een gemeenschappelijke infectiebron (specifiek voedings-middel, locatie, et cetera). Dit wordt zichtbaar met de WGS-data van de kiemsurveillance: patiënten met een identiek isolaat hebben hoogstwaarschijnlijk eenzelfde bron van infectie.

Op het moment dat een cluster/uitbraak wordt gedetecteerd, neemt het RIVM voor elk geval contact op met de dienstdoende arts-microbioloog van het insturende-medisch-microbiologisch laboratorium. Vervolgens wordt de GGD gevraagd contact op te nemen met de behandelend arts en de patiënt om een voedselconsumptievragenlijst af te nemen voor een patiënt-controleonderzoek. Doel van dat onderzoek is consumptiepatronen te identificeren die significant vaker voorkomen bij patiënten dan bij controles (en dus een mogelijke bron van infectie zijn). Bij grotere, langdurigere uitbraken kan de vragenlijst ingekort worden en meer toegesneden zijn naar aanleiding van resultaten die eerder in de uitbraak bekend zijn geworden. Op het moment dat er een specifiek product en/of specifieke locatie uit het onderzoek naar voren is gekomen, verschuift het zwaartepunt van het uitbraakonderzoek naar de NVWA (die vanaf het begin van de uitbraak betrokken wordt). De NVWA neemt monsters in de voedselketen, die geanalyseerd worden door WFSR. Wanneer isolaten worden gevonden die identiek zijn aan de patiëntisolaten, is dit een sterke aanwijzing voor de bron. Op basis van aanvullend onderzoek (zoals hygiënestatus van het bedrijf, historie, et cetera) zal de NVWA passende maatregelen nemen. Deze kunnen variëren van hygiëne maatregelen en terugroepacties tot publiekswaarschuwingen en sluiting van bedrijven.

Voorbeelden van grootschalige uitbraakonderzoeken zijn de *Salmonella*-thompsonuitbraak in 2012 geassocieerd met gerookte zalm, waarbij meer dan duizend patiënten waren betrokken [6], een uitbraak met *Salmonella* bovismorbificans gerelateerd aan rauwehamproducten [7], en de uitbraak van *Salmonella enteritidis* geassocieerd met Poolse eieren, waarbij 18 verschillende Europese landen meer dan 800 gevallen rapporteerden [3].

Naast de respons op uitbraken heeft clusterdetectie op basis van WGS in sommige gevallen een preventieve functie. Een goed voorbeeld hiervan is het vervolgen van *Listeria*. Door WGS wordt voor de NVWA zichtbaar of specifieke *Listeria*-stammen persisteren in de productieomgeving. Daar kan een producent op gewezen worden, zodat die vervolgens verbeterde schoonmaakprocedures kan implementeren en erger (een uitbraak) kan voorkomen.

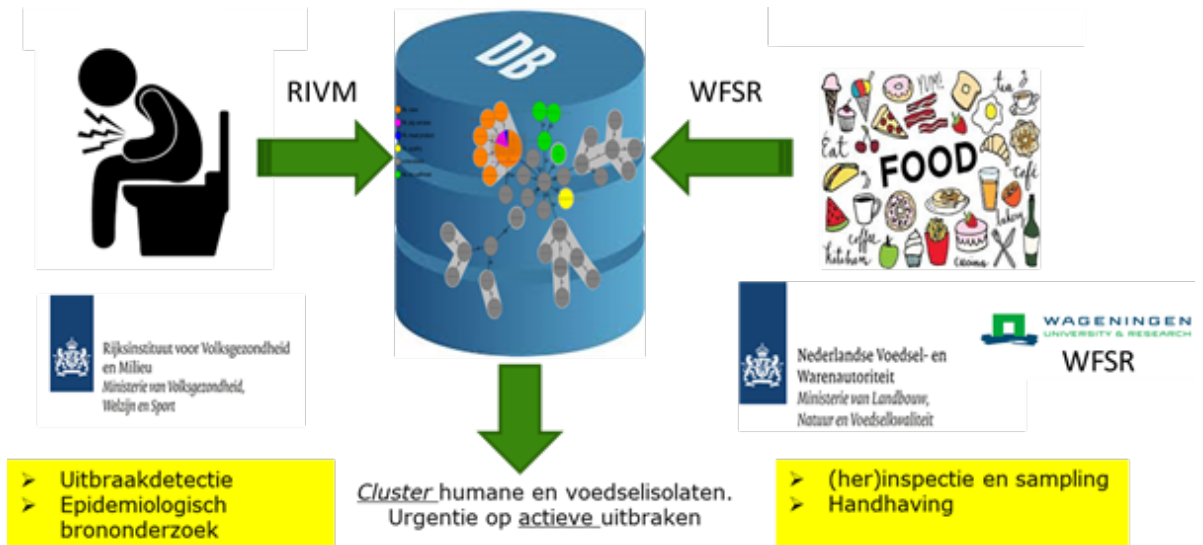
### Het delen van data

Een van de grote voordelen van WGS is dat deze techniek ondubbelzinnige data genereert die eenvoudig tussen laboratoria en landen gedeeld kunnen worden. Dit maakt dat genetische informatie van stammen bij potentiële uitbraken en bron- en contactonderzoek sneller gedeeld kan worden. Sinds 2017 werken RIVM, NVWA en WFSR met een gedeelde databank waarin WGS-data van isolaten afkomstig uit de humane surveillance en de monitoring in voedsel bij elkaar komen en gezamenlijk worden geanalyseerd op clusters (*figuur 1*). Een groot voordeel hiervan is dat wanneer sequenties van actieve humane clusters overeenkomen met sequenties van voedselisolaten, zeer snel actie kan worden ondernomen, in plaats van te wachten op de uitkomsten van een patiëntcontroleonderzoek. Een voorbeeld hiervan is de *Listeria*-uitbraak die plaatsvond van 2017 tot 2019 en gerelateerd was aan vleeswaren [4]. Daarnaast worden bij grensoverschrijdende uitbraken WGS-data uit de surveillance en monitoring ad hoc gedeeld met de European Centre for Disease Control (ECDC) en de European Food Safety Authority (EFSA).

### Toekomst

Nu de surveillance van voedselinfecties volledig wordt uitgevoerd op basis van WGS zijn er diverse mogelijkheden voor toekomstige toepassingen. Ten

Figuur 1. RIVM en NVWA delen WGS-data voor geïntegreerde surveillance van voedselinfecties.



eerste werken wij aan een nog uitgebreidere karakterisering van isolaten. Zo zal op korte termijn naast een genotypering ook een in silico-resistentieprofiel gegenereerd worden van elk isolaat. Met deze gegevens kunnen we niet alleen de circulatie van (geno)typen maar ook de trends van circulerende resistentiegenen vervolgen in onze surveillance. Een andere stap is het detecteren van eventuele virulentiekenmerken met WGS zodat we ook de diverse op PCR gebaseerde methoden kunnen vervangen door WGS. Een voorbeeld hiervan zijn de diverse virulentiegenen bij *E. coli* zoals de shigatoxinen.

Ten tweede werken we aan een verdere OneHealth-benadering van onze surveillance. Door het universele karakter van de WGS kunnen data van diverse bronnen (voedsel, dieren en humaan) eenvoudig gecombineerd worden in een gedeelde databank. Deze gecombineerde datasets bieden niet alleen voordelen voor surveillance en uitbraak-onderzoek (zoals hierboven beschreven) maar ook mogelijkheden voor onderzoek om beter inzicht te krijgen in de evolutie, ecologie, en het relatieve belang van reservoirs.

Ten slotte bieden de verbeterde toegankelijkheid van WGS en bijbehorende databases op termijn de mogelijkheid voor laboratoria om data te delen. Dit kan betekenen dat bijvoorbeeld MML's die aan de surveillance deelnemen of levensmiddelenproducenten die zelf sequensen data kunnen binnenhalen of dat WGS-data van ingestuurde isolaten teruggestuurd worden naar het inzendende laboratorium voor eigen toepassingen.

Naast deze mogelijkheden zien wij ook een aantal uitdagingen voor het goed kunnen uitvoeren van de nationale surveillance op basis van WGS. Door de ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek neemt het aantal laboratoria dat zelf kweken uitvoert van voedselgerelateerde pathogenen snel af. Zonder isolaten is er geen WGS op patiëntniveau mogelijk en daarmee komt de uitvoer van een goede nationale surveillance en uitbraakdetectie onder druk te staan. Dit is met name actueel bij shigatoxineproducerende *E. coli* (STEC), waarbij een sterke afname in het uitvoeren van kweken wordt geconstateerd [8]. Momenteel wordt de dekkingsgraad (het deel van de

laboratoriumbevestigde gevallen dat in de kiem-surveillance wordt opgenomen) van de STEC-kiemsurveillance geschat op 27 procent, terwijl dat voor *Listeria* en *Salmonella* respectievelijk 84 en 64 procent is. Dat de dekkinggraad geen 100 procent is, komt ook doordat laboratoria isolaten vrijwillig mogen insturen.

Een andere uitdaging is dat de zich uitbreidende wetgeving rondom persoonsbescherming het steeds moeilijker maakt om basale epidemiologische gegevens te delen, hetgeen bron- en contact-onderzoek bemoeilijkt. Het volledig anonimiseren van data is daarbij geen oplossing omdat er bij een uitbraak uiteindelijk gekoppeld moet worden aan een patiënt om een patiënt-controleonderzoek te kunnen uitvoeren. Daarnaast is het van belang om trends in epidemiologische karakteristieken (zoals leeftjidsverdelingen, symptomatiek en geografische informatie op bijvoorbeeld gemeenteniveau) te monitoren.

De conclusie is dat whole-genome sequencing een grote meerwaarde blijkt te hebben voor nationale surveillance en uitbraakonderzoek van voedselinfecties. WGS biedt ons de mogelijkheid om onder de hoogste kwaliteitsstandaarden te werken. De WGS-data zijn snel en ondubbelzinnig beschikbaar waardoor het snel schakelen tussen instanties verbetert en uitbraken eerder worden opgemerkt. Daarnaast biedt WGS de mogelijkheid om niet alleen naar clusterdetectie maar ook naar andere karakteristieken van de stam te kijken zoals resistentie, waardoor men tijdig kan acteren op eventuele ontwikkelingen in deze

aandachtsgebieden. Kortom, WGS voor voedselinfecties voelt als 'knockin' on heaven's door'.

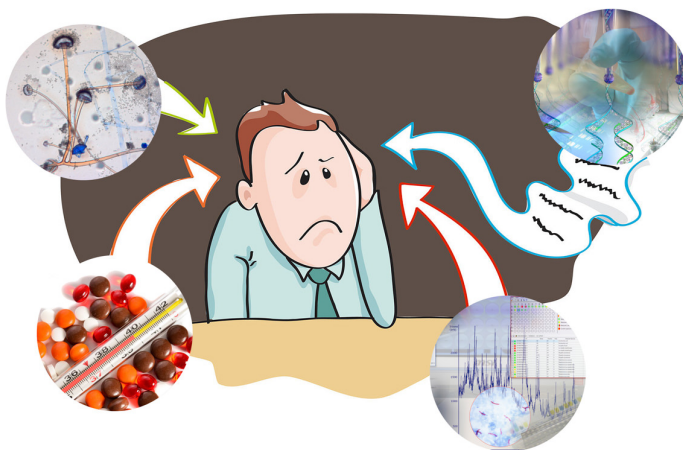
## Referenties

1. Lagerweij GR, Pijnackjer R, Friesema IHM, Mughini Gras L, Franz E. Disease burden of food-related pathogens in the Netherlands. RIVM rapport 2020-0117.
2. Suijkerbuijk AWM, Bouwknegt M, Mangen MJJ, et al. The economic burden of a *Salmonella* Thompson outbreak caused by smoked salmon in the Netherlands, 2012-2013. *Eur J Publ Health*. 2017;27:325-30.
3. Pijnacker R, Dallman TJ, Tijsma ASL, et al. An international outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis linked to eggs from Poland: a microbiological and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19:778-86.
4. Friesema IHM, Wullings BA, van der Voort, M, et al. Surveillance van *Listeria monocytogenes* in Nederland. *Infectieziektebulletin* 2020;31(3).
5. Kuijper EJ, Timen A, Franz E, et al. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2011;155(35).
6. Friesema I, de Jong A, Hoffhuis A, et al. Large outbreak of *Salmonella* Thompson related to smoked salmon in the Netherlands, August to December 2012. *Eurosurveillance* 2014;19(39).
7. Brandwagt D, van den Wijngaard C, Tulen AD, et al. Outbreak of *Salmonella* Bovismorbificans associated with the consumption of uncooked ham products, the Netherlands, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* 2018;23(1).
8. Friesema IHM, Kuiling S, Igloi Z, Franz E. Optimization of notification criteria for Shiga toxin-producing *Escherichia coli* surveillance, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*. 2021;27:258-61.

### **Een voorbeeld van een uitbraak: *Salmonella enteritidis* gerelateerd aan eieren**

*In augustus 2019 werd door de GGD melding gedaan van een Salmonella-enteritidisuitbraak met 22 zieken gerelateerd aan een familiefeest. Bronopsporing van de RIVM/NVWA/WFSR en een vergelijking van stammen uit patiënten en eieren met WGS toonde aan dat eieren uit Spanje, verwerkt in tiramisu, de bron waren van de uitbraak. De eieren werden van de markt gehaald. Op basis van WGS bleek het cluster groter dan aanvankelijk gedacht en zich niet te beperken tot het familiefeest. Hoewel maatregelen door de NVWA in eerste instantie leken te werken, nam het aantal gerelateerde patiënten in 2020 weer toe. Momenteel zijn er in Nederland buiten de zieken op het familiefeest, in totaal 63 patiënten die behoren tot het cluster op basis van WGS, waarvan drie in 2018, 30 in 2019, 17 in 2020 en 13 in 2021. Ook werd duidelijk dat meerdere Europese landen Salmonella-enteritidispatiënten hadden die gerelateerd waren aan hetzelfde cluster, met in totaal 1067 patiënten tot en met 2021, waarvan 271 gemeld in 2021. De bevestiging van de bron en met name de identificatie van de patiënten buiten het initiële cluster was zonder WGS onmogelijk geweest.*

## Thema: Virologie



### VRAAG

Een 40-jarige man, voorheen gezond, klaagt over toenemende pijn in de schouders sinds vijf dagen. Schrijven valt hem steeds moeilijker. Er is zwakte van de armheffers. Hij heeft niet gereisd. Oriënterend laboratoriumonderzoek laat licht verhoogd ALT zien: 93 E/L.

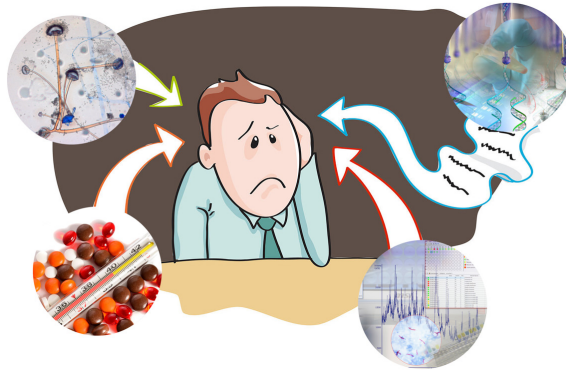
Dit beeld kan goed neuralgische amyotrofie betreffen, veroorzaakt door een acute infectie met:

- a. HEV
- b. HIV
- c. HAV
- d. Bofvirus

*Het juiste antwoord en de toelichting lees je op pagina 44 e.v*

# Antwoord & uitleg

Mohammed Saadulla, Frans Verduyn Lunel



## Het juiste antwoord is: A

### Idiopathische neuralgische amyotrofie

Neuralgische amyotrofie (NA) is een inflammatoire aandoening van de zenuwen die deel uitmaken van de plexus brachialis. Andere namen zijn het idiopathische plexusbrachialisyndroom of het Parsonage-Turner-syndroom [1].

Belangrijk is het etiologische onderscheid tussen de idiopathische NA-variant (INA) en NA waaraan een genetische mutatie ten grondslag ligt, het hereditair NA (HNA). Bij HNA bestaat er een mutatie in het SEPT9-gen op chromosoom 17q25 [1].

### Symptomatiek

Hoewel er meer fenotypen bestaan van INA die verschillen in symptomatiek, wordt de klassieke variant beschreven als een aandoening waarbij er acute pijn in de schouders of bovenarmen ontstaat (zowel unilateraal als bilateraal) die zeer hevig van aard is. Enkele uren tot dagen later volgt er parese van enkele of meer zenuwen die hun origine kennen in de plexus brachialis. Dit resulteert in zwakte van de armheffers. De klachten gaan gepaard met tintelingen in de onderarm (dermatoom C5 tot C8), en in sommige

gevallen kan de sensibeleit volledig uitvallen in het gebied van de nervus axillaris [1]. Klassiek voor INA is dat de pijn zich niet verhoudt tot dezelfde zenuwregioenen als de parese [1]; hiermee kan INA onderscheiden worden van andere plexusbrachialis-syndromen. De pijn kan echter zo heftig zijn dat de parese of gevoelsstoornis primair niet wordt opgemerkt door de patiënt.

Epidemiologische gegevens van NA blijven discutabel met gerapporteerde incidentiecijfers van twee à drie gevallen op de 100.000 per jaar tot één à drie op de 1000 per jaar [2,3]. De grote verschillen kunnen worden verklaard doordat het stellen van een diagnose bij deze relatief zeldzame aandoening lastig blijft, aangezien er geen duidelijke gouden standaard bestaat [1]. Primaire behandeling van INA bestaat uit adequate pijnstilling. Zeker in de acute fase kunnen opioïden nodig zijn naast NSAID's; hiernaast wordt begonnen met een prednisonkuur [1].

Universitair Medisch Centrum Utrecht, afdeling  
Medische Microbiologie, M. Saadulla, aios,  
dr. F. Verduyn Lunel, viroloog.



De prognose van INA kan verschillen; hoewel 80 tot 90 procent een goed herstel laat zien binnen twee tot drie jaar, blijft een aanzienlijk deel klachten houden [1]. Zo is 25 procent alsnog niet in staat het oude werk te hervatten na drie jaar en blijft 60 procent toch klachten van pijn of krachtsvermindering houden [3,4].

## Pathofysiologie

De exacte pathofysiologie van INA is niet bekend. Er wordt verondersteld dat een complexe interactie tussen verschillende factoren aan de basis van de aandoening ligt: omgevingsfactoren zoals infecties of immuuntriggers, mechanische factoren zoals overbelasting en genetische predispositie zouden een rol spelen [1]. Het verband met een infectie als trigger voor INA werd voor het eerst gelegd bij een toename van INA-gevallen in een dorpje waar destijds sprake was van een Coxsackie-A2-uitbraak wegens een verontreinigd watervoorzieningssysteem [5]. De INA-incidentie nam af nadat het waterleidingsstelsel werd vervangen en de incidentie van het enterovirus ook daalde onder de bevolking. Een meer recente studie berichtte over INA onder enkele surfers die besmet waren geraakt met hepatitis E-virus (HEV) [6]. Ondanks dat er relaties zijn gevonden met ook andere infectieziekten, heeft HEV de grootste rol in de etiologie van INA. Een epidemiologische studie uit 2014, geleid door Nederlandse en Engelse onderzoekers toonde dat een acute HEV-infectie bij 10 procent van alle INA-gevallen voorkomt [6].

## Hepatitis E-virus en INA

Het hepatitis E-virus is een enkelstrengs RNA-virus behorende tot de familie van hepeviridae. Het hepatitis E-virus is wereldwijd de voornaamste oorzaak van acute virale hepatitisen [7]. Er zijn vier genotypen bekend van HEV (HEV-1-4). HEV-1 en -2 zijn obligaat humane virussen die een feco-orale transmissieroute kennen [7]. Deze genotypen komen vooral voor in de (sub)tropen en derdewereldlanden waar het sanitair systeem relatief slecht is [7]. De kliniek kan bestaan uit klachten van algehele malaise die gepaard gaan met koorts, misselijkheid, icterus en ontkleurde ontlasting en urine; hierbij kunnen ook reversibele leverfunctiestoornissen voorkomen [7]. HEV-1 en -2 zijn meestal zelflimiterend, maar kunnen ook fulminant verlopen, zeker bij zwangere patiënten, bij wie een mortaliteit van 25 procent is beschreven [8].

In het Westen ziet men vooral HEV-3 en -4-infecties; deze genotypen zijn zoönotische infecties waarbij hoofdzakelijk varkens het reservoir vormen [7]. Transmissie vindt plaats via gecontamineerd water of slecht doorbakken vlees; 90 procent van de zoönotische HEV-infecties verloopt echter asymptomatisch [8].

HEV replicateert zich in de cellen van het darmkanaal nadat het via de orale route is binnengekomen. Vermoedelijk bereikt het de lever via de poortader, waar een tweede replicatiefase begint in de hepatocyten. Daar kan HEV het klassieke hepatitisbeeld geven [7]. De neurologische manifestatie is mogelijk verklaarbaar door recent bewezen neurotropisme van HEV [9], directe infectie en schade van de plexus brachialis is daarmee theoretisch mogelijk [6]. De aanwezigheid van HEV-RNA in zenuwcellen suggereert ook een direct mechanisme voor de neurologische betrokkenheid. Een indirect mechanisme waarbij het HEV een immuunrespons uitlokt in het zenuwstelsel met schade als gevolg van het inflammatoir proces, behoort ook tot de mogelijkheden [6].

Een review uit 2015 analyseerde alle gerapporteerde gevallen van HEV-geassocieerde neurologische ziekten [10]. Hierin werden 91 gevallen beschreven van HEV-positieve patiënten met neurologische aandoeningen als het guillan-barrésyndroom (GBS), encefalitis/myelitis, mononeuritis multiplex, vestibulaire neuritis, Bellse parese en ook INA. Van alle neurologische aandoeningen geassocieerd met HEV kwam 33 procent voor bij patiënten met INA. De INA-patiënten waren gemiddeld 49 jaar en het overgrote deel (87,5 procent) bestond uit mannen. Karakteristiek voor HEV-geassocieerde INA was de bilaterale en asymmetrische aanwezigheid van de klachten als pijn en parese; ook opvallend was de frequente betrokkenheid van de N. phrenicus [6,10], geen van de patiënten met HEV-INA had geelzucht doorgemaakt [6]. Interessant is dat een studie die de karakteristieken onderzocht van een groot aantal INA-patiënten, het beschreven klachtenpatroon bevestigde bij patiënten met mild verhoogde leverenzymen [3]. Deze patiënten waren niet getest op HEV, maar gezien de typische klachten en de verhoogde leverenzymen zou hieraan een HEV-INA ten grondslag gelegen kunnen hebben. Overigens is van alle onderzochte gevallen van HEV-INA waarbij ook

een genotypering was verricht, enkel het genotype HEV3 aangetoond [10]. De verzamelde data laat een sterke associatie tussen HEV en INA zien. Met het uitblijven van een precieze verklaring voor het achterliggende mechanisme van HEV om zenuw-betrokkenheid te bewerkstelligen, blijft een oorzakelijk verband nog uit.

Om een beter begrip te krijgen van de relatie tussen HEV en INA, is verder onderzoek nodig naar beide aandoeningen. Er wordt geopperd om bij iedere bevestigde INA onderzoek in te zetten naar HEV [6], niet alleen om de relatie beter in kaart te brengen, maar ook omdat er mogelijk implicaties zouden zijn voor de behandeling. Er zijn geen aanwijzingen om INA anders te behandelen wanneer het gepaard gaat met HEV. Het is echter de vraag of er een actieve HEV-viremie bestaat ten tijde van het ontstaan van INA; indien dit het geval is zou men HEV-behandeling kunnen overwegen. Dit blijft echter nog speculatief.

## Referenties

1. Van Eijk JJJ, Groothuis JT, Van Alfen N. Neuralgic amyotrophy: An update on diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Muscle Nerve*. 2016;53:337-50
2. MacDonald BK, Cockerell OC, Sander JWAS, Shorvon SD. The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK. *Brain*. 2000;123(Pt 4):665-7.
3. Van Alfen N, Van Engelen BGM. The clinical spectrum of neuralgic amyotrophy in 246 cases. *Brain*. 2006;129(Pt 2):438-50.
4. Cup EH, Ijspeert J, Janssen RJ, et al. Residual complaints after neuralgic amyotrophy. *Arch Phys Med Rehabil*. 2013;94(1):67-73.
5. V BARDOS VS. Epidemiologic study of a brachial plexus neuritis outbreak in northeast Czechoslovakia. *World Neurol* [Internet]. 1961;973-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13864958/>
6. Van Eijk JJJ, Madden RG, Van Der Eijk AA, et al. Neuralgic amyotrophy and hepatitis E virus infection. *Neurology*. 2014;11;82(6):498-503.
7. Pérez-Gracia MT, Suay B, Mateos-Lindemann ML. Hepatitis E: An emerging disease. *Infect Genet Evol*. 2014;22:40-59
8. Kamar N, Bendall R, Legrand-Abravanel F, et al. Hepatitis e. *Lancet*. 2012;30;379:2477-88.
9. Drave SA, Debing Y, Walter S, et al. Extra-hepatic replication and infection of hepatitis E virus in neuronal-derived cells. *J Viral Hepat*. 2016;23:512-21.
10. Dalton HR, Kamar N, Van Eijk JJJ, et al. Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat Rev Neurol*. 2016;12(2):77-85.

# PROMOTIES & ORATIES

## PROMOTIES

### 17 januari 2022 - M. du Teil Espina

Tricking the gatekeepers: subversion of host immune responses by *Porphyromonas gingivalis*

Promotoren: prof. dr. J.M. van Dijk  
en prof. dr. F.M. Reggiori  
Copromotor: dr. J. Westra  
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en  
Infectiepreventie

### 31 januari 2022 - A.R. da Silva Ferreira

Microbiome-targeted interventions during gastrointestinal mucositis

Promotoren: prof. dr. J.M. van Dijk  
en prof. dr. W.J.E. Tissing  
Copromotoren: dr. ir. H.J.M. Harmsen  
en dr. H.R. Wardill  
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en  
Infectiepreventie

### 8 februari 2022 - B.M. Laksono

The Paradoxical Role of Immune Cells in Morbillivirus Pathogenesis

Promotor: prof. dr. M.P.G. Koopmans  
Copromotoren: dr. R.L. de Swart  
en dr. R.D. de Vries  
Erasmus MC Rotterdam, afd. Virologie



ID NOW™

REALISEER UITGEBREIDE  
TESTMOGELIJKHEDEN

**NOW**

ID NOW™ is een platform voor snelle moleculaire respiratoire testen waarmee artsen nauwkeurige diagnoses kunnen stellen voor COVID-19, influenza, RSV en Strep A in real-time in elke acute zorgomgeving, waar en wanneer dit het meeste nodig is.



GA NAAR  
IDNOW.ABBOTT

Scan NU de code.  
En zie hoe ID NOW uw  
testmogelijkheden kan  
uitbreiden en de workflow in  
het ziekenhuis kan verbeteren.