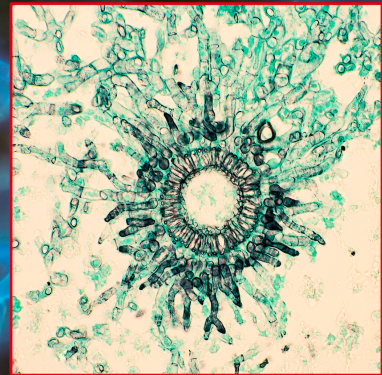
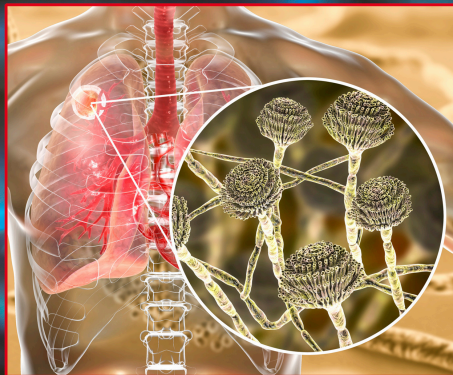
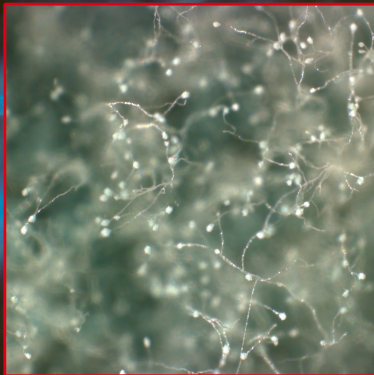


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR

# MEDISCHE MICROBIOLOGIE



## Thema Mycologie

Nieuwe antifungale therapieën  
Epidemiologie van *Candida auris*  
Dutch-Belgian Mycosis Study Group

## Thema Tuberculose (vervolg)

Farmacokinetiek van rifampicine  
Screening resistentie *M. tuberculosis* complex  
Mondiale blik op tuberculose

## In Retrospect

Edward Jenner: pokkenvaccinatie

## Inhoud

### Van de redactie

Jochem Buil 51  
Bert Mulder, Jan Kaan 52

### Transmissieroute

Reizen in de tijd 53  
Sylvia Debast

### Thema Mycologie

Nieuwe antifungale therapieën 54  
Kim Snijdelaar, Anouk Jansen, Roger Brüggemann

*Candida auris*: huidige inzichten 61  
Eelco Meijer, Andreas Voss, Jacques Meis

De Dutch-Belgian Mycosis Study Group 67  
Bart Rijnders, Frank van de Veerdonk, Paul Verweij,  
Joost Wauters

### Thema Tuberculose (vervolg)

Whole genome sequencing voor screening op 70  
resistentie *Mycobacterium tuberculosis* complex  
Rina de Zwaan, Miranda Kamst, Han de Neeling,  
Tridia van der Laan, Arnout Mulder, Richard Anthony,  
Dick van Soelingen

Mondiale blik op tuberculose en recente 76  
ontwikkelingen in de tuberculosediagnostiek  
Kristin Kremer, Kitty van Weezenbeek

### Ingezonden

*Streptococcus dysgalactiae* subsp *equisimilis* 85  
als veroorzaker van groep A-streptokokkeninfecties  
Koos Korsten, Wieke Freudenburg-de Graaf,  
Wendy Bri-Keijzers, Boas van der Putten, Nina van Sorge

### In Retrospect

Edward Jenner, pionier in de vaccinatie tegen de pokken 93  
Gro Vlassembler

### Promoties & oraties

Beelden voorpagina: achtergrond: BPKL-kleuring van *Aspergillus fumigatus*  
(Aspergilloom / geïnfecteerde long); links: close-upgroei *Aspergillus*  
*fumigatus* op voedingsbodemp; midden: abces long met *Aspergillus*  
*fumigatus*; rechts: een *Aspergillus fumigatus* (GROCOTT-kleuring).

## Pagina

## Recente ontwikkelingen in de mycologie

Jochem Buil

Binnen de microbiologie vormt de mycologie slechts een klein subspecialisme. Hoewel dermatomycosen een zeer hoge incidentie hebben, komen invasieve schimmelinfecties veel minder voor, voornamelijk bij immuungecompromitteerde patiënten. Momenteel zijn er ongeveer 700 schimmels beschreven die humane infecties kunnen veroorzaken. Het overgrote deel van de invasieve schimmelinfecties wordt veroorzaakt door *Aspergillus fumigatus*. Elke microbioloog of infectioloog zal af en toe te maken krijgen met een invasieve aspergillose en voor deze infecties zijn richtlijnen beschikbaar. Andere schimmelinfecties zijn veel zeldzamer en komen zelfs in de grote academische centra sporadisch voor.

Daarnaast kunnen diepe of invasieve schimmel-infecties vele uitingvormen hebben, zoals long-infecties, subcutane infecties, bloedbaaninfecties, keratitis en cerebrale infecties, en voor veel schimmel-infecties is de optimale behandeling nog niet geheel bekend. Juist hierom is samenwerken en het delen van kennis en ervaring van groot belang.

Het Radboudumc-CWZ Expertisecentrum voor schimmelinfecties biedt daarom een mycologie-MDO aan waarin zeldzame of moeilijk behandelbare schimmelinfecties kunnen worden besproken. In dit multidisciplinaire overleg wordt advies gegeven over diagnostiek en behandeling, waarbij zowel aandacht is voor de host als het pathogeen. In dit themanummer Mycologie wordt aandacht besteed aan de nieuwe ontwikkelingen in de mycologie, waaronder enkele nieuwe pathogenen en nieuwe antifungale behandelingen.

Er zijn nog steeds slechts enkele klassen antimycotica beschikbaar voor de behandeling van invasieve schimmelinfecties, waaronder amfotericine B, 5-flucytosine, de azolen en de echinocandinen. Amfotericine B wordt reeds gebruikt vanaf 1958, 5-flucytosine werd in 1973 geïntroduceerd, de eerste generatie triazolen kwamen in de jaren 90 op de markt en de echinocandinen in de jaren 2000. In de laatste 20 jaar zijn er alleen enkele nieuwe generaties triazolen

op de markt gekomen met een milder interactie-bijwerkingsprofiel en bredere antifungale activiteit. Voor sommige schimmelinfecties zijn er echter nog steeds geen goed werkzame middelen beschikbaar. *Lomentospora prolificans* bijvoorbeeld, is met de huidige antimycotica nog steeds niet goed behandelbaar.

Er zijn momenteel verschillende nieuwe antifungale middelen in ontwikkeling die wél activiteit vertonen tegen enkele moeilijk behandelbare schimmels zoals de eerdergenoemde *L. prolificans*. Kim Snijdelaar, Anouk Jansen en Roger Brüggeman geven een overzicht van de antimycotica die in ontwikkeling zijn en de potentie hebben om in de nabije toekomst een plaats in te nemen in de behandeling of profylaxe van invasieve schimmelinfecties.

Verder beschrijven Eelco Meijer, Andreas Voss en Jacques Meis de nieuwste ontwikkelingen omtrent *Candida auris*. Deze relatief recent beschreven gist geeft in de hele wereld uitbraken, met name op de intensive care. *C. auris* is in veel gevallen ongevoelig voor azolen, maar ook resistentie tegen de echinocandinen en amfotericine B komt voor. Hoewel Nederland met slechts enkele casus nog gespaard is voor grote uitbraken, is dit geheel anders in veel omliggende landen, waaronder Griekenland, Italië en het Verenigd Koninkrijk.

Ten slotte geven Bart Rijnders en collega's een overzicht van de activiteiten en resultaten van studies van de Dutch-Belgian Mycosis Study Group: DB-MSG. Naast de resultaten komen kort de toekomstplannen en lopende studies aan bod.

Radboudumc, Nijmegen, afdeling Medische Microbiologie, J.B. Buil, arts-microbioloog.  
Correspondentieadres: J.B. Buil  
(jochem.buil@radboud.umc.nl).

## Deze uitgave

Bert Mulder, Jan Kaan

Bij de keuze van de onderwerpen voor kopij en met name themanummers richt de redactie van het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie (NTMM)* zich op de wetenschappelijke ontwikkelingen die plaatsvinden op medisch-microbiologisch gebied in vooral het Nederlands taalgebied. In de praktijk is het aantal manuscripten dat spontaan aangeboden wordt altijd kleiner dan het aantal dat door de redactie binnen de themanummers wordt nagestreefd. Gewoonlijk wordt een redactieteam samengesteld met een of meer gastredacteuren van buiten de redactie uit ons of een aanverwant vakgebied, die op een dergelijk deelgebied over bovengemiddelde expertise beschikken.

Elke toename van het aantal spontaan aangeboden manuscripten is voor ons als redacteuren uiteraard bijzonder welkom. Begrijpelijk dat het schrijven in alle drukte niet heel aantrekkelijk is wanneer je dat vooral doet voor slechts het plezier 'to see one's writing in print'. Daarom is het verheugend nieuws dat in de laatste algemene ledenvergadering van de NVMM vanuit de commissie Nascholing is gemeld dat hoofdartikelen in het *NTMM* voortaan geaccrediteerd kunnen worden. Hopelijk draagt deze mogelijkheid tot accreditatie bij aan de doelstelling van het *NTMM*, om

een verenigingsblad door en voor alle leden van de NVMM te zijn.

Het themanummer Mycologie kon tot stand komen door de medewerking van gastredacteur Jochem Buil, waarvoor we hem zeer erkentelijk zijn. In deze editie zijn er naast de thematische mycologieartikelen nog twee artikelen aan het thema 'tuberculose' gewijd. Het eerste is van Dick van Soolingen en collega's, waarin de rol/belang van whole genome sequencing van tbc-stammen wordt beschreven. Het tweede is van Kristin Kremer en Kitty van Weezenbeek, dat de in de afgelopen jaren verbeterde methodieken in de mondiale tbc-bestrijding belicht.

Daarnaast bevat deze *NTMM* een artikel buiten de thema's, geschreven door Koos Korsten en coauteurs. Het behandelt de epidemiologie van *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*.

De Transmissieroute is dit keer van Sylvia Debast en in onze geschiedenisrubriek In Retrospect haakt redactielid Gro Vlaspolder in op de actualiteit door aandacht te besteden aan Edward Jenner en anderen die een rol speelden bij de ontwikkeling van het pokkenvaccin.

## Reizen in de tijd

Sylvia Debast

Terwijl ik deze rubriek schrijf, wordt het afscheid van onze gewaardeerde collega arts-microbioloog Maurice Wolffhagen voorbereid. Als een collega na 30 jaren Isala met pensioen gaat, is dat natuurlijk een gebeurtenis om uitgebreid bij stil te staan én achterom te kijken: een reis in de tijd. Met weemoed wordt gesproken over "toen": over mensen die kwamen en gingen, oudbouw en nieuwbouw, bijzondere anekdotes, die éne bacterie die na intensief speurwerk gevonden werd, uitbraken die bedwongen werden en de vrolijke en verdrietige momenten die tijdens en buiten het werk gezamenlijk beleefd zijn. Deze herinneringen koesteren en bespiegelen is cruciaal, want zij vormen de basis van de saamhorigheid waarmee een laboratoriumteam zelfs de uitdagingen van een pandemie weet te doorstaan. In 30 jaren is veel veranderd. De tijd van de bonte rij, API en andere testjes om een bacterie te determineren zijn passé. Het zegt tegenwoordig iets over je leeftijd wanneer je daar op de werkvloer tijdens een labronde naar verwijst als "maldi er niet uitkomt", en menig jonge collega je met een veelzeggende blik aankijkt. Moleculaire technieken zijn gemeengoed geworden en natuurlijk heeft de komst daarvan veel vooruitgang gebracht. In korte tijd en met indrukwekkende specificiteit wordt een spectrum aan potentiële ziekteverwekkers uitgesloten en de boosdoener aangetoond. De keerzijde ervan is dat we alleen nog maar vinden waar we naar zoeken, en zoeken naar wat we denken te kunnen vinden. Hadden we ons 'oude' respiratoire PCR-panel de afgelopen periode op de monsters losgelaten, dan was er geen Covid-19-pandemie geweest. Dan waren we net als in 1918 overvallen door een 'Chinese-griepandemie', want daar wezen de symptomen immers op.

Reizen, zo liet het nieuws over Schiphol ons de afgelopen weekenden weer zien, zit mensen in het bloed. Je zou bijna denken dat de Covid-19-vaccinatie de reiskoorts heeft geboosterd. Met de coronamaatregelen nog maar nauwelijks achter ons, staan mensen in lange rijen om verre oorden te bezoeken voor vakanties, congressen, werk. Mensen houden zich niet aan grenzen, en infectieziekten evenmin. Ongetwijfeld zien we binnen niet al te lange tijd een volgende

grensoverschrijdende uitbraak. Dat men dit overigens na twee jaar coronabeperkingen niet wil horen, bleek wel na een van mijn presentaties hierover. Het leverde mij het predicaat 'azijnpisser' op. Ik heb mij daarvoor hartelijk bedankt. Azijn heeft immers een antimicrobiële werking en de bacterie waarmee het bereid wordt, *Acetobacter*, is in 1864 door een van onze beroemdste voorgangers Louis Pasteur ontdekt. Eervol dus.

Wie met het vliegtuig reist kent natuurlijk het *duty-free* magazine verscholen in de rugleuning van de stoel voor ons: daarin altijd een weergave van het indrukwekkende web van vliegroutes in de wereld. Als een spin in dit web bevindt zich de medische microbiologie; als een wachter die paraat staat als nieuwe (of oude) infectieziekten zich aandienen en de wereld over reizen. En om mijn zure titulatuur ook hier nog maar eens eer aan te doen: SARS-CoV-2 is vast niet de laatste invloedrijke medereiziger die we tegenkomen.

De reis van Covid-19 is recent (vooralsnog) afgesloten met het begin van een oorlog. Hoe vluchtig blijkt de verbondenheid die deze pandemie de wereld even bracht. De geschiedenis laat zien hoe groot de invloed van infectieziekten is. Maar ook hoe bepalend ontwikkelingen in de wereld zijn voor het ontstaan, de (re)introduktie en verspreiding ervan (en vice versa). Oorlog is er een van. De komst van vluchtelingen brengt vergeten infectieziekten weer in beeld en leidt soms zelfs tot ernstige uitbraken. De actuele uitbraak van *Salmonella typhi* in een nabijgelegen asielzoekersopvang illustreert dit. Op zo'n moment leeft de 'oude garde' in het laboratorium op: protocollen worden afgestoft, kennis en kunde uit vervlogen tijden worden opgefrist en doorgegeven. Dan zijn 30 jaren plots relatief en is een reis terug in de tijd zo gek nog niet.

De pen van deze *Transmissieroute* geef ik door aan Rocio Ramos Diaz.

Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten (LMMI) Isala, Zwolle, dr. S.B. Debast, arts-microbioloog. Correspondentieadres: dr. S.B. Debast (S.B.Debast@isala.nl).

# Nieuwe antifungale therapieën

Kim Snijdelaar, Anouk Jansen, Roger Brüggemann

## Samenvatting

Het huidige arsenaal dat als profylaxe of behandeling van invasieve schimmelinfecties kan worden ingezet, bestaat uit de triazolen, polyenen, echinocandinen en flucytosine. Resistentie tegen triazolen maar ook tegen andere middelen zoals echinocandinen is een blijvend probleem voor dit huidige arsenaal. Daarnaast is er een kleine groep pathogenen die intrinsiek ongevoelig is voor de huidige middelen. Ook is er evident behoefte aan orale therapieën anders dan die van de klasse van triazolen dan wel aan nieuwe routes van toediening van deze producten. Dit benadrukt de noodzaak voor het ontwikkelen van antifungale middelen met nieuwe aangrijpingspunten.

Een aantal nieuwe geneesmiddelen is in een vergevorderd stadium van ontwikkeling. Het nieuwe echinocandine rezafungine dat middels een één-wekelijkse toediening wordt gegeven bij candida-infecties of als profylaxe bij *Aspergillus* alsmede *Pneumocystis jirovecii* is een interessant product voor poliklinische toepassing. Ibrexafungerp is een oraal alternatief voor de echinocandinen die alleen in intraveneuze vorm beschikbaar zijn. Fosmanogepix is eveneens interessant, gezien de orale behandelingsmogelijkheid en een breed spectrum van activiteit. Olorofim biedt perspectief in de behandeling van multiresistente pathogenen als *Aspergillus* species, *Scedosporium* spp., *Coccidioides* spp. en *L. prolificans*, waar patiënten eerder geen behandelopties meer hadden. Tot slot wordt opelconazol als inhalatievorm onderzocht. Deze lokale therapie zal mogelijk kunnen zorgen voor hoge blootstelling in de longen zonder systemische toxiciteit ter profylaxe van invasieve pulmonale aspergillose.

Kortom, er is veel ontwikkeling op het gebied van nieuwe antifungale therapieën. Een beknopt overzicht van deze middelen wordt in dit artikel gepresenteerd.

## Abstract

The currently available antifungal drugs to prevent and treat invasive fungal infections consists of the following

drug classes: triazoles, polyenes, echinocandins and flucytosine. Both environmental, in-host acquired, and intrinsic resistance against these antifungal drugs is an existing and growing problem. This underlines the need for developing antifungal drugs with new targets. Additionally, availability of antifungal drugs that can be administered orally remain highly warranted.

A number of novel antifungal drugs are in an advanced stage of development. The new echinocandin rezafungin, which is given once a week for treatment of *Candida* infections or as prophylaxis for *Aspergillus* and *Pneumocystis jirovecii* infections is an interesting product for outpatient use. Ibrexafungerp is a potential oral alternative to echinocandins, which are only available intravenously. Fosmanogepix is equally interesting, given the oral treatment option and a broad spectrum of activity. Olorofim offers perspective in the treatment of multidrug resistant pathogens such as *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp., *Coccidioides* spp., and *L. prolificans*, in patients that previously did not have treatment options. Finally, opelconazole is investigated as a triazole formulated for inhalation, where it has the potential of resulting in high local exposure without systemic exposure.

Summarizing, the field of antifungal drugs is rapidly developing. A brief overview of these novel antifungal therapies is presented in this article.

## Introductie

Invasieve schimmelinfecties hebben een enorme impact op de morbiditeit en mortaliteit van individuen. *Candida*, *Aspergillus*, *Pneumocystis* en *Cryptococcus* spp. zijn in Nederland de voornaamste verwekkers van

Radboudumc, Nijmegen, afdeling Apotheek, K. Snijdelaar, masterstudent farmacie. Radboudumc, Nijmegen, afdeling Apotheek; Expertisecentrum voor schimmelinfecties Radboudumc/CWZ, A.M.E. Jansen, apotheker-onderzoeker, dr. R.J.M. Brüggemann, ziekenhuisapotheker-klinisch farmacoloog. Correspondentieadres: R. Brüggemann (roger.bruggemann@radboudumc.nl)

deze infecties die kunnen leiden tot een mortaliteit van meer dan 50 procent [1]. Bovendien blijft resistentie van *Aspergillus* en *Candida* spp. tegen respectievelijk triazolen en echinocandinen een bestaande uitdaging. Het huidige arsenaal dat kan worden ingezet ter profylaxe of behandeling van invasieve schimmelinfecties bestaat uit de triazolen, polyenen, flucytosine en echinocandinen.

## Huidig arsenaal antifungale geneesmiddelen

De meest gebruikte groep van antifungale geneesmiddelen is die van de triazolen bestaande uit fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol en isavuconazol. Deze antifungale middelen blokkeren de synthese van ergosterol door inhibitie van het enzym lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase. Hoewel ze er zijn in zowel een orale als intraveneuze toedingsvorm hebben de triazolen diverse tekortkomingen. Ten eerste bestaan er verschillende klinisch relevante interacties met andere geneesmiddelen via remming of inductie van cytochroom P450 (CYP)-enzymen, voornamelijk CYP3A4, CYP2C9 en CYP2C19 [2,3]. Ten tweede hebben de triazolen een divers en onderling verschillend toxiciteitsprofiel bestaande uit hepatobiliaire bijwerkingen, QTc-verlenging, hallucinaties en bij langdurig gebruik het ontstaan van neuropathie, cardiotoxiciteit, plaveisel-celcarcinoom en fluoridegeassocieerde periostitis. Daarbij is in Nederland een hoge incidentie van triazol-resistente *Aspergillus fumigatus* waargenomen [4-7].

Het polyeen amfotericine B heeft een fungicide activiteit met een breed spectrum. Het werkingsmechanisme van amfotericine B berust op binding aan ergosterol, het belangrijkste sterol van het fungale celmembraan. Deze binding leidt tot desintegratie van het membraan met celdood als gevolg [5]. Het op de markt komen van amfotericine B-lipidencomplex en liposomaal amfotericine B leidde tot de beschikbaarheid van formuleringen met een gunstiger toxiciteitsprofiel. Al is nefrotoxiciteit met elektrolytenstoornissen als gevolg nog niet volledig geëlimineerd uit het toxiciteitsprofiel van amfotericine B [4,6,8,9]. Flucytosine interfereert met de nucleïnezuursynthese in de fungale cel en kan beenmergsuppressie veroorzaken. Het middel wordt alleen toegepast in combinatietherapie met amfotericine B vanwege de snelle resistentieontwikkeling [4].

De echinocandinen caspofungine, anidulafungine en

micafungine inhiberen het enzym 1,3- $\beta$ -D-glucaan synthetase. Door deze inhibitie wordt de synthese van de essentiële celwandcomponent 1,3- $\beta$ -D-glucaan geremd. Hierdoor ontstaat er een onhoudbare osmotische druk met lysis tot gevolg. De echinocandinen hebben een gunstig toxiciteitsprofiel en weinig klinisch relevante interacties met andere geneesmiddelen [4,6]. Het nadeel is echter dat de geneesmiddelgroep enkel als intraveneuze toediening beschikbaar is. Daarnaast worden de echinocandinen niet of beperkt systemisch ingezet wanneer de infectie zich manifesteert in gebieden met geen tot matige geneesmiddelpenetratie zoals het brein, de ogen en in de blaas.

Om verschillende redenen is er een grote behoefte aan nieuwe producten. Zo is het huidige arsenaal aan antifungale middelen vaak onvoldoende om infecties met (intrinsiek) resistente stammen te behandelen. Dit benadrukt de noodzaak voor het ontwikkelen van antifungale middelen met nieuwe aangrijpingspunten. Ook is er vraag naar meer orale alternatieven om patiëntvriendelijkheid en -veiligheid te kunnen verbeteren. Als laatste worden nieuwe toedieningsroutes met lokaal heel hoge concentraties geneesmiddel onderzocht.

Op dit moment is een aantal nieuwe antifungale middelen in ontwikkeling die de potentie hebben een volwaardig alternatief voor de huidige therapieën te worden. Deze nieuwste ontwikkelingen zullen hierna worden geïntroduceerd.

## In ontwikkeling

### Rezafungine

Binnen de huidige klasse van echinocandinen is rezafungine de meest recente aanvulling. Rezafungine heeft hetzelfde werkingsmechanisme als de reeds bestaande echinocandinen met een vergelijkbare gevoeligheid voor *Candida* en *Aspergillus* spp. [10,11]. Daarnaast blijkt uit een muismodel dat *Pneumocystis jirovecii* gevoelig is voor rezafungine [12]. Rezafungine wordt intraveneus toegediend met een eenmalige oplaaddosering van 400 mg, gevolgd door een gift van 200 mg eenmaal per week [13]. Op dit moment lopen er twee fase III-studies naar rezafungine. In de ReSTORE-studie (NCT03667690, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) wordt rezafungine onderzocht als behandeling voor patiënten met invasieve candidiasis. In de ReSPECT-studie (NCT04368559,

toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) wordt rezafungine onderzocht als middel ter profylaxe van invasieve schimmelinfecties bij patiënten met een allogene bloed- of beenmergtransplantatie [11]. Het middel wordt goed verdragen. Uit de fase II-STRIVE-studie kwamen noch ernstige bijwerkingen noch relevante interacties met CYP-enzymen en co-medicatie naar voren, net als bij de overige echinocandinen [11,14,15].

Concluderend is rezafungine vernieuwend in twee opzichten: de voorziene inzet als profylaxe van *Pneumocystis jirovecii* en de langere halfwaardetijd, wat éénwekelijkse toediening mogelijk maakt [12,16]. Dit opent deuren voor een meer patiëntvriendelijke, poliklinische behandeling met een echinocandine.

### Ibrexafungerp

Ibrexafungerp vormt een nieuwe geneesmiddelgroep, genaamd de triterpenoïden. Het geneesmiddel inhibeert, evenals de echinocandinen, het celwand-enzymcomplex 1,3- $\beta$ -D-glucaan synthetase, maar kent een andere chemische structuur dan de echinocandinen [17]. Het middel heeft een breed spectrum van activiteit. Zo blijken de meeste echinocandinen resistente FKS-mutanten in *Candida* spp. gevoelig te zijn voor ibrexafungerp. Daarnaast is er een duidelijke activiteit van ibrexafungerp tegen andere (inclusief azool-resistente) *Candida* spp. aangetoond [18]. De *Aspergillus* spp., waaronder de triazool-resistente stammen, blijken in vitro ook gevoelig te zijn voor dit triterpenoïde [19]. Uit een studie van Petraitis *et al.* blijkt de combinatie van ibrexafungerp met isavuconazol een in vitro synergistische interactie te vertonen bij invasieve pulmonale aspergillose [20]. De biologische beschikbaarheid is circa 36 procent en inname met voedsel verhoogt de blootstelling met circa 40 procent.

Ibrexafungerp is alleen als orale therapie beschikbaar. Ibrexafungerp wordt oraal toegediend in een oplaaddosering van tweemaal daags 750 mg gedurende twee dagen, gevolgd door eenmaal daags 750 mg. In combinatie met triazolen wordt een lagere dosering voorgeschreven, namelijk tweemaal daags 500 mg voor twee dagen als oplaaddosering en vervolgens eenmaal daags 500 mg [11].

De Amerikaanse Food and Drug Administration (FDA) heeft ibrexafungerp in juni 2021 reeds goedgekeurd voor de behandeling van vulvovaginale candidiasis (VVC) [21]. Op dit moment wordt oraal ibrexafungerp

ook onderzocht voor de behandeling van invasieve schimmelinfecties in één fase II- en twee fase III-studies. Allereerst wordt in de FURI-studie (NCT03059992, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) ibrexafungerp toegediend aan patiënten met invasieve schimmelinfecties die intolerant of ongevoelig zijn voor de standaardbehandeling. Ten tweede wordt in de CARES-studie (NCT03363841, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) ibrexafungerp toegepast voor de behandeling van candidiasis door *C. auris*. Tot slot wordt ibrexafungerp in de SCYNERGIA-studie (NCT03672292, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) in combinatietherapie met voriconazol onderzocht voor de behandeling van invasieve pulmonale aspergillose [11].

Uit de eerste onderzoeken lijken de triterpenoïden een redelijk gunstig veiligheidsprofiel te hebben en zijn geen ernstige bijwerkingen gemeld, enkel gastro-intestinale bijwerkingen als diarree, misselijkheid en braken [11]. Ibrexafungerp is een CYP3A4-substraat en remmer van CYP2C8 en CYP3A4. In tegenstelling tot de azolen blijkt er geen klinisch relevante interactie met tacrolimus te zijn [22]. Daarentegen is dosisaanpassing van ibrexafungerp in combinatie met CYP3A-inductoren en -remmers wel nodig om een te lage respectievelijk hoge blootstelling te voorkomen [11].

Ibrexafungerp heeft de potentie om als alternatief of als 'stepdowntherapie' te dienen voor de echinocandinen. De orale toedieningsvorm is hierbij een pluspunt, daar waar echinocandinen alleen in intraveneuze vorm beschikbaar zijn. Bovendien kan ibrexafungerp mogelijk een uitkomst bieden in de behandeling van resistente invasieve pulmonale aspergillose bij optredende azool-resistentie.

### Fosmanogepix

Fosmanogepix is de eerste in haar klasse. Het is de N-phosphonooxymethyleen prodrug van manogepix [23]. Manogepix inhibeert het fungale glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored wall transfer 1 (GWT1)-enzym dat nodig is bij de biosynthese van GPI-eiwitten. Door de verminderde biosynthese van GPI-eiwitten wordt de regeneratie van de fungale celwand en de adhesie aan hostcellen geremd [23,24]. Fosmanogepix is een breedspectrum antifungaal geneesmiddel met aangetoonde activiteit tegen *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Coccidioides*,

*Fusarium*, *Scedosporium* spp. en *L. prolificans* [23,24]. Fosmanogepix is zowel oraal als intraveneus beschikbaar. Het toedieningsregime van fosmanogepix bestaat uit een oplaaddosis van tweemaal daags 1000 mg intraveneus gedurende dag 1, waarna gedurende twee dagen eenmaal daags 600 mg wordt gegeven. Vervolgens wordt doorbehandeld met of eenmaal daags 600 mg intraveneus of eenmaal daags 700 mg oraal [11]. Het product heeft een hoge biologische beschikbaarheid van meer dan 90 procent, die niet wordt beïnvloed door voedsel.

In september 2019 heeft de FDA de status van versnelde beoordeling van fosmanogepix aangekondigd, om zo de ontwikkeling te vergemakkelijken. Dit heeft betrekking op de behandeling van invasieve candidiasis, aspergillose, scedosporiose, fusariose, mucormycose, cryptococose en coccidioidomycose [25].

Recent is de fase II-studie APEX (NCT04148287,

toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) voltooid, waarin patiënten met invasieve candidiasis door *C. auris* met fosmanogepix werden behandeld. Daarnaast wordt in de fase II-studie AEGIS (NCT04240886, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) fosmanogepix onderzocht bij patiënten met invasieve schimmelinfecties door *Aspergillus*, *Scedosporium*, *Fusarium* spp. en Mucorales. Tot op heden wordt het nieuwe geneesmiddel goed verdragen en zijn er geen ernstige bijwerkingen gemeld, zoals eerder naar voren is gekomen in studies bij gezonde vrijwilligers en patiënten [11].

Gezien de vele gevoelige pathogenen is de ontwikkeling van fosmanogepix een welkome aanvulling op het huidige arsenaal. Daarnaast is overstap van intraveneuze naar orale therapie na drie dagen mogelijk een optie. De beschikbaarheid van een orale en een intraveneuze formulering biedt een

**Tabel 1.** Overzicht nieuwe antifungale therapieën. DHODH = dihydroorotaat dehydrogenase; GWT1 = GPI-anchored wall transfer protein 1; a = profylaxe; b = behandeling

Geneesmiddel	Geneesmiddel-groep	Aangrijpingspunt	Huidige onderzoeks-fase	Vernieuwing
Rezafungine	Echinocandinen	1,3- $\beta$ -D-glucaan synthetase	III <sup>a,b</sup>	Eénwekelijkse intraveneuze toediening
Ibrexafungerp	Triterpenoïden	1,3- $\beta$ -D-glucaan synthetase	III <sup>b</sup>	Orale toedieningsvorm en breedspectrum activiteit
Olorofim	Orotomiden	DHODH	III <sup>b</sup>	Activiteit tegen multiresistente pathogenen
Fosmanogepix	N-phosphonooxymethyleen prodrugs	GWT1	II <sup>b</sup>	Intraveneuze en orale toedieningsvorm en breedspectrum activiteit
Opelconazol	Triazolen	lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase	II <sup>a</sup>	Inhalatie toedieningsvorm

voordeel, vergeleken met de echinocandinen, waarvan enkel intraveneuze therapie beschikbaar is. Met de grote fase III-studies met fosmanogepix moet nog worden begonnen. Uit deze studies moet blijken of deze positieve trend doorzet.

### Olorofim

Ook olorofim is de eerste van een nieuwe klasse binnen de antifungale geneesmiddelen, namelijk de orotomiden. Het geneesmiddel inhibeert het fungale enzym dihydroorotaat dehydrogenase (DHODH) in de pyrimidinesynthese, zonder significante kruisreactiviteit met humaan DHODH. Door deze selectieve aangrijping blijft de toxiciteit beperkt [26]. Olorofim is een antifungaal middel met activiteit tegen *Aspergillus* spp. (onder andere azool-resistente *A. fumigatus*), *Scedosporium* spp., *Coccidioides* spp. en *L. proliferans* [26].

Olorofim is enkel als orale formulering beschikbaar. Olorofim wordt oraal toegediend met een eenmalige oplaaddosering van tweemaal daags 150 mg, gevolgd door tweemaal daags 90-150 mg [11]. De biologische beschikbaarheid ligt rond de 68 procent.

In oktober 2020 heeft de FDA de status van doorbraaktherapie afgekondigd voor olorofim voor de behandeling van coccidioidomycose. In 2019 verkreeg olorofim deze status al voor de behandeling van invasieve schimmelinfecties bij patiënten met gelimiteerde tot geen behandelopties [27].

De FORMULA-OLS-studie (NCT03583164, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) is een fase IIb-studie waarbij olorofim onderzocht wordt bij patiënten met invasieve schimmelinfecties zonder alternatieve behandelopties. Hierbij is veelal sprake van infecties met de eerdergenoemde resistente pathogenen. Daarnaast is eind november 2021 het OASIS-onderzoek (NCT05101187, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) gestart. In deze fase III-studie zal olorofim worden vergeleken met L-amfotericine B (Ambisome®) therapie bij patiënten met invasieve aspergillose.

Bij gezonde vrijwilligers en de eerste 100 patiënten in het FORMULA-OLS onderzoek zijn geen ernstige bijwerkingen ontdekt [28]. Olorofim is een zwakke remmer van CYP3A4 en wordt ook voornamelijk door CYP3A4 gemetaboliseerd. De klinische relevantie van interacties met en door olorofim zijn vergelijkbaar met fluconazol [11,26,29]. Olorofim biedt perspectief in de behandeling van multiresistente pathogenen als

*Coccidioides* spp., *Aspergillus* spp., *Scedosporium* spp. en *L. proliferans*, daar waar patiënten eerder geen behandelopties meer hadden.

### Opelconazol

Opelconazol behoort tot de groep van de triazolen en heeft dan ook hetzelfde werkingsmechanisme [30]. Het spectrum van opelconazol bestaat uit *Candida*, *Aspergillus* en *Cryptococcus* spp. en *Rhizopus arrhizus/oryzae* [30]. Uniek aan opelconazol is dat het als inhalatietherapie is ontwikkeld in de vorm van een waterige suspensie, waarvan viermaal daags 5 mg wordt verneveld [11,31].

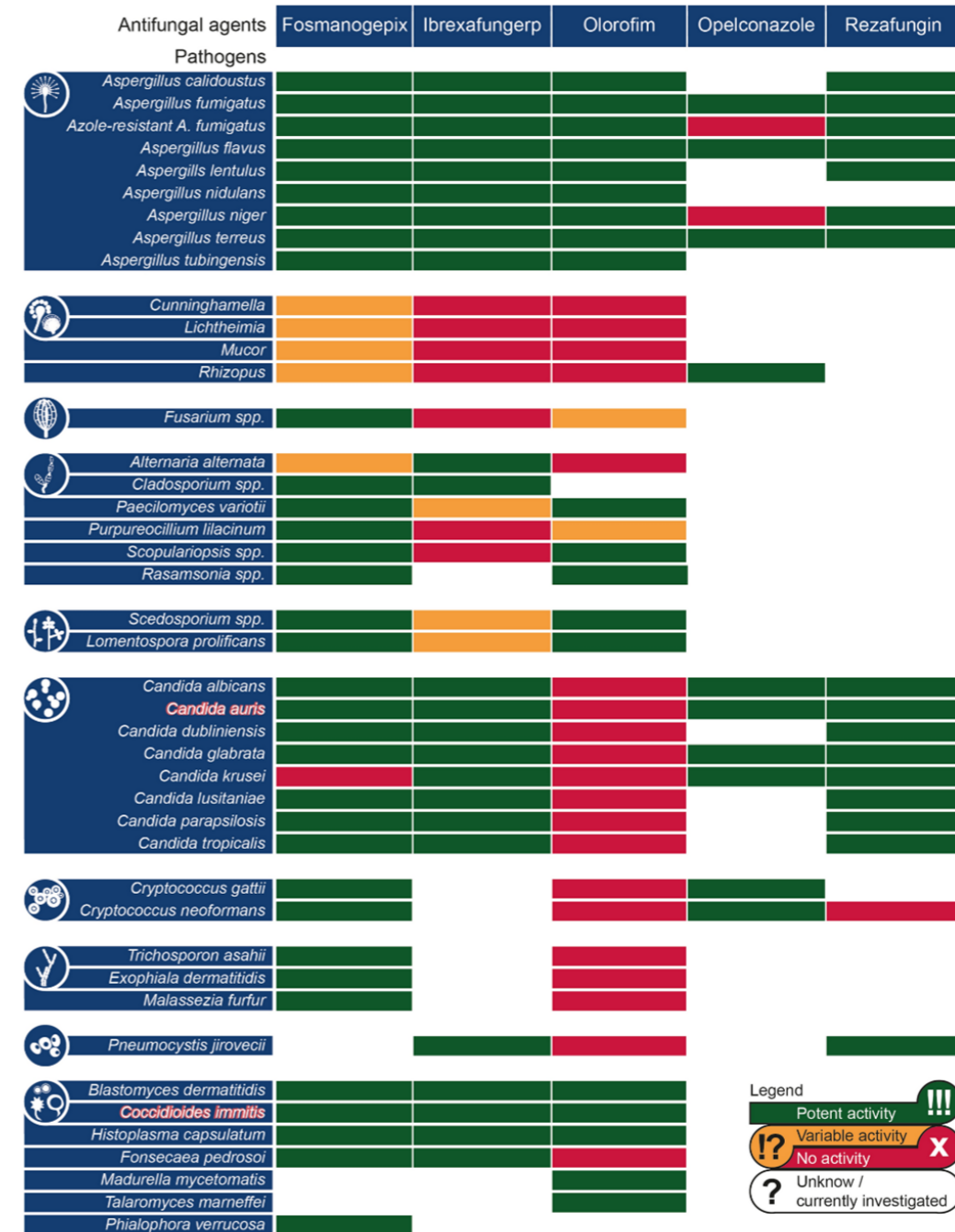
Uit een fase I-studie komen enkel bijwerkingen van voorbijgaande aard als hoesten en een opgezette keel naar voren, die passen bij inhalatietherapieën [32]. De verwachting is dat er minder systemische bijwerkingen worden ontdekt dan bij de huidige triazolen, aangezien opelconazol als lokale therapie niet tot hoge systemische blootstelling leidt. In een recent opgestarte fase II-studie (NCT05037851, toegankelijk via <https://clinicaltrials.gov/>) wordt opelconazol als profylaxe onderzocht ter voorkoming van een pulmonale aspergillose bij longtransplantatiepatiënten.

Zowel als therapie als in de profylaxe van invasieve pulmonale aspergillose ligt een rol weggelegd voor opelconazol. Opelconazol kan in combinatie met systemische azooltherapie bij invasieve pulmonale aspergillose worden toegepast om een hoge blootstelling in de longen te verkrijgen en de systemische toxiciteit te beperken. Daarnaast kan opelconazol mogelijk worden toegepast bij chronische pulmonale aspergillose (CPA), waarbij patiënten langdurig pulmonaal behandeld dienen te worden.

Een kort overzicht van de beschreven geneesmiddelen in ontwikkeling is weergegeven in *tabel 1* (pagina 57). Een overzicht van het spectrum van activiteit is weergegeven in *figuur 1*. Voor alle geneesmiddelen geldt dat er nog meer onderzoek nodig is voordat de geneesmiddelen veilig in de dagelijkse klinische praktijk voorgeschreven kunnen worden. Zo zullen de resultaten van fase II- en III-studies uitwijzen of de geneesmiddelen voldoende effectiviteit en geringe toxiciteit hebben. Daarnaast is meer langdurig onderzoek nodig om de langetermijneffecten in kaart te brengen, ook na de mogelijke registratie van de antifungale middelen.

Concluderend hebben de antifungale middelen die in dit artikel zijn besproken potentie om naast het huidige arsenaal aan beschikbare middelen een belangrijke

plaats in te nemen in de profylaxe en behandeling van invasieve schimmelinfecties.



**Figuur 1.** Spectrum van activiteit. Overgenomen van Hoenigl et al. *Drugs* 81, 1703-29 (2021). The Antifungal Pipeline: osmanogepix, ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin

## Conflicts of interest

None for this paper. No funding was obtained for this draft. Outside of this paper: RJMB has served as a consultant to Astellas Pharma, Inc., F2G, Amplyx, Scynexis, Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme Corp., Mundipharma, and Pfizer, Inc., and has received unrestricted and research grants from Astellas Pharma, Inc., Gilead Sciences, Merck Sharp & Dohme Corp., and Pfizer, Inc. All contracts were through Radboudumc, and all payments were invoiced by Radboudumc.

## Referentie

- Brown GD, Denning DW, Gow NA, Levitz SM, Netea MG, White TC. Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*. 2012;4:165rv13.
- Koehler P, Bassetti M, Chakrabarti A, et al. Defining and managing COVID-19-associated pulmonary aspergillosis: the 2020 ECMM/ISHAM consensus criteria for research and clinical guidance. *Lancet Infect Dis*. 2021;21:e149-e62.
- Bruggemann RJ, Verheggen R, Boerrigter E, et al. Management of drug-drug interactions of targeted therapies for haematological malignancies and triazole antifungal drugs. *Lancet Haematol*. 2022;9:e58-e72.
- Perfect JR. The antifungal pipeline: a reality check. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16:603-16.
- Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51:333-9.
- Carmona EM, Limper AH. Overview of Treatment Approaches for Fungal Infections. *Clin Chest Med*. 2017;38:393-402.
- Wiederhold NP. Antifungal resistance: current trends and future strategies to combat. *Infect Drug Resist*. 2017;10:249-59.
- Safdar A, Ma J, Saliba F, et al. Drug-induced nephrotoxicity caused by amphotericin B lipid complex and liposomal amphotericin B: a review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2010;89:236-44.
- Hamill RJ. Amphotericin B formulations: a comparative review of efficacy and toxicity. *Drugs*. 2013;73:919-34.
- Garcia-Effron G. Rezafungin-Mechanisms of Action, Susceptibility and Resistance: Similarities and Differences with the Other Echinocandins. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4).
- Hoeningl M, Sprute R, Egger M, et al. The Antifungal Pipeline: Fosmanogepix, Ibrexafungerp, Olorofim, Opelconazole, and Rezafungin. *Drugs*. 2021;81:1703-29.
- Miesel L, Cushion MT, Ashbaugh A, Lopez SR, Ong V. Efficacy of Rezafungin in Prophylactic Mouse Models of Invasive Candidiasis, Aspergillosis, and Pneumocystis Pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(3).
- Thompson GR, Soriano A, Skoutelis A, et al. Rezafungin Versus Caspofungin in a Phase 2, Randomized, Double-blind Study for the Treatment of Candidemia and Invasive Candidiasis: The STRIVE Trial. *Clin Infect Dis*. 2021;73:e3647-e55.
- Ong V, Sandison T, Flanagan S. No Relevant Pharmacokinetic (PK) Interaction between Rezafungin and Nine Probe Drugs: Results from a Drug-Drug Interaction (DDI) Study. *Biol Blood Marrow Tr*. 2019;25(3).
- Ong V, Hough G, Schlosser M, et al. Preclinical Evaluation of the Stability, Safety, and Efficacy of CD101, a Novel Echinocandin. *Antimicrob Agents Ch*. 2016;60:6872-9.
- Sandison T, Ong V, Lee J, Thye D. Safety and Pharmacokinetics of CD101 IV, a Novel Echinocandin, in Healthy Adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(2).
- Wring SA, Randolph R, Park S, et al. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Target of SCY-078, a First-in-Class Orally Active Antifungal Glucan Synthesis Inhibitor, in Murine Models of Disseminated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4).
- Schell WA, Jones AM, Borroto-Esoda K, Alexander BD. Antifungal Activity of SCY-078 and Standard Antifungal Agents against 178 Clinical Isolates of Resistant and Susceptible Candida Species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11).
- Rivero-Menendez O, Soto-Debran JC, Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A. In Vitro Activity of Ibrexafungerp against a Collection of Clinical Isolates of Aspergillus, Including Cryptic Species and Cyp51A Mutants, Using EUCAST and CLSI Methodologies. *J Fungi (Basel)*. 2021;7(3).
- Petratis V, Petratiene R, Katragkou A, et al. Combination Therapy with Ibrexafungerp (Formerly SCY-078), a First-in-Class Triterpenoid Inhibitor of (1->3)-beta-d-Glucan Synthesis, and Isavuconazole for Treatment of Experimental Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(6).
- US Food and Drug Administration CfDEaR. NDA Multi-disciplinary Review and Evaluation: NDA 214900: BEXAFEMME (ibrexafungerp) 2020.
- Wring S, Murphy G, Atiee G, et al. Clinical Pharmacokinetics and Drug-Drug Interaction Potential for Coadministered SCY-078, an Oral Fungicidal Glucan Synthase Inhibitor, and Tacrolimus. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2019;8:60-9.
- Shaw KJ, Ibrahim AS. Fosmanogepix: A Review of the First-in-Class Broad Spectrum Agent for the Treatment of Invasive Fungal Infections. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4).
- Miyazaki M, Horii T, Hata K, et al. In vitro activity of E1210, a novel antifungal, against clinically important yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(10):4652-8.
- European Pharmaceutical Review. Fast Track designation granted to fosmanogepix for seven indications. [Internet]. Available from: <https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/news/99331/fast-track-designation-granted-fosmanogepix/>. [Accessed 21st February 2022].
- Rauseo AM, Coler-Reilly A, Larson L, Spec A. Hope on the Horizon: Novel Fungal Treatments in Development. *Open Forum Infect Dis*. 2020;7:ofaa016.
- PR Newswire. F2G Receives Second US FDA Breakthrough Therapy Designation for Olorofim. [Internet]. Available from: <https://www.prnewswire.com/news-releases/f2g-receives-second-us-fda-breakthrough-therapy-designation-for-olorofim-301157698.html>. [Accessed 21st February 2022].
- Kennedy T, Allen G, Steiner J, Heep M, Birch M. Assessment of the duration of infusion on the tolerability and repeat dose pharmacokinetics of F901318 in healthy volunteers. *ECCMID: Viena, Austria*. 2017.
- Van Daele R, Spriet I, Wauters J, et al. Antifungal drugs: What brings the future? *Med Mycol*. 2019;57(Supplement\_3):S328-S43.
- Colley T, Alanio A, Kelly SL, et al. In Vitro and In Vivo Antifungal Profile of a Novel and Long-Acting Inhaled Azole, PC945, on Aspergillus fumigatus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(5).
- Murray A, Cass L, Ito K, et al. PC945, a Novel Inhaled Antifungal Agent, for the Treatment of Respiratory Fungal Infections. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4).
- Cass L, Murray A, Davis A, et al. Safety and nonclinical and clinical pharmacokinetics of PC945, a novel inhaled triazole antifungal agent. *Pharmacol Res Perspect*. 2021;9:e00690.

# Candida auris: huidige inzichten

Eelco F.J. Meijer, Andreas Voss, Jacques F. Meis

## Samenvatting

*Candida auris* is een recent beschreven gist die wereldwijd invasieve infecties en ziekenhuisuitbraken veroorzaakt. Sinds de ontdekking in 2009 zijn er vijf verschillende clades beschreven, verspreid over meer dan 50 landen en alle continenten, behalve Antarctica. *C. auris* is vaak resistent voor één of meer klassen antifungale middelen en veroorzaakt invasieve schimmelinfecties met hoge mortaliteit in ziekenhuizen. Met name beademde patiënten met lichaamsvreemd materiaal en verschillend comorbiditeiten afkomstig uit ziekenhuizen met *C. auris*-uitbraken lopen risico. Europa is hierop geen uitzondering. De unieke eigenschappen van *C. auris*, waaronder biofilmvorming naast zout- en thermotolerantie, geven deze gist de mogelijkheid om langdurig binnen en buiten het lichaam te overleven. Detectie, behandeling en eliminatie van deze gist is wereldwijd een uitdaging gebleken, zelfs wanneer een ziekenhuis (voorheen) adequate ziekenhuisinfectiepreventiemaatregelen hanteerde. Dit overzicht beschrijft de epidemiologie, diagnostiek, pathogenese, antifungale gevoeligheid, behandeling en huidige infectiepreventie-inzichten van *C. auris*.

## Summary

*Candida auris* is an emerging pathogenic yeast causing nosocomial infections and is considered a serious global health threat. It was first reported as a novel Candida species in 2009 and five different clades have been isolated in over 50 countries on all continents, with the sole exception of Antarctica. *C. auris* is often multidrug-resistant and causes invasive infections associated with high mortality in susceptible hospitalized patients, particularly those with indwelling vascular catheters and multiple comorbidities in intensive care settings. Its unique combined properties, including salt- and thermo-tolerance in addition to biofilm formation, allow for

longterm patient colonization and survival outside the human body. The detection, control and elimination of this pathogen has proven challenging, allowing for nosocomial transmission even when implementing formerly successful infection prevention and control measures. This review discusses the current insights on epidemiology, diagnostics, pathogenicity, drug-resistance, treatment, and hospital infection prevention and control measures of this emerging global threat.

## Introductie

*Candida auris* werd voor het eerst beschreven in 2009, nadat de toen nog onbekende gist werd gevonden in de externe gehoorgang van een Japanse vrouw in Tokyo, Japan [1]. De gist groeide bij 40 graden Celsius, een zeldzame eigenschap die gedeeld wordt door onder andere de meer pathogene *Candida* species *C. albicans* en *C. glabrata*. ITS-sequencing plaatste de gist in de familie Metschnikowiaceae, een familie met intrinsiek resistente Candida-soorten waaronder de vaker voorkomende *C. lusitanae*. De gist bleek nauw verwant aan *C. haemulonii* en *C. pseudohaemulonii*, berucht om hun intrinsieke fluconazol en amfotericine B-resistentie. Omdat de gist in het oor gevonden werd volgde daarop de species naam 'auris', latijn voor 'oor'.

Expertisecentrum Schimmelinfecties Radboudumc/ CWZ, Nijmegen. Canisius Wilhelmina Hospital (CWZ), afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Nijmegen. Radboudumc, afdeling Medische Microbiologie, Nijmegen, Nederland. E.F.J. Meijer, arts-microbioloog in opleiding, prof. dr. A. Voss, arts-microbioloog, hoogleraar infectiepreventie, dr. J.F. Meis, arts-microbioloog. De laatste is ook verbonden aan het Bioprocess Engineering and Biotechnology Graduate Program, Federal University of Paraná, Brazilië. Correspondentieadres: Eelco Meijer (Eelco.Meijer@cwz.nl).

De volgende jaren dook *C. auris* meer en meer op als veroorzaker van invasieve infecties en ziekenhuisuitbraken wereldwijd. Inmiddels is *C. auris* als 'urgent threat' in de Verenigde Staten op de *Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2019 Antibiotic Resistance Threats* geplaatst [2].

### Epidemiologie

Na de eerste beschrijving in Japan [1] werden casus gemeld in Zuid-Korea met otitis media en candidemieën [3,4]. In de jaren erna werden ook candidemieën met *C. auris* beschreven in India, Zuid-Afrika, Koeweit, Pakistan en Venezuela [5]. Analyse via whole genome sequencing liet zien dat de gevonden *C. auris*-stammen behoorden tot verschillende clades, genetisch behorend tot Zuid-Azië (clade I), Oost-Azië (clade II), Afrika (clade III), en Zuid-Amerika (clade IV), die onderling 40.000 tot 140.000 'single nucleotide polymorphisms' (SNP's) verschillen [6]. Recent kwamen daar uitbraken in Noord-Amerika en Europa bij [6-8], met gevallen uit Duitsland en Nederland waar isolaten uit de clades Zuid-Azië [9,10] en Afrika zijn gevonden (persoonlijke communicatie). In Iran is inmiddels de vijfde clade geïdentificeerd, die meer dan 200.000 SNP's verschilt met alle andere clades [11]. Het verschil in SNP's is een bewijs voor het verschil in oorsprong. Daarna zijn 30.000 isolaten uit meer dan 40 landen in retrospect bekeken en bleken de eerste candidemieën met *C. auris* al in 1996 in Zuid-Korea [12] aanwezig geweest te zijn. De eerste retrospectief gevonden Europese casus, bij een patiënt in Frankrijk in 2007, kwam uit India ruim voor de eerste beschreven uitbraken in India in 2012 [13]. Sindsdien is verdere verspreiding wereldwijd onmiskenbaar, met de ziekenhuizen als belangrijkste bron van verspreiding. Inmiddels is *C. auris* wijdverspreid in meer dan 50 landen (figuur 1) en zijn duizenden casus beschreven. Per 2021 zijn er meer dan 1000 klinische casus en 3772 *C. auris*-gekoloniseerde patiënten alleen al in de Verenigde Staten [14]. Er zijn 620 *C. auris*-casus beschreven tussen 2013 en 2017 in Europa; circa 75 procent betrof kolonisatie en 18 procent candidemieën. Waarschijnlijk betreft dit een onderschatting aangezien veel landen diagnostiek en kennis niet op orde hadden [15]. De reden waarom *C. auris* nu simultaan op verschillende continenten opduikt is nog altijd onbekend, al lijkt de betrokkenheid van klimaatverandering een reële mogelijkheid [16].

### Diagnostiek

*C. auris* groeit (crème-)wit op Sabouraud dextrose agar, kan binnen enkele dagen groeien bij 40 graden Celsius en groeit trager bij 42 graden Celsius. Microscopisch zijn ovale, knopvormende (budding) gisten te zien en de meeste subspecies vormen geen pseudohyfen. De nauw verwante *C. lusitanae*, *C. haemulonii* en *C. pseudohaemulonii* groeien niet bij 42 graden Celsius en vormen juist wel pseudohyfen. Bijzonder voor *C. auris* is de zouttolerantie, waardoor *C. auris* goed kan groeien in aanwezigheid van 10 procent natriumchloride. Chromogene platen zijn op het moment van schrijven niet bruikbaar voor identificatie [17], maar kunnen nuttig zijn om *C. auris* verdachte kolonies te identificeren in een mengcultuur als de kleur verschilt van andere *Candida* species. Op Sabouraud agar bij 30 tot 35 graden Celsius kan groei tot 10 dagen duren en zijn foutnegatieve uitslagen beschreven bij bemonstering van de omgeving en huid. Zowel de sensitiviteit als de specificiteit van de kweek kan tot vrijwel 100 procent verhoogd worden bij ophoping in Sabouraudbouillon met 72-uurs incubatie bij 40 graden Celsius met toegevoegde voedingsstoffen (dulcitol, mannitol of dextrose), 10 procent natriumchloride, en eventueel gentamicine en chlooramfenicol [18]. Identificatie kan tegenwoordig uitstekend met malditofms. Voorheen werd *C. auris* door alle geautomatiseerde systemen foutief gedetermineerd als *C. haemulonii*, *C. duobushaemulonii*, maar ook als andere *Candida* species, *Rhodotorula glutinis* en *Saccharomyces* species [19]. *C. auris*-rondzendingen in Nederland en België lieten zien dat identificatie in veel gevallen niet foutloos was [20]. Gebruikmakend van geactualiseerde databanken met gevalideerde *C. auris*-spectra zijn sensitiviteit en specificiteit tegen de 100 procent gerapporteerd voor zowel Vitek MS (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankrijk) als MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Duitsland). ITS (internal transcribed spacer) PCR, 28S PCR of whole-genome sequencing worden beschouwd als valide alternatieven op dit moment [21]. 'In-house' PCR zijn beschreven, maar commerciële mogelijkheden zijn er nog niet [8,22]. Voor het typeren van de clades bij uitbraken bestaat een goedkoop maar betrouwbaar alternatief voor whole-genome sequencing (WGS), dat gebruikmaakt van een short tandem repeat (STR) typing assay [23] (Expertisecentrum Schimmelinfecties Radboudumc/CWZ, Nijmegen, Nederland).

Figuur 1. Landen waar *Candida auris* inmiddels gerapporteerd is (blauw). Bron: mapchart.net



### Pathogenese

*Candida albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* en *C. parapsilosis* veroorzaken de meeste candidemieën wereldwijd. Jaarlijks neemt het aantal candidemieën met *C. auris* echter toe met een geschatte mortaliteit van 30 tot 60 procent [24]. *C. parapsilosis* en *C. auris* zijn bekend om langdurige kolonisatie van de huid en lichaamsvreemd materiaal, met overleving op plastics buiten het lichaam van meer dan twee en vier weken voor respectievelijk *C. auris* en *C. parapsilosis* [18]. Langdurige overleving op stof, natte maar ook droge en niet-poreuze oppervlakken is ook voor beide species beschreven [24]. *C. parapsilosis*-isolaten uit de ziekenhuisomgeving bleken in vitro zelfs meer virulent [25]. Bovendien zijn deze species berucht vanwege nosocomiale verspreiding en uitbraken met significante mortaliteit bij immuungecompromitteerde patiënten en patiënten op de intensive care. In verschillende studies is naar virulentie gekeken. In diermodellen bleken *C. albicans* en *C. auris* vergelijkbaar qua virulentie, waarbij *C. auris* minder biofilm lijkt te vormen. Ook kon *C. auris* beter repliceren en liet *C. auris* een verhoogde mortaliteit zien opzichte van *C. glabrata* en *C. haemulonii* [26,27]. Daarnaast hadden *C. auris* en *C. albicans* in een ex vivo humaan bloedmodel vergelijkbare pathogeniteit [24]. Genetisch is nog veel onbekend. Via WGS lijkt *C. auris* veel op *C. haemulonii* en *C. lusitanae*, wat de zouttolerantie

en thermotolerante eigenschappen kan verklaren. Vergeleken met andere *Candida* species blijkt *C. auris* maar enkele tientallen unieke genen te bezitten die met name coderen voor additionele 'drug-efflux'-pompen, bijdragend aan antifungale resistentie [28]. Diverse mutaties zijn geconserveerd in *C. auris* waaronder in ERG11, het lanosterol 14  $\alpha$ -demethylase-aangrijpingspunt van azolen, FKS1, het echinocandinen-aangrijpingspunt 1,3-beta-glucan synthetase, en FUR1, het flucytosine-aangrijpingspunt uracil phosphoribosyl-transferase [24,29,30]. Daarnaast zijn genen beschreven die zorgen voor het uitscheiden van lipases en het maken van biofilm [31]; ook is bij *C. auris* unieke activatie van resistentiegenen beschreven bij blootstelling aan azolen en amfotericine B [28].

### Fenotypische gevoeligheid en behandeling

Arendrup *et al.* [32] hebben in 2017 EUCAST- en CLSI-breekpunten voorgesteld op basis van 'epidemiological cut-off values' (ECOFF's), waarna de Amerikaanse CDC de volgende voorlopige CLSI-breekpunten heeft geadviseerd: fluconazol > 16 mg/l; amfotericine B > 1 mg/l; caspofungine > 1 mg/l; micafungine > 2 mg/l; en anidulafungine > 2 mg/l. Op dit moment zijn er geen gecontroleerde studies waarin de morbiditeit en mortaliteit bij een gekozen therapie worden bekeken.



*C. auris* is meestal resistent voor een of meer antifungale middelen met grote verschillen tussen de vijf clades per regio en uitbraak [33]. *C. auris* is de enige gist waar meermaals resistentie is gevonden voor alle klassen antifungale middelen die momenteel beschikbaar zijn, tot 4 procent in subpopulaties [5,34,35]. In 350 verschillende isolaten uit India (tussen 2009 en 2017) was 25 procent van de isolaten resistent voor twee antifungale klassen en 13 procent voor meer dan twee klassen ('multidrugresistant'; MDR). Op grond van bovenstaande voorlopige CLSI-breek-punten bleek de fenotypische 'resistentie' voor fluconazol 90 procent; amfotericine B 8 procent; caspofungine 7,1 procent; anidulafungine 2 procent en micafungine 2 procent [30]. Het percentage boven ECOFF voor voriconazol was 15 procent; flucytosine 16 procent; itraconazol 3,4 procent; isavuconazol 3,7 procent en posaconazol 2 procent. Terbinafine en nystatine waren altijd resistent. In een grote meta-analyse uit 2018 [36] met 742 isolaten wereldwijd bleek 'resistentie' voor fluconazol 80,8 procent; amfotericine B 26,2 procent; caspofungine 8 procent; anidulafungine 5,3 procent en micafungine 5 procent. Het percentage boven ECOFF voor voriconazol was 38,1 procent; flucytosine 8 procent; itraconazol 7,2 procent; isavuconazol 9,2 procent en posaconazol 6,3 procent.

In *C. auris*-isolaten uit alle vijf clades waren in een in vitro biofilmassay de MIC's fors verhoogd voor de azolen, echinocandinen en liposomaal amfotericine B; de MIC voor conventioneel amfotericine B was het vaakst nog binnen therapeutische range [37]. Nitroxoline blijkt uitstekende activiteit te hebben tegen *C. auris* (MIC's 0,125-1 mg/l), hetgeen mogelijk een waardevol alternatief is voor fluconazol of amfotericine B blaaspoeling bij candidurie [38]. Nitroxoline is niet beschikbaar in Nederland, maar wel in Duitsland voor ongecompliceerde bacteriële urineweginfecties (EUCAST breekpunt *Escherichia coli* > 16 mg/l) met standaarddosering 3 dd 250 mg.

Indien *C. auris* wordt gevonden bij een patiënt, is gevoeligheidsbepaling altijd geïndiceerd. De Nederlandse SWAB-richtlijn invasieve schimmelinfecties (SWAB Guidelines for the Management of Invasive Fungal Infections, 2017) is grotendeels conform de huidige internationale consensus voor empirische therapie bij een *C. auris*-candidemie. Bij volwassenen is de empirische therapie van voorkeur echinocandine-monotherapie, met liposomaal amfotericine B als tweede keus. Fluconazol is empirisch geen optie vanwege de hoge kans op resistentie. Er is geen bewijs

voor betere effectiviteit van dubbeltherapie, ondanks in-vitrosynergie tussen micafungine en voriconazol in MDR *C. auris* wanneer bij minstens een van de middelen een lage MIC is gemeten [39]. Verdere adviezen sluiten aan bij wat gebruikelijk is in Nederland bij candidemieën.

### Ziekenhuisinfectiepreventie

Uitbraken met *C. auris* zijn wereldwijd beschreven, op alle continenten behalve Antarctica, waaronder in Europese ziekenhuizen in Spanje, Engeland en Italië [35]. Kennislacunes waaronder inadequate diagnostiek, uitzonderlijke infectiepreventiemaatregelen en het simpelweg geen rekening houden met *C. auris* speelden bij het ontstaan van uitbraken een rol. Intrinsieke eigenschappen van deze gist zoals hierboven beschreven maakt deze species extra succesvol in het veroorzaken van uitbraken, waaronder de langdurige overleving op lichaamsvreemd materiaal (biofilm) alsmede langdurige overleving buiten het lichaam. Er zijn echter meer variabelen die bijdragen aan verspreiding.

Kolonisatie van patiënten betreft vaak de huid, de oksels en liezen, die niet standaard worden meegenomen bij een screening op bijzonder resistente micro-organismen (BRMO) [35]. Bovendien dient men een Sabouraudbouillon met 10 procent natriumchloride te gebruiken om foutnegatieve kweken te voorkomen (zie diagnostiek). Andere locaties zijn ook beschreven, waaronder rectaal, vaginaal, urinewegen, mond, neus, oren, in wonden en op lichaamsvreemd materiaal. In ziekenhuizen met een *C. auris*-uitbraak hebben beademde patiënten met lichaamsvreemd materiaal het hoogste risico op kolonisatie.

Transmissie is al beschreven bij 4 uur contacttijd en invasieve infecties binnen 48 uur na contact [31]. In eerdere Europese casus resulteerde kolonisatie bij circa 24 procent van de patiënten tot een infectie of candidemie [15].

De gebruikelijke handhygiëne met producten op meer dan 70 procent alcoholbasis (EN 1500) is effectief om transmissie te voorkomen. Patiënten gekoloniseerd of geïnfecteerd met *C. auris* moeten in een eigen kamer geplaatst worden, met minimaal contactisolatie maar bij voorkeur in strikte isolatie met negatieve druk [35]. Verspreiding van *C. auris* is beschreven naar kleding, gordijnen, kussens, matrassen, disposables, doucheputjes, oorthermometers, infuuspalen, monitoren, en andere (verrijdbare) medische apparatuur, waarna *C.*

*auris* nog wekenlang levensvatbaar kan zijn [24,40]. Sporicide desinfectans en desinfectans op basis van waterstofperoxide zijn ook bewezen bruikbaar [41]. Minimaal tweemaaldaags schoonmaken met wegwerpmateriaal wordt aanbevolen [35]. Effectiviteit tegen *C. auris* moet specifiek vermeld staan bij schoonmaakmiddelen met quaternaire ammoniumverbindingen omdat deze niet altijd werkzaam zijn. Onder bijzondere omstandigheden (uitbraak) wordt aansluitend een eindschoonmaak met waterstofperoxideverneveling of UV-C geadviseerd [42]. Rigoureuze infectiepreventiemaatregelen zijn kosteneffectief; een *C. auris*-uitbraak in London in 2016 heeft meer dan een miljoen pond gekost [43].

Indien een opgenomen patiënt gekoloniseerd is met *C. auris*, zijn infectiepreventiemaatregelen altijd noodzakelijk. Patiënten met bewezen kolonisatie kunnen jaren gekoloniseerd blijven ondanks dat er tussentijds bij herhaling sprake is van negatieve kweken. Het is onbekend wanneer vervolgekweken nuttig zijn. De Amerikaanse CDC stelt om minimaal drie maanden te wachten na positieve kweek, voordat evaluatie voor kolonisatie gedaan mag worden met bemonstering op voorheen positieve locaties met additionele oksel- en liesinventarisatie. Al het lichaamsvreemde materiaal moet verwijderd zijn, andere risicofactoren verdwenen en eventuele antifungale therapie moet minimaal één week gestaakt zijn (expert opinion). Experts stellen dat indien twee sets met minimaal een week tussenpoos negatief zijn, isolatiemaatregelen kunnen worden opgeheven.

In Nederland zal het beleid om isolatiemaatregelen op te heffen voor *C. auris* anders zijn gezien de bestaande richtlijnen rondom BRMO. De CDC-gestelde termijn van drie maanden is ook discutabel, aangezien er studies zijn die langere kolonisatie van circa acht maanden [44] en meer dan 24 maanden [31] bij patiënten aantonen. Het afnemen van een neuskweek kan ook van meerwaarde zijn aangezien geïsoleerde neuskolonisatie bij patiënten [45] en ziekenhuispersoneel [46] beschreven is. Het advies in Nederland moet zijn om een set van keel-, neus- en (peri-)anale kweken met additionele swab van oksel en lies plus andere eerder positief bevonden locaties af te nemen, minimaal 12 maanden na de eerste negatieve kweken. Geadviseerd wordt om kolonisatie niet te behandelen. Topicale chloorhexidine- of systemische antifungale therapie is ineffectief gebleken om patiënten te dekoloniseren [31,35,47].

### Conclusie

De afgelopen jaren heeft de gist *Candida auris* zich wereldwijd verspreid, simultaan op verschillende continenten. Kenmerkend is de vergelijkbare virulentie met de meest pathogene *Candida*-soorten die we kennen, in combinatie met uitdagende diagnostiek, kennislacunes, uitstekende overleving buiten het lichaam door zout- en thermotolerantie, biofilmvorming op lichaamsvreemde materialen en veelvoorkomende resistentie voor een, meer of zelfs alle beschikbare antifungale klassen met hoge mortaliteit bij infectie tot gevolg. Beademde patiënten met lichaamsvreemd materiaal afkomstig uit ziekenhuizen met *C. auris*-uitbraken hebben het hoogste risico op dragerschap. Daarnaast zijn gangbare protocollen voor mycologie-kweken en het screenen op BRMO niet sensitief genoeg om *C. auris* te detecteren. *C. auris* verdient een plek op de prioriteitenlijst van infectiepreventiemaatregelen in het ziekenhuis. Het heeft de aanbeveling om protocollen waar nodig te herzien.

### Referenties

1. Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol.* 2009;53:41-4.
2. Kadri SS. Key Takeaways From the U.S. CDC's 2019 Antibiotic Resistance Threats Report for Frontline Providers. *Crit Care Med.* 2020;48:939-45.
3. Kim MN, Shin JH, Sung H, et al. *Candida haemulonii* and closely related species at 5 university hospitals in Korea: identification, antifungal susceptibility, and clinical features. *Clin Infect Dis.* 2009;48:e57-61.
4. Lee WG, Shin JH, Uh Y, et al. First three reported cases of nosocomial fungemia caused by *Candida auris*. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3139-42.
5. Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S, et al. Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses. *Clin Infect Dis.* 2017;64:134-40.
6. Adams E, Quinn M, Tsay S, et al. *Candida auris* in Healthcare Facilities, New York, USA, 2013-2017. *Emerg Infect Dis.* 2018;24:1816-24.
7. Ruiz-Gaitán A, Moret AM, Tasiias-Pitarch M, et al. An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital. *Mycoses.* 2018;61:498-505.
8. Saris K, Meis JF, Voss A. *Candida auris*. *Curr Opin Infect Dis.* 2018;31:334-40.
9. Steinmann J, Schrauzer T, Kirchhoff L, Meis JF, Rath PM. Two *Candida auris* Cases in Germany with No Recent Contact to Foreign Healthcare-Epidemiological and Microbiological Investigations. *J Fungi (Basel).* 2021;7(5).
10. Vogelzang EH, Weersink AJL, Mansfeld R van, Chow NA, Meis JF, Dijk K van. The First Two Cases of *Candida auris* in The Netherlands. *J Fungi (Basel).* 2019;5(4).
11. Safari F, Madani M, Badali H, et al. A Chronic Autochthonous Fifth Clade Case of *Candida auris* Oromycosis in Iran. *Mycopathologia.* 2022;187:121-7.

12. Desnos-Ollivier M, Fekkar A, Bretagne S. Earliest case of *Candida auris* infection imported in 2007 in Europe from India prior to the 2009 description in Japan. *J Mycol Med*. 2021;31:101139.
13. Chowdhary A, Sharma C, Duggal S, et al. New clonal strain of *Candida auris*, Delhi, India. *Emerg Infect Dis*. 2013;19:1670-3.
14. Centers for Disease Control and Prevention. Tracking *Candida auris*: Case Count United States 2021. Retrieved March 3, 2022 from URL: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html>
15. Kohlenberg A, Struelens MJ, Monnet DL, Plachouras D. *Candida auris*: epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness in European Union and European Economic Area countries, 2013 to 2017. *Euro Surveill*. 2018;23(13).
16. Casadevall A, Kontoyiannis DP, Robert V. On the Emergence of *Candida auris*: Climate Change, Azoles, Swamps, and Birds. *mBio*. 2019;10(4).
17. de Jong AW, Dieleman C, Carbia M, Mohd Tap R, Hagen F. Performance of Two Novel Chromogenic Media for the Identification of Multidrug-Resistant *Candida auris* Compared with Other Commercially Available Formulations. *J Clin Microbiol*. 2021;59(4).
18. Welsh RM, Bentz ML, Shams A, et al. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. *J Clin Microbiol*. 2017;55:2996-3005.
19. Girard V, Mailler S, Chetry M, et al. Identification and typing of the emerging pathogen *Candida auris* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time of flight mass spectrometry. *Mycoses*. 2016;59:535-8.
20. Buil JB, van der Lee HAL, Curfs-Breuker I, Verweij PE, Meis JF. External Quality Assessment Evaluating the Ability of Dutch Clinical Microbiological Laboratories to Identify *Candida auris*. *J Fungi (Basel)*. 2019;5(4).
21. Vatanshenassan M, Boekhout T, Mauder N, et al. Evaluation of Microsatellite Typing, ITS Sequencing, AFLP Fingerprinting, MALDI-TOF MS, and Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Analysis of *Candida auris*. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(3).
22. Leach L, Zhu Y, Chaturvedi S. Development and Validation of a Real-Time PCR Assay for Rapid Detection of *Candida auris* from Surveillance Samples. *J Clin Microbiol*. 2018;56(2).
23. de Groot T, Puts Y, Berrio I, Chowdhary A, Meis JF. Development of *Candida auris* Short Tandem Repeat Typing and Its Application to a Global Collection of Isolates. *mBio*. 2020;11(1).
24. Allert S, Schulz D, Kämmer P, et al. From environmental adaptation to host survival: Attributes that mediate pathogenicity of *Candida auris*. *Virulence*. 2022;13:191-214.
25. Sabino R, Sampaio P, Carneiro C, Rosado L, Pais C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. *BMC Microbiol*. 2011;11:180.
26. Fakhim H, Vaezi A, Dannaoui E, et al. Comparative virulence of *Candida auris* with *Candida haemulonii*, *Candida glabrata* and *Candida albicans* in a murine model. *Mycoses*. 2018;61:377-82.
27. Hernando-Ortiz A, Mateo E, Perez-Rodríguez A, de Groot PWJ, Quindós G, Eraso E. Virulence of *Candida auris* from different clinical origins in *Caenorhabditis elegans* and *Galleria mellonella* host models. *Virulence*. 2021;12:1063-75.
28. Muñoz JF, Gade L, Chow NA, et al. Genomic insights into multidrug-resistance, mating and virulence in *Candida auris* and related emerging species. *Nat Commun*. 2018;9:5346.
29. Sharma D, Paul RA, Rudramurthy SM, et al. Impact of FKS1 Genotype on Echinocandin In Vitro Susceptibility in *Candida auris* and In Vivo Response in a Murine Model of Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66:e0165221.
30. Chowdhary A, Prakash A, Sharma C, et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009-17) in India: role of the ERG11 and FKS1 genes in azole and echinocandin resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73:891-9.
31. Ahmad S, Alfouzan W. *Candida auris*: Epidemiology, Diagnosis, Pathogenesis, Antifungal Susceptibility, and Infection Control Measures to Combat the Spread of Infections in Healthcare Facilities. *Microorganisms*. 2021;9(4).
32. Arendrup MC, Prakash A, Meletiadis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(6).
33. Szekeley A, Borman AM, Johnson EM. *Candida auris* Isolates of the Southern Asian and South African Lineages Exhibit Different Phenotypic and Antifungal Susceptibility Profiles In Vitro. *J Clin Microbiol*. 2019;57(5).
34. Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. *PLoS Pathog*. 2017;13:e1006290.
35. Kenters N, Kierman M, Chowdhary A, et al. Control of *Candida auris* in healthcare institutions: Outcome of an International Society for Antimicrobial Chemotherapy expert meeting. *Int J Antimicrob Agents*. 2019;54:400-6.
36. Osei Sekyere J. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. *Microbiologyopen*. 2019;8:e00901.
37. Chatzimoschou A, Giampani A, Meis JF, Roilides E. Activities of nine antifungal agents against *Candida auris* biofilms. *Mycoses*. 2021;64:381-4.
38. Fuchs F, Hof H, Hofmann S, Kurzai O, Meis JF, Hamprecht A. Antifungal activity of nitroxoline against *Candida auris* isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27:1697.e7-1697.e10.
39. Fakhim H, Chowdhary A, Prakash A, et al. In Vitro Interactions of Echinocandins with Triazoles against Multidrug-Resistant *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11).
40. Meis JF, Voss A. *Candida auris* in an Intensive Care Setting. *N Engl J Med*. 2019;380:890-1.
41. Cadnum JL, Shaikh AA, Piedrahit CT, et al. Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2017;38:1240-3.
42. de Groot T, Chowdhary A, Meis JF, Voss A. Killing of *Candida auris* by UV-C: Importance of exposure time and distance. *Mycoses*. 2019;62:408-12.
43. Taori SK, Khonyongwa K, Hayden I, et al. *Candida auris* outbreak: Mortality, interventions and cost of sustaining control. *J Infect*. 2019;79:601-11.
44. Bergeron G, Bloch D, Murray K, et al. *Candida auris* Colonization After Discharge to a Community Setting: New York City, 2017-2019. *Open Forum Infect Dis*. 2021;8:ofaa620.
45. Proctor DM, Dangana T, Sexton DJ, et al. Integrated genomic, epidemiologic investigation of *Candida auris* skin colonization in a skilled nursing facility. *Nature Medicine*. 2021;27:1401-9.
46. Schelenz S, Hagen F, Rhodes JL, et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2016;5:35.
47. Ong CW, Chen SC, Clark JE, et al. Diagnosis, management and prevention of *Candida auris* in hospitals: position statement of the Australasian Society for Infectious Diseases. *Intern Med J*. 2019;49:1229-43.

## De Dutch-Belgian Mycosis Study Group

### Alles valt of staat met samenwerking

Bart Rijnders, Frank van de Veerdonk, Paul Verweij, Joost Wauters

Voordat de intensievecareafdelingen in Nederland vol kwamen te liggen met patiënten met covid-19, waren invasieve gist- en schimmelinfecties geen zeldzaamheid in het Erasmus MC. Maar zelfs in een groot universitair medisch centrum gaat het nog steeds om enkele tientallen en niet honderden patiënten per jaar. Om binnen niet al te lange tijd een klinisch onderzoek naar een relatief zeldzame infectie zoals invasieve aspergillose (IA) tot een goed einde te brengen, laat staan een onderzoek naar azoleresistentie bij IA, is Nederland te klein. De opleiding tot internist en het promotieonderzoek van Bart Rijnders speelden zich af in het Universitair Ziekenhuis Leuven. Hij was daardoor goed geïnformeerd over de expertise in schimmelinfecties die daar aanwezig was, zowel bij de afdeling Microbiologie (prof. Katrien Lagrou), Hematologie (prof. Johan Maertens) alsook de intensievecareafdeling (prof. dr. Joost Wauters). Bovendien spreekt men in het noordelijk deel van België ongeveer dezelfde taal en speelt er een vergelijkbaar 'schaalprobleem' wat betreft onderzoek naar schimmel-infecties. Samenwerking over de grens heen zou dus logisch zijn. Toen dr. Alexander Schauwvlieghe in het kader van promotieonderzoek naar schimmelinfecties voor drie jaar vanuit Gent naar Rotterdam verhuisde werd ook de link met ziekenhuizen in Gent en Brugge gelegd. In verschillende onderzoeksprojecten werd samengewerkt met de collega's van het Radboudumc, het UZ Gent, Het UZ Leuven en het AZ in Brugge (en uiteindelijk nog zeven andere ziekenhuizen in Nederland). Zo werd het idee geboren om deze samenwerking tussen ziekenhuizen over de grens heen te faciliteren en hopelijk ook fondsenwerving kansrijker te maken. Samen met Frank van de Veerdonk, Paul Verweij, Roger Brüggeman, Joost Wauters, Katrien Lagrou en Johan Maertens hebben Alexander Schauwvlieghe en Bart Rijnders daarvoor in 2017 de Dutch-Belgian Mycosis Study Group (DB-MSG) in het leven geroepen.

Hieronder zetten we op een rij tot welke studies en resultaten deze samenwerking inmiddels heeft geleid. Ook bespreken we wat we in de volgende jaren hopen te bereiken. Ten slotte hopen we collega's te enthousiasmeren om zich bij de DB-MSG aan te sluiten.

#### Influenza- en covidgeassocieerde invasieve pulmonale aspergillose (IAPA, CAPA)

De relatief kleine en meestal binnen één centrum uitgevoerde onderzoeken naar *Aspergillus*-superinfecties bij patiënten met influenza (IAPA) en die in de afgelopen decennia werden gepubliceerd, hadden nog niet geleid tot brede bekendheid van dit ziektebeeld bij intensivisten in Europa en nog veel minder buiten Europa. In een groot retrospectief onderzoek werden daarom op een systematische manier klinische en microbiologische gegevens verzameld van 432 met influenza geïnfecteerde patiënten van zeven intensievecareafdelingen in Nederland en België, opgenomen in een periode van zeven seizoenen. Bij 19 procent van de patiënten waren er sterke aanwijzingen voor een *Aspergillus*-superinfectie en dit liep op tot 32 procent bij de immuungecompromitteerde patiënt [1]. De werkelijke incidentie ligt waarschijnlijk nog hoger want in de daaropvolgende prospectieve POSA-FLU-studie werd de mycologische diagnostiek geoptimaliseerd (systematisch bronchoscopie met BAL en galactomannanbepaling). Deze studie werd gecoördineerd

Erasmus MC, Rotterdam, dr. B.J.A. Rijnders, internist-infectioloog.  
Radboudumc, Nijmegen, dr. F. van de Veerdonk, internist-infectioloog, dr. P. Verweij, arts-microbioloog.  
Universitair Ziekenhuis Gasthuisberg, Leuven, dr. J. Wauters, internist-intensivist.  
Correspondentieadres: B. Rijnders (b.rijnders@erasmusmc.nl).

door Joost Wauters (UZ Leuven) en Roger Brüggeman (Radboudumc). Het betrof een fase II-studie waarin werd onderzocht of patiënten die op de IC waren opgenomen voor respiratoir falen door influenza, baat hadden bij posaconazoleprofylaxe. In deze studie was de incidentie van IAPA maar liefst 24 procent, grotendeels gediagnostiseerd in de eerste 48 uur na IC-opname. Na de 48 uur ontwikkelde 5,4 procent in de posaconazoleprofylaxegroep een aspergillose, terwijl 11,1 procent in de controlegroep dat deed [2]. Een grotere vervolgstudie zal moeten uitwijzen of profylaxe ook echt nuttig is.

Dat deze inzichten over IAPA belangrijk waren, heeft ook het eCDC erkend in een rapid risk assessment publicatie over influenzageassocieerde aspergillose. Mogelijk heeft dit onderzoek bijgedragen aan een groter bewustzijn van *Aspergillus*-superinfecties bij patiënten met een ernstige virale pneumonie. Tijdens de covid-19-pandemie werd ook bij kritisch zieke covid-19-patiënten snel duidelijk dat bij ongeveer 10 procent aanwijzingen waren voor een *Aspergillus*-superinfectie, die intussen gekend is als covid-geassocieerde pulmonale aspergillose (CAPA) [3].

### Azole-resistentie in Nederland en België

De toenemende azole-resistentie van *A. fumigatus* is op basis van surveillanceonderzoek in Nederland in verschillende publicaties uitgebreid beschreven door Paul Verweij, Jacques Meis en Willem Melchers. De klinische impact hiervan op de overleving van patiënten met een invasieve *Aspergillus*-infectie was echter minder duidelijk. Dit kennishiaat heeft het Radboudumc in samenwerking met het LUMC en het Erasmus MC opgevuld, door de mortaliteit te beschrijven van een grote groep patiënten die met een azole-gevoelige of azole-resistente *A. fumigatus* waren geïnfecteerd. Het bevestigde de verhoogde mortaliteit (49 procent) van patiënten bij wie een azole-resistente *Aspergillus* werd gekweekt en die dus niet langer met een azole behandeld konden worden [4].

### AzoRMan-studie

Dat in Nederland bij ongeveer 10 procent van de patiënten met IA een azole-resistente *A. fumigatus* de verwekker is en dat dit met een verhoogde mortaliteit is geassocieerd, lijkt dus duidelijk. Toch is dat waarschijnlijk een te eenvoudige voorstelling van de werkelijkheid. Bij de meerderheid van de patiënten met

een IA wordt de diagnose niet gesteld op basis van een kweek maar door een positieve galactomannaantest op serum of BAL. Bij ongeveer een derde tot de helft van hen wordt de kweek ook positief indien bronchoalveolaire lavage op kweek wordt gezet. Bij patiënten die behandeld worden voor een acute leukemie is slechts bij circa 25 procent sprake van een positieve kweek wanneer een IA vastgesteld wordt. Bij patiënten met influenza en een *Aspergillus*-superinfectie zijn de *Aspergillus*-kweken veel vaker positief. Of de incidentie van azole-resistentie bij de kweeknegatieve patiënten even hoog is, werd nog niet systematisch onderzocht. Ook is onduidelijk of bij deze patiëntengroep de detectie van azole-resistentie via bijvoorbeeld PCR geassocieerd is met een even hoge mortaliteit als bij de patiënten met een positieve kweek. Ten slotte hopen we natuurlijk dat vroege detectie van azole-resistentie met PCR de prognose van deze patiënten kan verbeteren doordat eerder een aangepaste therapie kan worden geïnitieerd. In de recent afgeronde Azole Resistance Management Study (AzoRMan) studie onderzochten daarom acht ziekenhuizen in Nederland en België bij patiënten met een hematologische ziekte het nut van de Aspergenius®-PCR op BAL. Deze PCR met probes voor *A. fumigatus*, *A. species* en *A. terreus* kan, wanneer *A. fumigatus* wordt gedetecteerd, vaak ook de in Nederland met azole-resistentie geassocieerde CYP51-mutaties (TR34/L98H en TR46/ Y121F/T289A) detecteren. De resultaten werden recent gepresenteerd op het TIMM-congres.

### Azole/echinocandine-combinatietherapie bij IA

In 2018 besloten de KCE in België en ZONMW in Nederland te gaan samenwerken, om grote klinische trials over de landgrenzen heen mogelijk te maken. Deze samenwerking kreeg BeNeFit als acroniem (Belgian Netherlands Funding of International trials). De focus ligt op studies waarin doelmatig gebruik van middelen wordt bestudeerd (bijvoorbeeld optimale behandelduur, dosering, kosteneffectiviteit van behandeling). De eerste oproep voor projectideeën was de DB-MSG dan ook op het lijf geschreven. Na verschillende rondes doorgekomen te zijn, kregen we begin 2020 groen licht om met de IA-DUET-studie van start te gaan. Deze studie is een multicentrisch pragmatisch, gerandomiseerd onderzoek naar de effectiviteit van combinatietherapie (azole met een echino-

candine) in vergelijking met azole-mono-therapie bij de behandeling van IA. In vitro- en dierexperimenteel onderzoek suggereert een synergistisch effect van beide antifungale klassen en een post-hocanalyse van de enige gerandomiseerde trial die eerder werd gedaan, suggereert een overlevingsvoordeel met combinatietherapie [5]. In de IA-DUET-studie wordt de inclusie van 650 patiënten beoogd. De studie is zo pragmatisch mogelijk opgezet. Zo is na ontslag geen studiebezoek vereist omdat mortaliteit als primair eindpunt werd gekozen. De eerste patiënt werd mei 2020 geïncubeerd en ondertussen hebben 12 Nederlandse en Belgische centra zich aangesloten [6]. Ook centra met slechts enkele patiënten per jaar zijn van harte welkom en zelfs essentieel om in de volgende drie jaar voldoende patiënten te kunnen includeren. De sponsor is het Erasmus MC, HOVON helpt als CRO en in België is het UZ Leuven coördinerend centrum. Er wordt ook samenwerking gezocht met centra in andere landen.

### Nieuwe diagnostische testen

Heel regelmatig komen er nieuwe diagnostische testen op de markt. Een CE label zegt echter niet veel over het nut van deze test in de praktijk. Verdere klinische validatie is daarom essentieel. Omdat schimmel- en gistinfecties relatief zeldzaam zijn, is verdere validatie vaak een proces van lange adem. Om dit beter te laten verlopen werd in 2018 de ARPOS-studie gestart in Rotterdam, Gent en Brugge. Het is een prospectieve biobankstudie, waarbij van patiënten met een hematologische ziekte die een bronchoscopie ondergaan voor een vermoedelijke schimmelinfectie extra serum en plasma worden afgenomen en bewaard, naast de nodige klinische gegevens en eventueel overgebleven BAL-vloeistof. Op die manier wordt langzaam maar zeker een grote biobank aangemaakt van een in detail omschreven patiëntenpopulatie, die gebruikt kan worden om nieuwe testen te valideren. Op dit moment wordt met behulp van de ARPOS-biobankmonsters de validatie van de Virclia galactomannaantest afgerond.

### Toekomstplannen

In 2022 hopen we nieuw onderzoek te starten naar de epidemiologie, preventie en behandeling van IAPA en CAPA. Nederlandse en Belgische centra zijn van harte welkom om zich aan te sluiten en actief betrokken te raken bij initiatieven van de DB-MSG of zelf met

onderzoeksvoorstellen te komen.

### Conclusie

Nadat de DB-MSG-initiatieven in 2017 snel op gang kwamen, heeft covid-19 de afgelopen twee jaar de voortgang van een deel ervan verhinderd. De aandacht voor schimmelinfecties is er door covid-19 echter niet minder op geworden. Dankzij covid-19 kwam zelfs een zeldzame schimmelinfectie als mucormycosis in het nieuws. We hebben goede hoop dat in 2022 de al lopende maar ook nieuwe DB-MSG-studies op stoom zullen komen. We nodigen artsen en onderzoekers met interesse in schimmelinfecties in Nederland en België uit zich aan te sluiten bij de DB-MSG. Dat kan zijn om onderzoeksideeën te opperen maar natuurlijk ook om indien mogelijk als centrum bij te dragen aan een al lopende studie. Op de website van de DB-MSG is ook een groot aantal publicaties te vinden over schimmels en schimmelinfecties. Voor meer informatie, kijk eens op [www.dbmsg.nl](http://www.dbmsg.nl).

### Referenties

1. Schauwvlieghe AFAD, Rijnders BJA, Philips N, et al. Invasive aspergillosis in patients admitted to the intensive care unit with severe influenza: a retrospective cohort study. *Lancet Respir Med.* 2018;6:782-92.
2. Vanderbeke L, Janssen NAF, Bergmans DCJJ, et al. Posaconazole for prevention of invasive pulmonary aspergillosis in critically ill influenza patients (POSA-FLU): a randomised, open-label, proof-of-concept trial. *Intensive Care Med.* 2021;47:674686.
3. Janssen NAF, Nyga R, Vanderbeke L, et al. Multinational Observational Cohort Study of COVID-19-Associated Pulmonary Aspergillosis. *Emerg Infect Dis.* 2021;27:2892-8.
4. Lestrade PP, Bentvelsen RG, Schauwvlieghe AFAD, et al. Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Clin Infect Dis.* 2019;68:1463-71.
5. Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2015;162:81-9.
6. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04876716>.

# Whole genome sequencing voor screening op resistentie *Mycobacterium tuberculosis* complex

Rina de Zwaan, Miranda Kamst, Han de Neeling, Tridia van der Laan, Arnout Mulder, Richard Anthony, Dick van Soolingen

## Samenvatting

Whole genome sequencing (WGS) van *Mycobacterium tuberculosis* complexisolaten wordt bij het Nationaal Referentielaboratorium Tuberculose van het RIVM gebruikt voor (sub)speciesidentificatie, voor screening op mogelijke resistentie tegen de eerstelijnsantibiotica en voor de epidemiologische typering. De laatste toepassing werd ingevoerd in 2019, de andere twee in 2020. Dit artikel betreft de evaluatie van het screenen op mogelijke resistentie met WGS in het eerste jaar.

Van de 441 isolaten van tuberculosepatiënten hadden er 373 (85 procent) geen resistentiemutaties, waardoor er geen aanvullende fenotypische gevoeligheidsbepalingen hoefden te worden uitgevoerd. De definitieve uitslag was in deze gevallen geheel gebaseerd op de WGS-data. De overige 68 (15 procent) isolaten vertoonden ten minste één mutatie die mogelijk geassocieerd was met resistentie. Dit betrof 93 mutaties, waarvan 44 met een hoge voorspellende waarde voor resistentie en hierbij kwam de WGS-analyse overeen met de fenotypische gevoeligheidsbepaling. In totaal kon bij 92 procent van de cases een betrouwbare uitslag van de gevoeligheid worden afgegeven uitsluitend op basis van de WGS-data. Voor de overige isolaten waren aanvullende fenotypisch gevoeligheidsbepalingen noodzakelijk, vanwege nog ontbrekende kennis over de betekenis van de gevonden mutaties.

Door de toenemende kennis over de correlatie tussen genotypische en fenotypische data is de WGS een betrouwbare methode geworden om te screenen op resistentie bij *M. tuberculosis* complexisolaten.

## Abstract

Whole genome sequencing (WGS) of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates is used at the RIVM tuberculosis reference laboratory for (sub)species identification, screening on possible resistance against first line antibiotics and epidemiological typing. The

latter application was implemented in 2019, the other two in 2020. This article is an evaluation of the first year of screening for possible resistance with WGS.

In 373 (85 per cent) isolates from 441 tuberculosis patients no resistance mutation was found, therefore no additional phenotypical testing was performed. In these cases the final report was solely based on WGS data. For the remaining 68 (15 per cent) isolates at least one mutation possibly associated with resistance was found. This concerned 93 mutations, of which 44 with a high predictive value for resistance and in these cases the WGS prediction was in concordance with the results of phenotypical testing. For in total 92 per cent of the cases a reliable susceptibility profile could be generated solely based on WGS data. For the remaining isolates additional phenotypical testing was needed because of incomplete knowledge on the significance of detected mutations.

Because of an expanding knowledge on the correlation between genotypic and phenotypic data, WGS has become a reliable tool in the screening on resistance in *M. tuberculosis* complex isolates.

## Introductie

Sinds in 1998 de eerste publicatie over whole genome sequencing (WGS) van de *Mycobacterium tuberculosis*-referentiestam H37Rv verscheen, is de WGS-techniek snel verder ontwikkeld [1].

Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Centrum Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Laboratorium Surveillance, Nationaal Referentielaboratorium Tuberculose, R.C.C. de Zwaan, laboratoriumanalist, M.M. Kamst, hoofdanalist, dr. A.J. de Neeling, bioinformaticus, T.G. van der Laan, analist, A.A. Mulder, analist, dr. R.M. Anthony, senior onderzoeker, prof. (em.) dr. D. van Soolingen, Hoofd Nationaal Referentielaboratorium Tuberculose. Correspondentieadres: Rina de Zwaan (rina.de.zwaan@rivm.nl).

In 2018 publiceerde het internationale CRyPTIC-consortium een uitgebreide studie, met deelname vanuit 16 verschillende landen verdeeld over zes continenten, met meer dan tienduizend vergelijkingen tussen de genotypische en fenotypische gevoeligheidsbepalingen van de eerstelijnsantibiotica: isoniazide (INH), rifampicine (RIF), ethambutol (EMB) en pyrazinamide (PZA). In deze studie werd een dermate hoge negatieve voorspellende waarde gevonden voor resistentie tegen deze antibiotica dat werd geconcludeerd dat met WGS voldoende zekerheid te verkrijgen is om deze ook voor klinisch gebruik in te zetten [2].

Vanaf 2008 wordt bij het Nationaal Referentielaboratorium Tuberculose van het RIVM gewerkt aan WGS van *M. tuberculosis* [3]. Vanaf 2016 zijn alle eerste *M. tuberculosis* complexisolaten van tbc-patiënten aan WGS onderworpen en is de moleculaire analyse vergeleken met de gebruikte routine-methoden: identificatie op basis van GenoType MTBC (Hain Lifescience, GmbH, Nehren, Duitsland), de gevoeligheidsbepaling met behulp van de BACTEC MGIT 960 (Becton Dickinson, New Jersey, Verenigde Staten) en epidemiologische clustering op basis van de Variable Number of Tandem Repeat (VNTR)-typering. Het eerste doel betrof het inzetten van WGS voor de optimalisatie van de epidemiologische typering om het percentage 'valse' clustering bij het epidemiologische onderzoek te verminderen. Naar aanleiding van het clusteronderzoek van de GGD'en bleek de clustering op basis van de WGS voor het aanduiden van tbc-transmissie veel betrouwbaarder dan die op grond van de VNTR-typering [4]. In 2019 werd daarom de overstap gemaakt van VNTR-typering naar WGS.

Na aanvullende WGS-studies in Nederland voor zowel identificatie als gevoeligheidsbepalingen, waarbij onder andere voor de screening op resistentiemutaties de negatieve voorspellende waarden voor de eerstelijnsantibiotica in Nederland hoger bleken te liggen dan bij de internationale CRyPTIC-studie, was er in 2020 voor beide bepalingen voldoende vertrouwen verkregen om de overstap te maken naar WGS [5,6].

In deze studie worden de resultaten van een jaar lang screenen van *M. tuberculosis* complexisolaten op resistentie tegen de eerstelijnsantibiotica met WGS beschreven.

## Materiaal en methoden

### Isolaten

Van alle kweek-positieve tuberculosepatiënten in Nederland wordt een *M. tuberculosis* complexkweek naar het RIVM gestuurd voor de epidemiologische typering. Tevens wordt hierbij een (sub)species-identificatie uitgevoerd en wordt er gescreend op mogelijke resistentie tegen de eerstelijnsantibiotica. Het RIVM analyseerde de genomische data van 441 eerste positieve kweken van tuberculosepatiënten die in 2020 in Nederland waren geïsoleerd.

### DNA-isolatie

De ontvangen kweken werden overgeënt in een MGIT-mediumbuis, waarna van de gegroeide kweek het DNA werd geïsoleerd met behulp van de QIAamp DNA mini kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Duitsland).

### WGS-sequencing

Illumina sequencing werd uitgevoerd door de firma Baseclear (Leiden). De sequenties werden geanalyseerd in de door het RIVM ontwikkelde bio-informatica pipeline [7]. De pipeline maakt gebruik van Bowtie2 voor de mapping van de paired-end reads tegen het H37Rv-referentiegenoom (GeneBanknr. AL123456.3) en Breseq versie 0.28.1 voor detectie van single nucleotide positions (SNP's). Toekenning van SNP's wordt gedaan op basis van een allelfrequentie van 80 procent of hoger. De WGS-gegevens werden alleen gebruikt bij een minimale gemiddelde coverage depth van 50. Voor screening op contaminatie met non-MTBC-DNA werden de algemene bacteriële identificatiegenen onderzocht (*rrs* & *rrl* minder dan drie SNP). Gemengde infecties en minderheidspopulaties werden gedetecteerd door middel van analyse van de 62 Coll-identificatie-SNP's [8] en 15 INH- en RIF-resistentie-SNP's.

### Speciesidentificatie

Speciesidentificatie werd bepaald met behulp van de Coll-methode [8], in combinatie met de SNP-IT tool [5].

### Screening op mutaties in resistentiegenen

De WGS-gegevens werden, met behulp van de pipeline, gescreend met een lijst van genoomposities op mutaties die mogelijk met resistentie geassocieerd waren. Voor het detecteren van 'nieuwe' SNP's, substituties (SUB) en inserties/deleties (INDEL's) werd

een lijst met hotspotgebieden in de bekendste resistentiegenen gebruikt.

De screeningslijsten werden samengesteld met als basis de ReSeqTB-databank van 2019 [9], aangevuld met informatie uit onder andere het WHO-rapport van 2019 [10], de CRyPTIC 10K-studie [2], de eigen RIVM-databank (ongepubliceerde data), en verder gepubliceerde data [6]. Deze screeningslijsten bestaan onder andere uit de negen genen zoals beschreven in de internationale CRyPTIC-studie en de aanvullende studie van het RIVM [2,6]: *rpoB*, *katG*, *inhA*, *fabG1*, *ahpC*, *embB*, *embA*, *pncA* en *rpsA*. Daarnaast werd de screeningslijst verder uitgebreid met extra genen, op basis van onder andere de ReSeqTB-databank [9], om de kennis over fenotypische resistentie te verbreden en om minder vaak gevonden mutaties niet te missen; *furA*, *inbR*, *kasA*, *mmaA3*, *mshA*, *mshB*, *mshC*, *mymA*, *nat*, *ndh*, *nudC*, *sigl*, *ponA1*, *rpoA*, *rpoC*, *aftA*, *embC*, *embR*, *ubiA*, *clpC1*, *gpsl*, *mas*, *panD*, *ppsA*, *ppsC*, *ppsD*, *proZ*, *Rv0191*, *Rv1667c*, *Rv2731* en *Rv3008*. De voorspellende waarde van resistentiemutaties werd gebaseerd op het aantal, het percentage positieve associaties van de gevonden waarnemingen en op het vóórkomen van de mutaties in diverse bronnen [2,9,10]. Zo moet een mutatie voor een hoge voorspellende waarde in verschillende bronnen zijn vermeld en dient in meer dan 75 procent van de gevallen de resistentie te zijn bepaald. De meeste mutaties in de lijst hebben echter een lage betrouwbaarheid omdat deze maar weinig zijn gevonden. De screeningslijst werd en wordt steeds aangepast door toevoegingen van nieuwe informatie (literatuur) en door verwijderingen van mutaties

wanneer een vermoedelijke resistentiemutatie minimaal vijf keer werd gevonden, maar alle fenotypische gevoeligheidsbepalingen als gevoelig werden beoordeeld.

Wanneer voor één antibioticum verschillende mutaties werden aangetoond die mogelijk geassocieerd waren met resistentie tegen een bepaald antibioticum, werden deze als één mutatie geteld; bijvoorbeeld een INH-mutatie *katG\_S315T* samen met INH-mutatie *fabG1\_c-15t* werd geteld als één mutatie, waarbij de hoogste betrouwbaarheid van de twee mutaties werd aangehouden. Mutaties coderend voor verschillende antibiotica werden als verschillende mutaties beschouwd.

#### Fenotypische gevoeligheidsbepaling

De fenotypische gevoeligheidsbepalingen werden uitgevoerd met de BACTEC MGIT 960. Wanneer voor een antibioticum een resistentiemutatie werd gevonden zonder hoge voorspellende waarde, werd voor dat betreffende antibioticum een fenotypische gevoeligheidsbepaling ingezet. Wanneer er sprake was van een hoge voorspellende waarde of als er mutaties werden gevonden tegen verschillende antibiotica, werden voor alle vier de eerstelijns-antibiotica fenotypische bepalingen ingezet. Dit omdat bij de aanwezigheid van resistentie tegen één antibioticum de kans op andere resistenties toeneemt. Voor *M. bovis* BCG-isolaten die behoorden tot clusters die geassocieerd zijn met intermediaire INH-resistentie werd ook de fenotypische gevoeligheidsbepaling voor INH ingezet, ondanks de afwezigheid van bekende resistentiemutaties. Daarnaast werd voor isolaten van

Tabel 1. Overzicht van de resultaten van fenotypische gevoeligheidsbepalingen per isolaat.

	Aantal	Gevoelig		Verhoogde MIC	
		Aantal	Percentage	Aantal	Percentage
Isolaten met mono fenotypische gevoeligheidsbepaling	28	23	82%	5	18%
Isolaten met complete eerstelijns fenotypische gevoeligheidsbepaling	40	4	10%	36	90%
Totaal isolaten met een fenotypische gevoeligheidsbepaling	68	27	40%	41	60%

Tabel 2. Overzicht van de gevonden mutaties en hun betrouwbaarheid per antibioticumbepaling.

Betrouwbaarheid op basis van WGS	INH			RIF			EMB			PZA			Alle		
	N	I/R	%	N	R	%	N	R	%	N	R	%	N	R	
Hoogbetrouwbare mutaties	33	33	100%	9	9	100%	0	0	0%	1*	1	100%	43	43	100%
Mediumbetrouwbare / nieuwe mutaties	9	2	22%	4	2	50%	7	3	43%	3	3	100%	23	10	43%
Laagbetrouwbare mutaties	9	0	0%	3	0	0%	0	0	0%	15	4	27%	27	4	15%
Totaal gedetecteerde mutaties	51	35	69%	16	11	69%	7	3	43%	19	8	42%	93	57	61%
Geen relevante mutaties	390	ND	ND	425	ND	ND	434	ND	ND	422	ND	ND			

N = aantal; I/R = aantal intermediair/resistant; \*geëxcludeerd; *pncA\_H57D* (*M. bovis* (BCG)) en *pncA\_A46A* & *panD\_A13A* & *M117T* (*M. canettii*).

*M. bovis* en *M. canettii*-species, die intrinsiek resistent zijn tegen PZA, geen fenotypische gevoeligheidsbepaling ingezet, tenzij er andere mogelijke resistentiemutaties werden gevonden.

#### Resultaten

Het RIVM ontving 441 eerste *M. tuberculosis* complexisolaten die geschikt waren voor WGS-analyse. Deze werden gedetermineerd als 415 *M. tuberculosis*, vier *M. africanum*, één *M. canettii*, zes *M. bovis* en 15 *M. bovis* BCG. Onder de *M. bovis* BCG-isolaten was er één geassocieerd met mogelijke intermediaire resistentie tegen INH op basis van de clustering en hiervan werd een fenotypische INH-bepaling uitgevoerd.

Van de 441 isolaten waren er 373 (85 procent) zonder mutaties die mogelijk geassocieerd waren met resistentie tegen de eerstelijns antibiotica. Voor deze isolaten werd geen gevoeligheidsbepaling uitgevoerd. Bij de overige 68 isolaten, met in totaal 93 mutaties, werd ten minste één fenotypische bepaling ingezet. Dit is weergegeven in tabel 1 (pagina 72). Bij 60 procent van de geteste isolaten werd een verhoogde minimaal remmende concentratie (MIC, minimal inhibitory concentration) gevonden.

Van de 68 isolaten werden in totaal 188 fenotypische

gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd (tabel 2); 93 bepalingen vanwege de aanwezigheid van een mogelijke resistentiemutatie en 95 vanwege de aanwezigheid van een mutatie met hoge voorspellende waarde voor resistentie tegen een ander antibioticum.

Van de 93 mogelijke resistentiemutaties waren er 43 met een hoge betrouwbaarheid, waarvan de fenotypische gevoeligheidsbepaling voor 100 procent overeenkwam met WGS. Bij de overige 50 fenotypische gevoeligheidsbepalingen met nieuwe mutaties en mutaties met een lagere betrouwbaarheid (laag en medium) werd bij nog eens 14 gevoeligheidsbepalingen een verhoogde MIC gevonden. In tabel 2 wordt dit per antibioticum weergegeven.

De andere 95 fenotypische gevoeligheidsbepalingen werden extra uitgevoerd vanwege de aanwezigheid van een mutatie met hoge voorspellende waarde voor resistentie tegen een ander antibioticum. Hierbij werd één uitzondering gevonden bij een PZA-bepaling van een isolaat behorend tot lineage 1. Bij nader onderzoek naar de genen die mogelijk geassocieerd zijn met PZA resistentie werden er twee *clpC1*-mutaties (V63A en E810G) aangetoond; maar deze SNP's worden niet geassocieerd met resistentie volgens de ReSeqTB-databank en de WHO-catalogus [9-11].

## Discussie

WGS is een zeer effectieve methode gebleken om te screenen op mogelijke resistentie tegen de vier eerstelijnsantibiotica die gebruikt worden in de behandeling van tuberculose. In deze studie konden 373 van de 441 (85 procent) *M. tuberculosis* complexisolaten direct als gevoelig gekenmerkt worden op basis van WGS. Bij de overige 68 isolaten werden mutaties gevonden die mogelijk geassocieerd waren met resistentie en werd aanvullend fenotypisch resistentieonderzoek uitgevoerd. Hierbij waren 43 mutaties met een hoge voorspellende waarde, waarbij geen twijfel over de uitslag was, hetgeen werd bevestigd.

De enige fenotypische gevoeligheidsbepaling die niet overeen kwam met de verwachte voorspelling op grond van WGS betrof een isolaat met PZA-resistentie, behorend tot lineage 1 (Indo\_Oceanic). Deze vertoonde 'niet' met resistentie geassocieerde mutaties (*clpC1\_V63A* & *E810G*), maar een mutatie die geassocieerd is met lineage 1 (*clpC1\_V63A*). In een studie van Modlin *et al.* werd echter aangetoond dat Indo\_Oceanic-isolaten oververtegenwoordigd zijn bij mono-PZA-resistente isolaten ten opzicht van de multidrugresistente isolaten met PZA-resistentie. Een voorgestelde theorie is dat er sprake is van een lineage-specifieke, lage fenotypische PZA-resistentie, vergelijkbaar met de PZA-resistentie van *M. bovis* en *M. canettii* [12]. In het nieuwe WHO-rapport (2021) over de voorspellende waarde van resistentiemutaties worden deze *clpC1*-mutaties echter niet geassocieerd met resistentie [11]. In de studie van Modlin *et al.* werden bij de herhaling van de 19 'mono-PZA-resistente' isolaten drie als PZA-gevoelig bepaald; dit waren lineage 1-isolaten met de *clpC1\_V63A*-mutatie. De fenotypische bepaling lijkt bij deze stammen geen eenduidig beeld te geven en er is meer onderzoek nodig om dit op te helderen.

Door allerlei factoren kennen fenotypische bepalingen diverse beperkingen, waardoor kleine variaties kunnen ontstaan [13,14]. Deze variaties kunnen weer voor verschillende resultaten en interpretaties zorgen, zeker bij verminderde gevoeligheid of een laag resistentieniveau waarbij de MIC dicht bij het breekpunt ligt. Ook breekpunten die niet voldoende nauwkeurig zijn bepaald zorgen voor variaties in de interpretaties van fenotypische bepalingen en daardoor voor inconsequente resultaten [13,14]. Bij rifampicine is er

veel discussie over dit onderwerp, waarbij wisselende fenotypische resultaten werden vergeleken met de genotypische resultaten en behandeluitkomsten [15]. Uiteindelijk heeft de WHO het breekpunt voor rifampicine in 2021 verlaagd van 1 mg/l naar 0,5 mg/l [16]. Maar ook bij een hoog resistentieniveau tegen rifampicine, zoals bij de meest gangbare *rpoB\_S450L*-mutatie, is in het WHO-rapport van 2021 maar 99 procent van de stammen fenotypisch als resistent bepaald [11]. Het gebrek aan reproduceerbaarheid van fenotypische bepalingen, maar ook de gekozen kritische breekpunten (CC) en de epidemiologische cut-offwaarden (ECOFF) blijven een punt van discussie en maken dat de fenotypische bepaling niet altijd de meest betrouwbare resultaten levert [13-15]. De fenotypische bepaling is echter wel van belang voor de uitbreiding van de kennis over de voorspellende waarde van (nieuwe) mutaties, zeker in het geval van tweedelijns- en nieuwe antibiotica. Wereldwijde internationale samenwerking, zoals voor de WHO-catalogus van 2021 met informatie over de voorspellende waarde van grote aantallen getoetste mutaties, is in dit opzicht zeer belangrijk. Dit soort catalogi dient echter dynamisch te zijn en regelmatig bijgewerkt te worden. Idealiter dienen deze databanken te worden uitgebreid met onder andere het niveau van gevoeligheid (MIC) en de behandeluitkomsten. Moleculaire bepalingen zullen in de toekomst steeds meer mogelijkheden bieden, zoals het direct sequencen van *M. tuberculosis* in klinisch materiaal, al is wat dit betreft nog een lange weg te gaan. Het blijft van belang om steeds de meest recente kennis van mogelijke resistentiemutaties toe te passen en hiervoor blijft een grote mate van specifieke deskundigheid vereist.

## Referenties

1. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-44.
2. Consortium CR, Allix-Béguec C, Arandjelovic I, et al. Prediction of Susceptibility to First-Line Tuberculosis Drugs by DNA Sequencing. *N Engl J Med*. 2018;379:1403-15.
3. Schurch AC, Kremer K, Daviana O, et al. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol*. 2010;48:3403-6.
4. Jajou R, de Neeling A, van Hunen R, et al. Epidemiological links between tuberculosis cases identified twice as efficiently by whole genome sequencing than conventional molecular typing: A population-based study. *PLoS One*, 2018;13:e0195413.
5. Lipworth S, Jajou R, de Neeling A, et al. SNP-IT Tool for Identifying

Subspecies and Associated Lineages of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:482-8.

6. Jajou R, van der Laan T, de Zwaan R, et al. WGS more accurately predicts susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs than phenotypic testing. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74:2605-16.

7. Jajou R, Kohl TA, Walker T, et al. Towards standardisation: comparison of five whole genome sequencing (WGS) analysis pipelines for detection of epidemiologically linked tuberculosis cases. *Euro Surveill*. 2019;24(50).

8. Coll F, McNerney R, Guerra-Assunção JA, et al. A robust SNP barcode for typing *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *Nat Commun*. 2014;5:4812.

9. Starks AM, Avilés E, Cirillo DM, et al. Collaborative Effort for a Centralized Worldwide Tuberculosis Relational Sequencing Data Platform. *Clin Infect Dis*. 2015;61Suppl 3:S141-6.

10. WHO, The use of next-generation sequencing technologies for the detection of mutations associated with drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex: technical guide. , W.H. Organization, Editor. 2018: Geneva.

11. WHO, Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance: supplementary document.

supplementary document. 2021, World Health Organization: Geneva.

12. Modlin SJ, Marbach T, Werngren J, Mansjö M, Hoffner SE, Valafar F. Atypical Genetic Basis of Pyrazinamide Resistance in Mono-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2021;65(6).

13. Zignol M, Cabibbe AM, Dean AS, et al. Genetic sequencing for surveillance of drug resistance in tuberculosis in highly endemic countries: a multi-country population-based surveillance study. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:675-83.

14. Heyckendorf J, Andres S, Köser CU, et al. What Is Resistance? Impact of Phenotypic versus Molecular Drug Resistance Testing on Therapy for Multi- and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(2).

15. Van Deun A, Aung KJM, Bola V, et al. Rifampin drug resistance tests for tuberculosis: challenging the gold standard. *J Clin Microbiol*. 2013;51:2633-40.

16. WHO, Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). 2021, World Health Organization: Geneva.

# Mondiale blik op tuberculose en recente ontwikkelingen in de tuberculosediagnostiek

Kristin Kremer, Kitty van Weezenbeek

## Samenvatting

Tuberculose (tbc) eiste in 2020 ruim 1,5 miljoen mensenlevens. De covid-19-pandemie leidde wereldwijd tot een significante afname van de opsporing en behandeling van tbc-patiënten. Hierdoor is de vooruitgang in de tbc-bestrijding in de laatste jaren tenietgedaan, ondanks belangrijke ontwikkelingen op het gebied van tbc-diagnostiek en behandeling. Dit artikel vat de meest recente adviezen van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) en innovaties op het gebied van tbc-diagnostiek samen.

WHO adviseert sinds 2010 een snelle gevoelige moleculaire test, de Xpert MTB/RIF-test, voor de initiële diagnose van tbc. De wereldwijde introductie van deze test die simultaan tbc en rifampicine-resistentiegeassocieerde mutaties aantoon, heeft geleid tot een belangrijke toename van de opsporing van (multiresistente) tbc. KNCV Tuberculosefonds heeft een methode ontwikkeld om met technologie tbc in ontlasting van kinderen en mensen met hivinfectie te detecteren. KNCV is ook een demonstratieproject gestart om toepassing van draagbare sequencing-apparaten voor de diagnostiek van tbc en andere infectieziekten te evalueren in lage- en middeninkomenslanden. Met next-generation sequencing kan speciesdeterminatie, detectie van resistentiegerelateerde mutaties en epidemiologische typering worden gecombineerd, ter bevordering van individuele patiëntenzorg en directe verzameling van informatie over de verspreiding van infectieziekten en medicijnresistentie voor mondiale beleidsontwikkeling.

## Summary

Tuberculosis (TB) claimed more than 1.5 million lives in 2020. The covid-19 pandemic led to a significant decrease in the detection and treatment of TB patients worldwide. This has offset progress in TB control in recent years, despite important developments in TB diagnosis and treatment. This article summarizes the

latest advice from the World Health Organization (WHO) and innovations in the field of TB diagnostics. Since 2010, WHO recommends a rapid sensitive molecular test, the Xpert MTB/RIF-test, for the initial diagnosis of TB. The worldwide introduction of this test, which simultaneously detects TB and rifampicin resistance-associated mutations, has led to a significant increase in the detection of (multidrug resistant) TB. KNCV Tuberculosis Foundation has developed a method to use this technology to detect TB in feces of children and people with HIV infection. KNCV has also started a demonstration project to evaluate the application of portable sequencing devices for the diagnosis of TB and other infectious diseases in low- and middle-income countries. Next-generation sequencing can combine species determination, resistance-related mutation detection and epidemiological typing to promote individual patient care and real-time collection of information on the spread of infectious diseases and drug resistance for global policy development.

## De wereldwijde tuberculosesituatie en de invloed van covid-19

Tuberculose (tbc) heeft de twijfelachtige eer om de dertiende plaats in te nemen op de mondiale ranglijst van doodsoorzaken. De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) schat dat in 2020 in totaal 10 miljoen mensen tbc ontwikkelden en 1,3 miljoen hivnegatieve

KNCV Tuberculosefonds, Den Haag, Nederland, dr. K. Kremer, medisch microbioloog, teamleider diagnostiek; dr. C. van Weezenbeek, public health expert, voormalig directeur KNCV Tuberculosefonds, thans directeur surveillance, prevention and control of antimicrobial resistance, World Health Organization (WHO), Geneva. Correspondentieadres: dr. K. Kremer (kristin.kremer@kncvtbc.org).

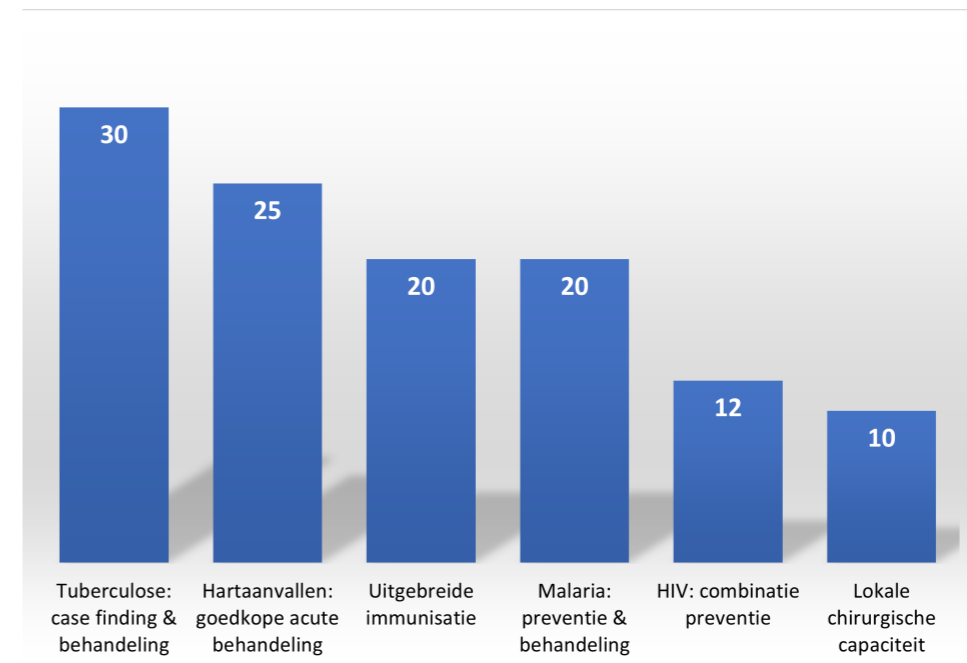
en 214.000 hivpositieve patiënten overleden aan de gevolgen van tbc [1]. Hiermee is de sterfte na jaren van daling weer terug op het niveau van 2017. Dit is het gevolg van de covid-19-pandemie, die leidde tot een wereldwijde ontwrichting van de gezondheidszorg en diensgevolge afname van de opsporing van nieuwe tbc-patiënten, van 7,1 miljoen in 2019 naar 5,8 miljoen patiënten in 2020. Daarmee is de ziektelast na jaren van forse investeringen in opsporing en behandeling van tuberculose weer terug op het niveau van 2012 en niet op koers om de mondiale tbc-doelen te halen. De voorlopige cijfers voor 2021 tonen dat de situatie in het tweede covid-19-jaar eerder slechter dan beter geworden is. De daling van de tbc-incidentie is feitelijk tot stilstand gekomen [1].

Ook de opsporing en (preventieve) behandeling van tbc-infecties en medicijnresistente tbc wordt door covid-19 ondermijnd. Het aantal behandelingen van resistente tbc nam - na een jarenlange toename - met 15 procent af [1]. In 2020 werd slechts één op de drie patiënten met medicijnresistente tbc behandeld, met alle gevolgen voor de onbehandelde patiënten zelf en de verspreiding van deze ernstige vorm van tbc. Daarbij moet wel worden aangetekend dat het (nog)

onduidelijk is in hoeverre covid-19-gerelateerde infectiepreventie (maskers, ventilatie, afstand) de transmissie van tbc beïnvloedt.

De covid-19-pandemie leert dat vele factoren een rol spelen, waarbij het gedrag van patiënten, de capaciteit van de gezondheidszorg, en het falen van logistieke systemen grote invloed hebben [1]. Patiënten waren terughoudend om zorg te zoeken in een overvolle en overbelaste gezondheidszorg en er waren grote problemen bij de aankoop en distributie van laboratoriumbenodigdheden, medicijnen en geschikte maskers. Ook de teruglopende fondsen voor de mondiale tuberculosebestrijding hebben een rol gespeeld. Zo was in 2020 een half miljard dollar minder beschikbaar dan in 2019, en ligt de mondiale besteding 59 procent lager dan wat noodzakelijk wordt geacht [1]. Daarbij is het verontrustend dat veel lage-inkomenslanden in grote mate afhankelijk zijn van externe financiering voor essentiële aspecten van de bestrijding. op zich is dat verwonderlijk omdat studies hebben uitgewezen dat tbc-bestrijding een zeer verstandige investering is die gemiddeld dertig keer de inleg opbrengt [2] (figuur 1).

**Figuur 1.** Rendement op investering voor elke Amerikaanse dollar uitgegeven aan de meest kosteneffectieve gezondheidsinterventies (bron: Verenigde Naties, 2013 [2]).



## Diagnostiek van (medicijnresistente) tbc

In 2020 werd bij 4,8 miljoen patiënten longtuberculose opgespoord, waarvan 59 procent bacteriologisch bevestigd was [1]. Dit percentage is sinds 2005 stabiel gebleven en valt in rijke landen veel hoger uit (mediaan 81 procent) dan in lage-inkomenslanden, waar vaak de capaciteit ontbreekt om een klinische diagnose te bevestigen. Hoewel de WHO een WHO-goedgekeurde snelle en gevoelige moleculaire test adviseert voor de initiële diagnose van tbc, en deze testen voor sterk gereduceerde prijzen beschikbaar worden gesteld, werden deze in 2020 slechts bij een derde van de tbc-patiënten toegepast. In veel situaties wordt nog gebruikgemaakt van een microscopische diagnose, een zeer arbeidsintensieve en ongevoelige methode die geen informatie geeft over resistentie. Met de capaciteit om *M. tuberculosis* te kweken en conventionele resistentiebepalingen uit te voeren is het wereldwijd nog slechter gesteld. Ondanks de steun van vele donoren en technische partners is het enorm moeilijk gebleken om netwerken op te zetten van laboratoria met voldoende bioveiligheid, effectieve kwaliteitssystemen, bevoorrading, bemensing en toereikende logistieke oplossingen voor patiënten uit de periferie. Dit vormt een groot probleem omdat de eerdergenoemde snelle moleculaire testen niet gebruikt kunnen worden om de behandeling te monitoren en zo nodig bij te stellen. Hiervoor zijn microscopie, kweek en gevoeligheidsbepalingen nodig. Met name bij de behandeling van multiresistente en extensief resistente (MDR/XDR) tbc is dit van groot belang.

De introductie van moleculaire testen die ook resistentie tegen rifampicine en quinolonen registreren heeft een enorme bijdrage geleverd aan de diagnose en overleving van patiënten met MDR en XDR-tbc. De dekking van de bepaling van rifampicine-resistentie is door de introductie van de moleculaire testen in alle delen van de wereld flink gestegen, waarbij Europa vooroploopt (93 procent). Van de 30 landen met de meeste rifampicine-resistente tbc-patiënten, bereikten 18 landen een dekking van boven de 80 procent [1] (figuur 2). De combinatie van snelle resistentiebepalingen en de nieuwe door de WHO geadviseerde kortere orale behandelingen van MDR- en (pre-)XDR-tbc [3], zoals de zes maanden durende behandeling van pre-XDR-tbc met een innovatieve combinatie van drie medicijnen onder

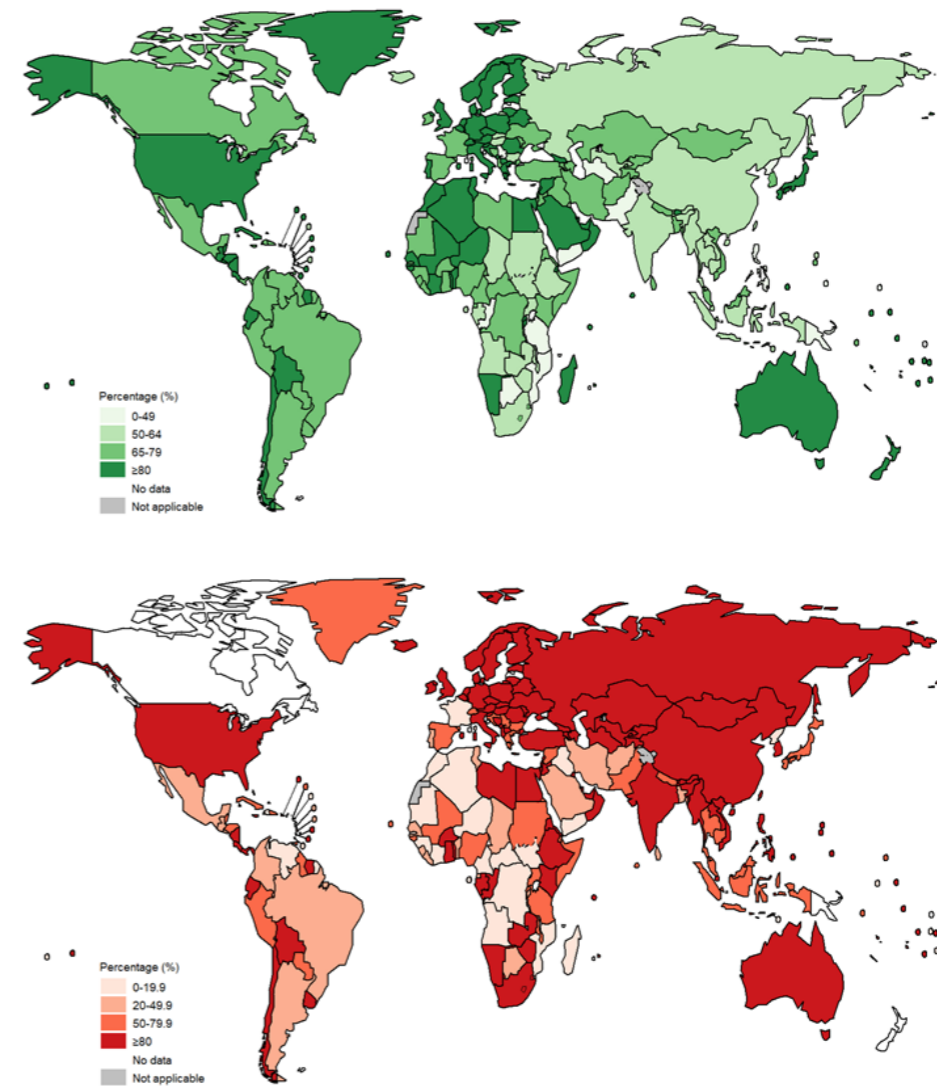
'operational research', vormen een doorbraak in de bestrijding van medicijnresistente tbc wereldwijd. Bij beide ontwikkelingen heeft het Nederlandse KNCV Tuberculosefonds internationaal een belangrijke rol gespeeld, zowel bij WHO-richtlijnontwikkeling als bij de programmatische introductie in lage- en midden-inkomenslanden in Azië, Oost-Europa en Afrika. Hieronder geven we een overzicht van de recent geactualiseerde WHO-richtlijnen voor tbc-diagnostiek, de nieuwe definitie van (pre-)XDR-tbc, de belangrijkste innovaties in de tbc-diagnostiek en enkele praktijkvoorbeelden van capaciteitsopbouw.

## WHO-richtlijnen voor nieuwe tbc-diagnostiek

Voordat nieuwe diagnostische testen voor tbc door de WHO aanbevolen worden, moeten deze eerst geëvalueerd worden in demonstratieprojecten in uiteenlopende geografische en socio-economische omstandigheden. Daarna volgt een WHO-beoordeling met behulp van het GRADE-proces (grading of recommendations assessment, development and evaluation). Dit proces omvat een systematische literatuurreview en een wetenschappelijke analyse van de demonstratiestudies door een WHO-expertcommissie. Het doel is een koppeling van de technische validatie (gevoeligheid, specificiteit, voorstellende waarde onder verschillende epidemiologische omstandigheden) aan de toepasbaarheid onder routineomstandigheden in lage- en midden-inkomenslanden (complexiteit, onderhoud, kosten, personele behoeften, et cetera). De WHO geeft zowel negatief als positief advies. Voor testen die zij aanbeveelt, volgt een gefaseerde introductie, waarbij informatie verzameld en gepubliceerd wordt over hoe deze het best opgeschaald kunnen worden.

In 2011 publiceerde de WHO de eerste testspecifieke beleidsrichtlijnen en daarna volgden productspecifieke aanbevelingen voor verschillende andere testen voor tbc-diagnostiek. Maar gezien het groeiend aantal nieuwe testen met vergelijkbare toepassingen hanteert de WHO sinds december 2020 een nieuwe aanpak [4]. De WHO beveelt nu op technologie gebaseerde klassen aan van producten met vergelijkbare kenmerken en functies. Deze aanpak zal naar verwachting het concurrentievermogen op het gebied van testprijs, kwaliteit en service vergroten. Het zal ook de revisie van de richtlijnen vereenvoudigen en versnellen.

**Figuur 2.** Percentage nieuwe en terugkerende pulmonale tbc-patiënten met bacteriologische bevestiging (boven) en bacteriologisch bevestigde pulmonale tbc-patiënten getest voor rifampicine-resistentie (onder), 2020 (bron: Wereldgezondheidsorganisatie 2021 [1]). Bacteriologisch bevestigde patiënten zijn gedefinieerd als mensen gediagnosticeerd met tbc met behulp van kweek, snelle moleculaire testen aanbevolen door de WHO of sputummicroscopie.





Eerdere productgebaseerde aanbevelingen zijn nog steeds geldig en zullen met toekomstige herzieningen in het klassegebaseerde systeem worden geïntegreerd [4].

De technologieklassen voor beleidsaanbevelingen worden gedefinieerd door complexiteit van de testimplementatie, het type technologie en het doel van de test [4]. Het complexiteitsniveau is gebaseerd op de benodigde infrastructuur, apparatuur en laboratoriumpersoneelsvaardigheden en wordt geclassificeerd als eenvoudig, laag, matig of hoog. In termen van

technologie-type zijn er twee groepen NAAT's (nucleic acid amplification tests); de ene gebruikt automatisering, de andere omgekeerde hybridisatie. Het doel van de test heeft betrekking op de beoogde toepassing van het product: de diagnose van tbc en/of detectie van resistentie tegen eerste- en/of tweedelijngeneesmiddelen.

Met de herziening in 2021 van het WHO-handboek over tbc-diagnostiek kwamen er drie nieuwe klassen van NAAT's bij waarvoor specifieke aanbevelingen werden gedaan [4]. De klassen zijn: i) matig complexe

geautomatiseerde NAAT's voor detectie van tbc en resistentie tegen rifampicine en isoniazide (vier verschillende producten); ii) geautomatiseerde NAAT's met lage complexiteit voor detectie van resistentie tegen isoniazide en tweedelijng anti-tbc-middelen (Xpert MTB/XDR); en iii) hoog complexe omgekeerde hybridi-satie NAAT's voor detectie van resistentie tegen pyrazinamide (GenoScholar PZA-TB II). Tabel 1 geeft een overzicht van WHO-goedgekeurde producten. De specifieke aanbevelingen per test verschillen; zo wordt de LF-LAM-test aanbevolen voor hivpositieve patiënten. Deze laminaire flow (LF) sneltest toont het antigeen lipoarabinomannan (LAM) aan in urine. Alle WHO-goedgekeurde snelle testen kunnen gebruikt worden voor pulmonale tbc, maar voor sommige testen ontbreekt nog bewijs voor het testen van ander patiëntmateriaal. De WHO beveelt het gebruik van LF-LAM wel ook aan voor extrapulmonale tbc en de Xpert-test ook voor extra-pulmonale tbc en tbc-meningitis. De WHO beveelt aan om in alle instellingen voor iedereen met symptomen van tbc een snelle techniek te gebruiken als eerste diagnostische test om *M. tuberculosis* complex en rifampicine-resistentie te detecteren, om ervoor te zorgen dat de juiste behandeling snel kan worden gestart [4].

### Gamechanger: de Xpert MTB/RIF-test

In de afgelopen jaren is het diagnostische landschap uitgebreid met moleculaire testen. Vanaf 2008 werden line-probe assays aanbevolen door de WHO. Deze verkorten de detectie van resistentie in vergelijking met kweekgebaseerde gevoeligheidsbepalingen van 2-3 maanden tot enkele dagen tot 2 weken. In 2010 werd de Xpert MTB/RIF-test, op het GeneXpert platform (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA) door de WHO aanbevolen voor de initiële diagnose van tbc. Dit betekende een breuk met meer dan een halve eeuw goedkope microscopienetwerken in Azië en Afrika. Een simpele voorbereiding van het sputum volstaat waarna DNA-extractie en een PCR volgt in een cartridge in de GeneXpert. Simultaan wordt *M. tuberculosis* complex en resistentie tegen rifampicine gedetecteerd. Rifampicine draagt als eerstelijns-medicijn bij aan sterilisatie en daarmee aan de preventie van recidieven. De kweekmethode nam vier tot zes weken in beslag, de Xpert MTB/RIF-test van monsterafname tot resultaat slechts enkele uren. Deze tijds winst heeft belangrijke consequenties voor de patiënt en de bestrijding van MDR/XDR-tbc.

De test is inmiddels in meer dan 130 landen ingevoerd en het gebruik groeit. De positief-voorspellende waarde is in landen met een zeer lage incidentie van tbc uiteraard kleiner dan in landen waar tbc veel voorkomt [4]. De Xpert is een ware gamechanger gebleken voor de diagnostiek van (multiresistente) tbc. In 2020 is de meer gevoelige Xpert MTB/RIF Ultra-test goedgekeurd door de WHO [5,6].

Zuid-Afrika was een van de eerste lage-inkomenslanden die de Xpert MTB/RIF-test implementeerden in het nationale algoritme voor tbc-diagnose en de test op grote schaal toepasten [7]. In 2017 waren daar 314 GeneXpertmachines in gebruik en werden er meer dan acht miljoen testen uitgevoerd, goed voor meer dan de helft van het wereldwijde gebruik van Xpert MTB/RIF-testcartridges [7]. Het KNCV Tuberculosefonds heeft in tien landen bijgedragen aan het invoeren van de GeneXpert, waaronder in Nigeria, waar de Xpert MTB/RIF-test in 2011 werd geïntroduceerd. Het programma werd uitgevoerd in samenwerking met de Nigeriaanse overheid, de steun van het United States Agency for International Development (USAID) en onder toezicht van het Nationale TB Programma [8].

Cepheid, het bedrijf dat GeneXpert-machines produceert, heeft het Tuberculosefonds in 2014 aangesteld als geautoriseerde serviceverlener in Nigeria met als doel de stilstandtijd van de machines te beperken. Het KNCV heeft naast de installatie van vele honderden GeneXpertmachines ook lokale capaciteit opgebouwd voor onderhoud, machinekalibraties, probleemoplossing en digitale connecties met alle machines in het land. Dit maakt het mogelijk om op nationaal niveau het gebruik, de resultaten, het onderhoud en de bevoorrading te analyseren en te coördineren. Inmiddels worden in Nigeria 413 GeneXpertmachines gebruikt in de strijd tegen tbc, hiv en covid-19 [9]. GeneXpert-machines worden ook toegepast in mobiele testtrucks die kunnen worden ingezet voor onderzoek van risicogroepen of op afgelegen locaties (figuur 3, pag. 82) [9].

Voor kinderen en mensen met hiv is het vaak heel moeilijk om sputum op te hoesten en is er vaak sprake van tbc met een lage bacillaire lading. Invasieve diagnostiek (scopie) is duur en pijnlijk en vaak niet beschikbaar. Testen van ontlasting is voor deze groepen een waardevolle aanvulling in de diagnostiek. Recent zijn verschillende ontlastingsverwerkingsmethoden gepubliceerd voor het testen op de aanwe-

**Tabel 1.** Overzicht van alle momenteel door de WHO aanbevolen snelle testen voor de initiële en follow-up diagnose van tbc (bron: WHO [4]). De WHO heeft elk van deze testen beoordeeld en goedgekeurd en heeft aanbevelingen ontwikkeld voor het gebruik ervan.

Doel	Test naam/ [technologieklasse] (Fabrikant)	Resistentie detectie*	Uitvoering	Systeem- basis	Target	Techniek
<b>Initiële diagnose van tbc met resistentiedetectie</b>						
	Xpert MTB/RIF (Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)	RIF	Grotendeels automatisch	Cartridge	DNA	Real-time PCR (cyclus drempelanalyse)
	Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid)	RIF	Grotendeels automatisch	Cartridge	DNA	Real-time PCR (smelttemperatuur analyse)
	Truenat MTB (plus) & MTB-RIF (Molbio Diagnostics, Verna, Goa, India)	RIF	Semiautomatisch	Chip	DNA	Real-time micro-PCR
	[Matig-complexe geautomatiseerde NAAT's] (diverse**)	RIF, INH	Grotendeels automatisch	Verskillend	DNA	Real-time PCR
<b>Initiële diagnose van tbc zonder resistentiedetectie</b>						
	TB-LAMP (Eiken Chemical, Taitoku, Tokyo, Japan)	Nee	Semiautomatisch of handmatig	Tube	DNA	Loop-mediated isothermal amplification
	LF-LAM (AlereLAM; Abbott Laboratories, Lake Bluff, IL, USA)	Nee	Handmatig	Strip	Antigenen	Immunocapture
<b>Vervolgdiagnose na tbc-bevestiging</b>						
	[Laag-complexe geautomatiseerde NAATs]; Xpert MTB/XDR (Cepheid)	INH, FQs, ETO, SLDs	Grotendeels automatisch	Cartridge	DNA	Real-time PCR
	GenoType MTBDRplus (Hain Lifescience, Nehren, Duitsland)	RIF, INH	Semiautomatisch of handmatig	Strip	DNA	Line probe assay
	GenoType MTBDRsl (Hain Lifescience)	FQs, AMK	Semiautomatisch of handmatig	Strip	DNA	Line probe assay
	[Hoogcomplexe hybridisatie NAAT's]; GenoScholar PZA-TB (Nipro, Osaka, Japan)	PZA	Semiautomatisch of handmatig	Strip	DNA	Line probe assay

USA = United States of America; NAAT's = nucleic acid amplification tests; DNA = deoxyribonucleic acid; PCR = polymerase chain reaction; \*RIF rifampicine; INH = isoniazide; FQ's = fluorochinolonen; ETO = ethionamide; SLD's = second-line injectable drugs (amikacine, kanamycine en capreomycine); AMK = amikacine; PZA = pyrazinamide; \*\* Abbott RealTime MTB and MTB RIF/INH (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA), BD MAX MDR-TB (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA), Bruker-Hain FluoroType MTBDR (Hain Lifescience), Bruker-Hain FluoroType MTBDR (Hain Lifescience).

zigheid van *M. tuberculosis*-complex DNA, maar deze methoden zijn complex, arbeidsintensief, tijdrovend, en behoeven specifieke veiligheidsmaatregelen en een goede infrastructuur [10].

Het KNCV Tuberculosefonds beseft dat dit geen oplossing zou bieden voor de landen waar kinder-tbc het meeste voorkomt. Daarom ontwikkelde zij een eenvoudig en goedkoop alternatief en toonde in Afrika en Azië aan dat deze ontlastingsverwerkingsmethode gebruikt kan worden voor GeneXperttesting [11]. De methode maakt een bacteriologische diagnose van (medicijnresistente) tbc bij kinderen en hiv-geïnfecteerden mogelijk zodat vroegtijdig de juiste behandeling ingezet kan worden en langdurige zorg-trajecten en extra kosten voor de patiënt en het gezondheidssysteem vermeden worden. Het KNCV Tuberculosefonds ondersteunt de implementatie van deze test (figuur 4, pag. 84). De WHO heeft recentelijk het gebruik van ontlasting aanbevolen als primair monstertype voor de diagnose van tbc bij kinderen [5].

### Nieuwe definitie voor (pre-)XDR-tbc en resistentiediagnostiek

De behandeling van tbc heeft recent aanzienlijke veranderingen ondergaan, waarbij nieuwe geneesmiddelen en combinatietherapieën worden aanbevolen. In 2020 werden nieuwe definities geïntroduceerd [3]; pre-XDR-tbc wordt gedefinieerd als resistentie tegen ten minste rifampicine en een fluorchinolon en XDR-tbc heeft aanvullend nog resistentie tegen ten minste één extra groep A-medicijn zoals bedaquiline of linezolid [3]. De veranderingen in de behandeling van tbc vereisen een opschaling van de capaciteit van gevoeligheidsbepalingen, met name voor nieuwe en hergebruikte geneesmiddelen.

De WHO heeft in 2018 de kritische concentraties voor fenotypische gevoeligheidsbepalingen bijgewerkt om de nieuwe en hergebruikte geneesmiddelen op te nemen en recent ook de kritische concentratie voor rifampicine in de mycobacteriën groei-indicatorbuis (MGIT) en 7H10 vloeibare media verlaagd [12, 13]. Een

verantwoorde introductie van de nieuwe pre-XDR-tbc en XDR-tbc-definities en nieuwe behandelingschema's vereisen een snelle opschaling van relevante resistentiebepalingen in landen waar MDR/XDR-tbc veel voorkomt.

### Tbc-diagnostiek nu en in de toekomst

Met next-generation sequencing (NGS)-methoden kunnen speciesdeterminatie en detectie van resistentiegeassocieerde mutaties voor veel tbc-geneesmiddelen worden gecombineerd. Ook kunnen fylogenetische afstamming, overdraagbaarheid en/of pathogeniciteit worden bepaald. Deze techniek wordt gebruikt in verschillende hoge-inkomenslanden, waaronder Nederland, voor epidemiologisch onderzoek ter ondersteuning van het bron- en contactonderzoek. Een pilotstudie naar de bruikbaarheid van NGS voor surveillance van tbc in de EU/EER toonde aan dat NGS-gebaseerde surveillance haalbaar is en de dynamiek van binnenlandse en grensoverschrijdende rifampicine-resistente- en MDR-tbc-transmissie tussen EU/EER-landen efficiënt kan ophelderen [14]. Uit deze studie kwam naar voren dat een Europees NGS-surveillancestelsel voor tbc moet worden versterkt door nationale geïntegreerde systemen voor NGS-surveillance. Ook bleek hieruit de noodzaak om procedures te ontwikkelen voor internationaal onderzoek van grensoverschrijdende clusters van identieke stammen [14].

Op NGS-gebaseerde resistentiedetectie heeft het potentieel om de behoefte aan fenotypische gevoeligheidsbepalingen voor klinische en epidemiologische doeleinden te verminderen. Het toepassen van NGS in een land als Nederland, met een lage tbc-incidentie en lage prevalentie van resistentie, kan de behoefte aan fenotypische gevoeligheidsbepalingen tot 10 procent van de isolaten reduceren en nauwkeurig mutaties detecteren die verband houden met lage resistentie, die vaak gemist worden in conventionele gevoeligheidsbepalingen [15]. Op NGS-gebaseerde resistentiedetectie kan met name nuttig zijn voor geneesmiddelen waarvoor fenotypische testen onbetrouwbaar zijn, of in omgevingen waar de capaciteit voor betrouwbare fenotypische gevoeligheidsbepalingen ontbreekt. Dat laatste is in veel landen het geval.

De benodigde infrastructuur, computercapaciteit en -expertise voor de huidige NGS-systemen is echter

dermate hoog dat het de implementatie van op NGS-gebaseerde gevoeligheidsbepalingen beperkt. In eerste instantie zal capaciteitsopbouw gericht zijn op nationale tbc-referentielaboratoria en goed presterende regionale tbc-referentielaboratoria. Een ander nadeel van NGS-gebaseerde gevoeligheidsbepalingen is dat nog niet alle resistentiegerelateerde mutaties bekend zijn en dat van niet alle mutaties bekend is of deze klinisch relevant zijn. Daarom heeft de WHO in 2021 een catalogus uitgebracht met de momenteel bekende resistentie-gerelateerde mutaties van *M. tuberculosis* [16]. Deze catalogus biedt een gestandaardiseerde referentie voor de interpretatie van resistentie tegen tbc-geneesmiddelen [16]. Momenteel voert de Stichting Innovatieve Nieuwe Diagnostiek (ook wel bekend als FIND, Foundation for Innovative New Diagnostics) een evaluatiestudie uit van drie op amplificatie gebaseerde NGS-testen voor het detecteren van resistente tbc rechtstreeks uit sputummonsters. Deze testen zijn nog niet beoordeeld of goedgekeurd door de WHO.

Na tientallen jaren van stilstand in de diagnostiek van tbc, is er nu een veelbelovende pijplijn met meer dan 50 verschillende testen voor verschillende doeleinden. Daaronder bevinden zich verschillende snelle biomarkergebaseerde en non-sputumgebaseerde testen voor de detectie van tbc, PCR/line probe assays voor de detectie van tbc, testen die de ontwikkeling van infectie naar actieve ziekte voorspellen, PCR-, PCR/line probe assay- en NGS-gebaseerde gevoeligheidsbepalingen, en testen voor het monitoren van de behandeling. Ten slotte zijn ook triagetesten in ontwikkeling voor het identificeren van mensen die verdacht worden van tbc, op basis van immunoassays of spectroscopie. FIND houdt alle nieuwe ontwikkelingen op het gebied van tbc-diagnostiek bij en leidt ook de meeste evaluatiestudies.

Het KNCV Tuberculosefonds rolt het testen van ontlasting met de GeneXperttechnologie uit (figuur 4, pag. 84) en is onder andere betrokken bij de evaluatie van snelle biomarker- en non-sputumgebaseerde testen voor de detectie van tbc en covid-19 en de evaluatie van een triage immunoassay. In 2021 is het KNCV Tuberculosefonds een demonstratieproject gestart in Kirgizië, Tanzania en Vietnam om het sequensen met behulp van draagbare apparaten te evalueren voor de diagnose van (resistente) tuberculose en overige infectieziekten en antimicrobiële resistentie. Hierbij zullen de effectiviteit,

**Figuur 3. Praktijkvoorbeeld 1: Wellness on Wheels (WoW) trucks (bron en foto: KNCV Tuberculosefonds [9]).** Sinds 2018 worden WoW-trucks ingezet in Nigeria, door het KNCV Tuberculosefonds, in samenwerking met de WHO, het nationale tbc-programma en sleutelpersonen uit de gemeenschap, om mensen met slechte toegang tot gezondheidszorg te bereiken en te testen op tbc. Vermoedelijke tbc-patiënten worden gescreend met behulp van speciale software die röntgenfoto's digitaal beoordeelt. Sputummonsters worden onderzocht op tbc met een GeneXpertmachine, en sinds juni 2020 ook op covid-19. In afgelegen gebieden kunnen met deze mobiele gezondheidsklinieken zo'n 100 mensen per dag op beide infectieziekten getest worden. Het KNCV Tuberculosefonds heeft vergelijkbare projecten in vijf andere landen.





**Figuur 4. Praktijkvoorbeeld 2. Trainingen voor het testen van ontlasting (bron en foto: KNCV Tuberculosefonds).** De diagnose tbc wordt veelal gebaseerd op het testen van sputum dat uit de longen wordt opgehoest. Het KNCV Tuberculosefonds ontwikkelde een uiterst simpele methode om ontlasting voor te bewerken zodat deze onderzocht kan worden met behulp van de GeneXperttesten [11]. De test werd succesvol gepilot in Ethiopië, Indonesië en Vietnam. Inmiddels is Vietnam het eerste land ter wereld dat deze methode routinematig gebruikt om tbc met ontlasting te diagnosticeren.

haalbaarheid, acceptatie en kosten geëvalueerd worden van het gebruik van NGS dicht bij het zorgpunt in lage- en middeninkomenslanden. Deze ervaringen zijn onontbeerlijk voor WHO-richtlijnontwikkeling en voor rationele inzet van menskracht en middelen in de bestrijding van infectieziekten, waarbij zowel de individuele patiëntenzorg als de directe informatieverzameling over de verspreiding van infectieziekten en gerelateerde medicijnresistentie centraal staan. Deze informatie is ook essentieel voor de mondiale beleidsontwikkeling op het gebied van infectieziektenbestrijding, antimicrobiële resistentie en pandemieën.

### Dankwoord

De auteurs danken alle nationale en internationale samenwerkingspartners en donateurs van het KNCV Tuberculosefonds. In het bijzonder dank aan de donoren die de studies waaraan in dit artikel gerefereerd wordt mogelijk maakten; USAID (invoeren van de GeneXperttechnologie en de WOW-trucks), de Nationale Postcode Loterij (Droomfondsproject genom sequencing), en sponsoren van een hardloopevenement en een particulier fonds (ontwikkeling van de SOS-ontlastingsmethode).

### Referenties

1. Global tuberculosis report 2021. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CCBY-NC-SA3.0IGO. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>.
2. The Report of the High-Level Panel of Eminent Persons on the Post-2015 Development Agenda. A new global partnership: eradicate poverty and transform economies through sustainable development. United Nations 2013.
3. Meeting report of the WHO expert consultation on the definition of extensively drug-resistant tuberculosis, 27-29 October 2020. Geneva: World Health Organization; 2021.
4. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection, 2021 update. Geneva: World Health

Organization; 2021.

5. WHO operational handbook on tuberculosis. Module 3: diagnosis - rapid diagnostics for tuberculosis detection. Geneva: World Health Organization; 2020.

6. Horne DJ, Kohli M, Zifodya JS, et al. Xpert MTB/RIF and Xpert MTB/RIF Ultra for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Jun 7;6(6):CD009593. doi: 10.1002/14651858.CD009593.pub4. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2021 Feb 22;2:CD009593. PMID: 31173647; PMCID: PMC6555588.

7. Stevens WS, Scott L, Noble L, Gous N, Dheda K. Impact of the GeneXpert MTB/RIF technology on tuberculosis control. *Microbiol Spectr.* 2017;5(1). doi: 10.1128/microbiolspec.TB2-0040-2016. PMID: 28155817.

8. Gidado M, Onazi O, Nwadike P, et al. Assessment of gene-Xpert MTB RIF program implementation and the challenges for enhanced tuberculosis diagnosis in Nigeria. *SAARC J Tuber Lung Dis HIV/AIDS.* 2016;12:1-7.

9. Tuberculosefonds helpt Nigeria in strijd tegen tbc en COVID-19. KNCV Tuberculosefonds 2020. Available from: <https://www.kncvtbc.org/2020/10/02/tuberculosefonds-helpt-nigeria-in-strijd-tegen-tbc-en-covid-19/>

10. Banada PP, Naidoo U, Deshpande S, et al. 2016. A novel sample processing method for rapid detection of tuberculosis in the stool of pediatric patients using the Xpert MTB/RIF assay. *PLoS One* 11:e0151980.

11. De Haas P, Yenew B, Mengesha E, et al. The Simple One-Step (SOS) stool processing method for use with the Xpert MTB/RIF assay for a child-friendly diagnosis of tuberculosis closer to the point of care. *J Clin Microbiol.* Jul 19;59(8):e0040621. doi: 10.1128/JCM.00406-21. Epub 2021 Jul 19.

12. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of medicines used in the treatment of drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 2018.

13. Technical report on critical concentrations for drug susceptibility testing of isoniazid and the rifamycins (rifampicin, rifabutin and rifapentine). Geneva: World Health Organization; 2021.

14. Tagliani E, Anthony R, Kohl TA, et al. Use of a whole genome sequencing-based approach for *Mycobacterium tuberculosis* surveillance in Europe in 2017-2019: an ECDC pilot study. *Eur Respir J.* 2021 Jan 5;57(1):2002272. doi: 10.1183/13993003.02272-2020. Print 2021 Jan. PMID: 32732329.

15. Jajou R, van der Laan T, de Zwaan R, et al. WGS more accurately predicts susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs than phenotypic testing. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(9):2605-16. doi: 10.1093/jac/dkz215.

16. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021.

## *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* als veroorzaker van groep A-streptokokkeninfecties

Koos Korsten, Wieke Freudenburg-de Graaf, Wendy Bril-Keijzers, Boas van der Putten, Nina van Sorge

### Samenvatting

Invasieve groep A-streptokokken (iGAS)-infecties zijn wereldwijd verantwoordelijk voor een grote ziektelast. *Streptococcus pyogenes* wordt als voornaamste verwekker van iGAS-infecties doorgaans synoniem gesteld aan GAS. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) veroorzaakt vergelijkbare invasieve infecties. SDSE wordt doorgaans gekenmerkt door lancefieldgroep G of C (GCG-SDSE), maar kan ook lancefieldgroep A (GA-SDSE) dragen. Dit bemoeilijkt speciesdifferentiatie binnen GAS. Nederlandse richtlijnen specificeren behandeling en profylaxe van iGAS-infecties zonder noodzaak tot speciesdifferentiatie, terwijl dit voor de meldingsplicht van iGAS-infecties wel noodzakelijk is. Met 39 klinische SDSE-isolaten uit het Nederlands Referentie Laboratorium Bacteriële Meningitis (NRLBM) onderzochten wij diagnostische methoden voor speciesdifferentiatie binnen GAS.

Tevens werd via een enquête de diagnostiek van hemolytische streptokokken geïnventariseerd onder Nederlandse microbiologische laboratoria. De proportie GA-SDSE (n = 14) binnen 591 GAS-infecties tussen 2019 en 2021 was 2,4 procent. GA-SDSE vertoonden biochemisch meer overeenkomsten met *S. pyogenes* dan met GCG-SDSE. Hoewel 95 procent van de Nederlandse laboratoria op speciesniveau determineert via malditof, rapporteert slechts 55 procent op speciesniveau aan de kliniek. Slechts 47 procent van de deelnemende laboratoria kon GA-SDSE determineren. Wetenschappelijk bewijs voor de klinische relevantie van speciesdifferentiatie binnen GAS ontbreekt, hetgeen de noodzaak tot routinematige detectie op speciesniveau met lancefieldtypering benadrukt.

### Summary

Invasive group A streptococcal (iGAS) infections, often caused by *Streptococcus pyogenes*, cause a large disease burden worldwide. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) causes invasive infections clinically indistinguishable from *S. pyogenes*. SDSE is generally classified as lancefield group G or C (GCG-SDSE), but can present as lancefield group A (GA-SDSE), complicating GAS-species discrimination. Dutch guidelines specify treatment and prophylaxis for iGAS infections regardless of the causative GAS-species. However, species differentiation is required to fulfil the GAS notifiable disease case definition. Using 39 clinical SDSE isolates from the Netherlands Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, we examined diagnostic methods for species differentiation within GAS-isolates. Additionally, we sent out a questionnaire to the Dutch microbiological laboratories to chart their diagnostic procedures for hemolytic streptococci. The proportion of GA-SDSE (n=14) among 591 GAS-isolates between 2019-2021 was 2.4 per cent. Biochemical tests showed that GA-SDSE behaved

Amsterdam Universitair Medische Centra, Amsterdam, Nederland, Nederlands Referentie Laboratorium voor Bacteriële Meningitis, dr. K. Korsten, aios medische microbiologie, dr. W. Freudenburg-de Graaf, arts-microbioloog, drs. W.C.M. Bril-Keijzers, research analist, drs. B.C.L. van der Putten, prof. dr. N.M. van Sorge, hoofd Nederlands Referentie Laboratorium voor Bacteriële Meningitis. Amsterdam Universitair Medische Centra, Universiteit van Amsterdam, Amsterdam, Nederland, afdeling medische microbiologie en infectie preventie, dr. K. Korsten, dr. W. Freudenburg-de Graaf, prof. dr. N.M. van Sorge. Correspondentieadres: dr. K. Korsten ([k.korsten@amsterdamumc.nl](mailto:k.korsten@amsterdamumc.nl)).

more like *S. pyogenes* than like GCG-SDSE. Although 95 per cent of laboratories could discriminate at the species level using malditof, only 55 per cent reported on species level to the clinic. Only 47 per cent of laboratories could distinguish GA-SDSE. Literature is inconclusive about the requirements for specific treatment and prophylaxis of GA-SDSE infections. Determination at species level with lancefield-typing is required to address this knowledge gap.

## Introductie

Groep A-streptokokken (GAS) veroorzaken naar schatting wereldwijd 1,78 miljoen ernstige infecties en minstens een half miljoen sterfgevallen per jaar [1]. Een derde van deze sterfte wordt veroorzaakt door invasieve GAS (iGAS)-infecties en GAS-bacteriëmieën [1]. iGAS-infecties manifesteren zich vaak met een specifiek klinisch beeld zoals streptokokkentoxischeshocksyndroom (STSS) en fasciitis necroticans (FN), ook al bestaat er geen eenduidige definitie van iGAS [2].

*Streptococcus pyogenes* wordt vaak geassocieerd met invasieve streptokokken-infecties. 16 tot 43 procent van de invasieve groep A-, B-, C- en G-streptokokkeninfecties wordt echter veroorzaakt door *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) [3-6]. Zowel *S. pyogenes* als SDSE groeit met  $\beta$ -hemolytische activiteit op bloed-agarplaten.

Historisch worden *S. pyogenes* en SDSE van elkaar onderscheiden door de expressie van specifieke lancefieldantigenen, waarbij *S. pyogenes* lancefield-groep A en SDSE lancefieldgroep G of C tot expressie brengt. Echter, 3 tot 10 procent van de SDSE-isolaten heeft het lancefieldgroep A-antigeen (GA-SDSE), wat de differentiatie met *S. pyogenes* bemoeilijkt [7-10]. De proportie van GA-SDSE in het totaal van GAS-infecties is slechts in één gepubliceerde studie beschreven (0,6 procent) [11].

Beide pathogenen kunnen een breed scala aan ziektes met verschillende ernst veroorzaken en zijn daarmee klinisch niet goed te onderscheiden. *S. pyogenes* is echter vaker geassocieerd met diepere huidinfecties, STSS en FN in vergelijking met SDSE [4,5,12].

Klinische studies laten zien dat 10 tot 23 procent van de patiënten met invasieve SDSE (iSDSE)-infecties op de intensive care (IC) wordt opgenomen [5-7] en dat 3 tot 33 procent overlijdt [5-7,12-14]. Hiermee is het percentage IC-opnames voor iSDSE lager vergeleken

met invasieve *S. pyogenes*-infectie (25 tot 49 procent) [5,6], maar is de sterfte vergelijkbaar [5,6,12,14]. Vermoedelijk komt dit doordat patiënten met iSDSE-infecties ouder zijn en vaker onderliggend lijden hebben dan patiënten met invasieve *S. pyogenes*-infecties [5-7,12]. Dit kan ook de toename van het aantal SDSE-infecties in de afgelopen decennia in westerse landen verklaren aangezien deze landen te maken hebben met een vergrijzende populatie [4-6,12].

De Stichting Werkgroep Antibiotica Beleid (SWAB) adviseert toevoeging van clindamycine aan de standaardbehandeling met een bètalactamantibioticum bij STSS en FN ten gevolge van GAS [15]. Daarnaast wordt geadviseerd om huishoudcontacten van iGAS-patiënten met een STSS of FN profylactisch antibiotica te geven ter preventie van secundaire infecties [2,15].

Deze richtlijnen voor behandeling en profylaxe maken geen onderscheid in het pathogeen dat de iGAS-infectie veroorzaakt. iGAS-infecties vallen onder de meldingsplichtige ziekten indien het een STSS, FN of puerperale koorts betreft waarbij opvallend genoeg wel specifiek *S. pyogenes* moet zijn geïsoleerd [2].

Kortom, er lijkt geen eenduidigheid te bestaan tussen behandel- en profylaxe-richtlijnen enerzijds en meldingsplicht anderzijds. Dit werpt de vraag op wat het klinische nut is van de determinatie op species-niveau bij GAS-infecties.

Typering van GAS voor epidemiologisch verwantschap wordt in Nederland verricht door het Nederlands Referentie Laboratorium voor Bacteriële Meningitis (NRLBM). Met enige regelmaat bevinden zich (GA-)SDSE-isolaten onder de ingestuurde GAS-isolaten. In deze studie onderzochten wij de proportie van GA-SDSE binnen GAS-infecties en bekeken we naar de diagnostische mogelijkheden om onderscheid te maken tussen *S. pyogenes*, GA-SDSE en GCG-SDSE (SDSE met lancefieldgroep G of C). Daarnaast brachten wij het huidig diagnostisch proces naar GAS-infecties in kaart via een rondgang langs de Nederlandse microbiologische laboratoria.

Ten slotte keken wij in de literatuur naar de klinische implicaties voor het maken van onderscheid binnen GAS op speciesniveau.

## Methode

### Meldingsplicht GAS in Nederland, typering door het NRLBM

Sinds de oprichting van het NRLBM in 1959 worden al GAS-isolaten verzameld in het kader van bacteriële meningitis. Vanaf 2008 kwam er een meldingsplicht in Nederland voor drie typen iGAS-infecties (STSS, FN en puerperale sepsis), wanneer deze worden veroorzaakt door *S. pyogenes*. Sinds 2016 is de meldingsplicht voor puerperale sepsis verruimd naar puerperale koorts óf sepsis (kraamvrouwenkoorts) met isolatie van *S. pyogenes* uit bloed of de tractus urogenitalis. In 2018 werd in Nederland een verheffing van het aantal gevallen van kraamvrouwenkoorts gezien.

Om te bepalen of typering de clusterdetectie kon verbeteren werden alle microbiologische laboratoria vanaf 2019 gevraagd structureel GAS-isolaten van patiënten met kraamvrouwenkoorts of -sepsis in studieverband in te sturen naar het NRLBM. Daarnaast startte een tweede pilotstudie naar iGAS-ziekten, waarbij aan negen sentinel laboratoria verspreid over het land werd gevraagd iGAS-isolaten verkregen uit een steriel (bacteriëmie, STSS) of niet-steriel compartiment en klinische verdenking op iGAS (zoals bij fasciitis necroticans) in te sturen naar het NRLBM. Deze studies zorgden tezamen voor een forse toename van het aantal GAS-isolaten dat naar het NRLBM werd ingestuurd en geanalyseerd.

### Diagnostiek GAS in het NRLBM

Als eerste verificatiestap wordt in het NRLBM een bacitracinetest verricht op ingestuurde GAS-isolaten om de identiteit van *S. pyogenes* te bevestigen. *S. pyogenes* is bacitracinegevoelig waarbij de remmingszone 16 mm of meer moet zijn (Diatabs, Rosco [16]). Daarnaast wordt standaard *emm*-typering verricht voor analyse van mogelijke clusters, waarbij de genetische variatie in het *emm*-gen (dat codeert voor het M-eiwit) wordt getypeerd.

Aanvullende diagnostiek wordt verricht bij afwijkende morfologische groei, bacitracineongevoeligheid of een afwijkend *emm*-type, waarbij een lancefield-latex-agglutinatie test wordt verricht (lancefieldgroepen A/B/C/D/F&G, StrepTex, ThermoFisher). Een S2-PCR wordt verricht ter verificatie van de definitieve species binnen de streptokokkenfamilie indien eerdere testen geen definitief uitsluitsel geven [17].

### Dataverzameling en diagnostiek van GAS

Van alle 895 GAS-isolaten in de collectie van het NRLBM van de afgelopen 20 jaar (2001-2021) werden de 39 isolaten die als SDSE werden gedetermineerd, geïncubeerd in dit onderzoek. SDSE werd gestratificeerd in GA-SDSE en GCG-SDSE. Demografische gegevens en ziektebeelden werden vergeleken op basis van het begeleidende inzendformulier van de lokale ziekenhuizen en laboratoria. Bij alle SDSE-isolaten werd een bacitracinetest, lancefield-agglutinatie test, Pyrrolidonyl Arylamidase (PYR)-test [16], malditof-determinatie, *emm*-typering en S2-PCR verricht. De PYR-test wordt onder andere gebruikt om *S. pyogenes* te onderscheiden van andere bètahemolytische streptokokken op basis van het enzym pyrrolidonyl aminopeptidase [16]. Verondersteld wordt dat SDSE dit enzym mist, wat een negatieve testuitslag zou geven in tegenstelling tot *S. pyogenes*. Bij de PYR-test werden een negatieve controle (*E. coli* ATCC25922) en positieve controle (*E. faecalis*, ATCC29212) plus twee klinische isolaten van bewezen *S. pyogenes* meegenomen. Alle SDSE-isolaten werden ook met malditof (Bruker) gedetermineerd.

Malditofresultaten werden beoordeeld op identificatiescore (2.00 of hoger is betrouwbare identificatie van een pathogeen) en consistentie categorie. Bij categorie A heeft de eerste (hoogste) match een score 2.00 of hoger en is de tweede match eenzelfde species. Bij categorie B zijn de eerste (hoogste) match en de tweede match niet hetzelfde species, al kunnen ze beide een score van 2.00 of hoger hebben. Definitieve determinatie van GA-SDSE in ons onderzoek vond plaats door een combinatie van *emm*-typering en S2-PCR ter bevestiging van de species, waarbij de agglutinatie test (StrepTex) de lancefieldgroep bepaalde.

### Landelijke enquêtediagnostiek van GAS

Om inzicht te krijgen in de routinematige diagnostiek naar GAS werd een enquête verstuurd naar 49 Nederlandse microbiologische laboratoria die regelmatig bacteriële isolaten insturen naar het NRLBM. In deze enquête werd gevraagd welke diagnostische testen standaard worden verricht in de diagnostiek van GAS, en of deze in een specifieke volgorde worden verricht. Daarnaast werd gekeken op welke manier de verwekker werd gerapporteerd aan de kliniek. Met de gegevens uit deze enquête werd

gekeken of determinatie van GA-SDSE mogelijk was op basis van de diagnostische methodes gehanteerd door de deelnemende laboratoria.

## Resultaten SDSE-isolaten

Tussen 2001 en 2021 werden in totaal 895 GAS-isolaten ingestuurd naar het NRLBM. Hieruit werden er met S2-PCR-analyse en lancefield-agglutinatietest in totaal 16 (1,8 procent) als GA-SDSE en 23 (2,6 procent) als GCG-SDSE gedetermineerd. Tussen 2019 en 2021, de tijdsperiode waarin iGAS-isolaten via studies structureel werden ingestuurd, werden er 14 (2,4 procent) als GA-SDSE gedetermineerd uit 591 iGAS-isolaten. De GA-SDSE werden veelal ingestuurd in het kader van een wekedeleninfectie (n = 6), orthopedische infectie (n = 5) of een bacteriëmie (n = 2) (tabel 1). GCG-SDSE werden voornamelijk ingestuurd in het kader van een (verdenking op)

Tabel 1. Demografische en klinische karakteristieken van SDSE-isolaten

	GA-SDSE (n = 16)	GCG-SDSE (n = 23)
Leeftijd (mediaan, IQR)	67 (62-70)	59 (27-71)
Vrouwelijk geslacht	7 (44%)	9 (39%)
Type materiaal		
Liquor	1 (6%)	13 (56%)
Bloed	6 (38%)	2 (9%)
Wond	3 (19%)	2 (9%)
Gewrichtspunctaat	5 (31%)	1 (4%)
Urogenitaal	1 (6%)	3 (13%)
Keel	0 (0%)	2 (9%)
Symptomen		
Sepsis/bacteriëmie	2 (13%)	1 (4%)
Meningitis	1 (6%)	12 (52%)
Pneumonie	0 (0%)	1 (4%)
Puerperale koorts	1 (6%)	4 (17%)
Wekedeleninfectie*	6 (38%)	0 (0%)
Orthopedische infecties**	5 (31%)	2 (9%)
Onbekend	1 (6%)	3 (13%)
Overleden***	0 (0%)	1 (4%)

\*Omvat alle wondinfecties, cellulitis en abscessen zonder fasciitis necroticans. \*\*Omvat artritis, geïnfecteerd osteosynthesemateriaal, osteomyelitis. \*\*\*Op het moment van insturen naar het NRLBM; deze data ontbrak bij 10/41 (24 procent) van de ingestuurde SDSE-isolaten.

meningitis (n = 12) of bij puerperale koorts (n = 4). Geen enkel SDSE-isolaat (onafhankelijk van de lancefieldgroep) werd ingestuurd in het kader van een specifieke (verdenking op) STSS of FN. Sterfte werd gerapporteerd bij één patiënt met een GG-SDSE-infectie waarbij een monster van de liquor was ingestuurd bij een bewezen meningitis.

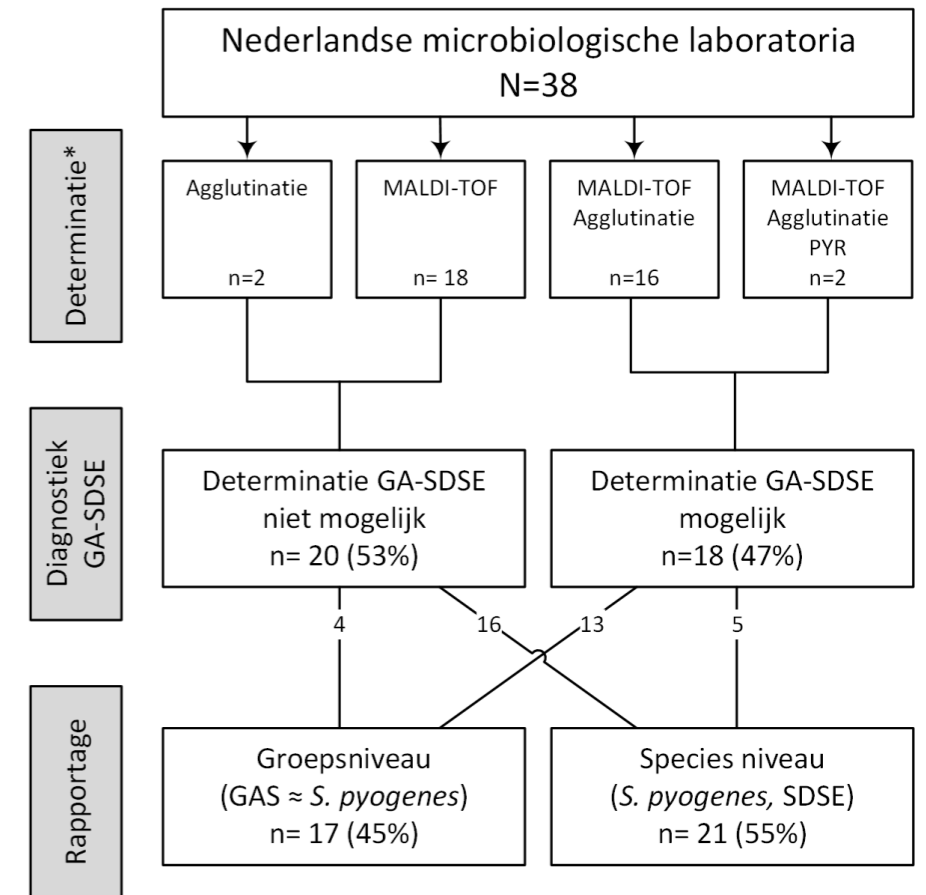
## Diagnostische testen

Gevoeligheid voor bacitracine, zoals bij *S. pyogenes*, werd gezien in 15/16 (94 procent) GA-SDSE-isolaten en 2/23 (9 procent) GCG-SDSE-isolaten (tabel 2, pag. 89). De PYR-test was positief voor 9/16 (56 procent) GA-SDSE- en 4/23 (17 procent) GCG-SDSE-isolaten. Determinatie met malditof toonde dat bij 38/39 (97 procent) SDSE-isolaten *S. dysgalactiae* het hoogst geïdentificeerde pathogeen was met een score van 2.00 of hoger. Bij 27/39 (69 procent) van de SDSE-isolaten werd *S. dysgalactiae* met een consistentie-categorie A gedetermineerd (betrouwbare species-identificatie). Bij 12/39 (31 procent) van de SDSE-isolaten kreeg ook een andere verwekker naast *S. dysgalactiae* een score van 2.00 of hoger (consistentie-categorie B, betrouwbare identificatie maar onzekerheid over species). Van deze 12 categorie B-identificaties werd *S. canis* in 11 gevallen en *S. pyogenes* in het andere geval als alternatieve verwekker aangewezen (*S. canis* eenmaal zelfs met een hogere score dan *S. dysgalactiae*). Acht van de 11 mogelijke *S. canis*-isolaten behoorden echter tot lancefieldgroep A of C, wat *S. canis* uitsluit, omdat *S. canis* altijd behoort tot lancefieldgroep G. Het SDSE-isolaat dat ook een hoge score voor *S. pyogenes* had was een groep G-streptokok, wat determinatie als *S. pyogenes* uitsluit. In totaal resteerden er drie (8 procent) isolaten waarbij op basis van malditof en agglutinatie niet met zekerheid was vast te stellen of het een SDSE dan wel een *S. canis* betrof.

## Landelijke GAS-diagnostiek

Enquêtes werden verstuurd naar 49 laboratoria, waarvan er 38 (78 procent) geretourneerd werden vanuit vijf academische en 33 perifere centra. Verschillende diagnostische combinaties werden routinematig ingezet bij de determinatie van GAS-infecties (figuur 1, pag. 89). In twee gevallen werd determinatie gebaseerd op agglutinatie, hetgeen alleen informatie geeft op groepsniveau zonder speciesinformatie. Malditof, en daarmee dus determi-

Figuur 1. Stroomdiagram van diagnostiek naar GAS in Nederland.



\*Alle monsters werden op plaat gekweekt voordat verdere analyse volgde.

Tabel 2. Vergelijking GA-SDSE met GCG-SDSE in diverse diagnostische testen

Test	GA-SDSE (n = 16)	GCG-SDSE (n = 23)
Bètahemolyse	16 (100%)	23 (100%)
Bacitracinegevoelig (remmingszone $\geq 16$ mm)	15 (94%)	2 (9%)
PYR-test positief	9 (56%)	4 (17%)
MALDI-TOF*		
- <i>S. dysgalactiae</i> $\geq 2.00$ & consistentie A	9 (56%)	18 (78%)
- <i>S. dysgalactiae</i> $\geq 2.00$ & consistentie B	7 (44%)	5 (22%)

\*Score van  $\geq 2.00$  = betrouwbare identificatie. Consistentie A = betrouwbare identificatie op speciesniveau. Consistentie B = betrouwbare identificatie, onzekerheid over species.

natie op speciesniveau, werd door 36/38 (95 procent) van de laboratoria gebruikt in de determinatie. De helft van de laboratoria (18/38, 47 procent) met malditof gebruikte ook agglutinatie en zou daarmee GA-SDSE kunnen determineren. Opvallend was dat van deze 18 laboratoria er slechts vijf rapporteerden op speciesniveau naar de kliniek.

## Discussie

In deze studie werd gekeken naar de diagnostiek en het voorkomen van *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* met een lancefieldgroep A (GA-SDSE) in Nederland. De proportie GA-SDSE binnen GAS-infecties in onze studie tussen 2019 en 2021 was 2,4 procent, wat viermaal hoger is dan de 0,6 procent beschreven in de literatuur [11]. Opvallend was dat GA-SDSE zich biochemisch meer gedroeg als *S. pyogenes* dan als GCG-SDSE. Onderscheid tussen GA-SDSE en *S. pyogenes* is daarmee niet eenduidig te maken op basis van biochemische testen. Een rondgang bij een representatief deel van de Nederlandse microbiologische laboratoria liet zien dat het overgrote deel in staat is om op speciesniveau te differentiëren met de malditof, maar dat slechts 47 procent GA-SDSE zou kunnen determineren op basis van het gerapporteerde diagnostisch proces. Een kanttekening hierbij is dat het onderscheidend vermogen van de malditof voor *S. dysgalactiae*, *S. canis* en *S. pyogenes* niet optimaal is [18,19]. Bij navraag bij Bruker (december 2021) bleken de voorgestelde verbeteringen voor streptokokkendifferentiatie op basis van de artikelen van Jensen uit 2015 [18] en Nybakken uit 2021 [19] nog niet te zijn doorgevoerd. Wel geeft Bruker aan bezig te zijn met een subtyperingsmodule waarmee een verbetering in de streptokokkendifferentiatie wordt verwacht. Deze beperkingen spelen mogelijk een rol in de keuze van een deel van de laboratoria om ondanks de mogelijkheid tot speciesdifferentiatie er alsnog voor te kiezen om te rapporteren op groepsniveau. Wij laten zien dat ondanks deze beperkingen met een combinatie van malditof en agglutinatie vaak alsnog met zekerheid op speciesniveau kan worden gedetermineerd, wat de toegevoegde waarde van een agglutinatietest naast de malditof benadrukt.

## Behandeling van iGAS-infecties

Een belangrijk onderdeel in de pathogenese van iGAS-infecties is de non-specifieke overstimulatie van T-cellen van het immuunsysteem door superantigenen (streptokokkenpyrogene exotoxinen, Spe's) [20]. SDSE beschikt, in tegenstelling tot *S. pyogenes*, in mindere mate over dergelijke superantigenen [10,21-23]. SDSE beschikt echter wel over andere bekende virulentiefactoren die invasieve manifestaties bevorderen, zoals ScpA (C5a-peptidase, remt aantrekking van neutrofielen), Ska (streptokinase, trombolyticum) en streptolysine O (SLO) en streptolysine S (SLS), beide lyserende exotoxinen [24]. De huidige SWAB-richtlijn adviseert toevoeging van clindamycine, naast een bètalactamantibioticum, aan de behandeling van STSS en FN ten gevolge van een GAS. De rationale hiervoor is dat clindamycine de bacteriële eiwitsynthese en daarmee de productie van exotoxinen en superantigenen kan remmen [25]. Observatoire studies laten ook een verminderde mortaliteit zien wanneer clindamycine aan de standaardbehandeling met een bètalactamantibioticum werd toegevoegd in de behandeling van iGAS-infecties in bredere zin [6,26]. Recente studies zagen geen beschermend effect van clindamycine bij invasieve infecties die veroorzaakt werden door groep C- of G-streptokokken [6,26]. Het geregeld voorkomen van resistentie voor clindamycine bij SDSE zou hiervoor verklarend kunnen zijn [7,13,21-23]. Ook het verminderd vermogen van SDSE om super-antigenen te produceren kan een rol spelen. De huidige literatuur lijkt aanvullende behandeling met clindamycine niet te ondersteunen voor niet-GAS-infecties. Specifieke literatuur over behandeling van iGAS-infecties veroorzaakt door GA-SDSE ontbreekt echter.

## Profylaxe van huishoudcontacten bij iGAS

De Nederlandse richtlijnen adviseren chemoproylaxe met antibiotica voor huishoudcontacten van patiënten met een STSS of FN op basis van een GAS-infectie [2,15]. Dit advies is gebaseerd op twee prospectieve studies die lieten zien dat het risico op secundaire iGAS-infecties bij huishoudcontacten van patiënten met iGAS 19 tot 200 keer hoger was dan het risico in de algemene bevolking [27,28]. Er is echter discussie

over deze routinematige profylaxe aangezien het in totaal slechts vijf gevallen van secundaire infectie betrof onder 2874 huishoudcontacten [29]. In Nederland is besloten dat de ernst van een eventuele secundaire iGAS-infectie in combinatie met een geringe toename van extra voorgeschreven antibiotica voldoende reden is om bij STSS of FN veroorzaakt door GAS profylaxe aan te bieden. De richtlijn geeft geen advies over profylaxe indien de verwekker van de GAS-infectie een SDSE betreft. Literatuur over het risico op secundaire infectie bij zowel iSDSE als GA-SDSE-infecties ontbreekt. Wel zijn oudere mensen met onderliggend lijden oververtegenwoordigd binnen de patiëntenpopulatie met iSDSE-infecties [6,26]. Clusters van patiënten met een SDSE-infectie zijn beschreven voor faryngitis en puerperale koorts [30]. De meeste SDSE-infecties lijken echter sporadisch voor te komen en uitbraken zijn veelal gelinkt aan omgevingsfactoren zoals besmet voedsel of sanitaire voorzieningen [30]. De rationale voor antibioticum-profylaxe bij huishoudcontacten van patiënten met een iSDSE-infectie is er daarom nu niet. Het geven van profylaxe dan wel voorlichting over de symptomen van een iSDSE-infectie is te overwegen voor huishoudcontacten met een verhoogd risico op iSDSE-infectie zoals oudere mensen met onderliggend lijden.

## Beperkingen van dit onderzoek

Allereerst zijn we bij het NRLBM afhankelijk van de klinische gegevens die worden vermeld op het inzendformulier. Deze gegevens ontbreken met enige regelmaat. Bij sterfte kan dit nog niet hebben plaatsgevonden op het moment dat het isolaat werd ingestuurd. Ten tweede zijn gerapporteerde ziektebeelden vertekend, zeker vóór 2019, omdat ze werden ingestuurd wegens een specifieke indicatie (veelal een bacteriële meningitis). Ten derde werd, zoals eerder genoemd, het vermogen tot determinatie van SDSE gebaseerd op de aanname dat dit mogelijk was met de malditof. Dit blijkt op basis van literatuur en ons onderzoek niet altijd het geval. Toch geeft ons onderzoek inzicht in het voorkomen en de biochemische karakteristieken van een relatief grote collectie GA-SDSE-isolaten en wordt een representatief beeld van de diagnostiek bij GAS-infecties in Nederland geschetst.

## Conclusie

GA-SDSE werd in deze studie tussen 2019 en 2021 in 2,4 procent van de GAS-infecties geïdentificeerd. Biochemische testen laten zien dat de GA-SDSE zich eerder als een *S. pyogenes* dan als een GCG-SDSE gedraagt, waardoor deze testen niet bijdragen aan de differentiatie tussen GA-SDSE en *S. pyogenes*. Het gebrek aan wetenschappelijke onderbouwing maakt dat er nog veel onduidelijk is over het voorkomen, de ziekte-ernst, de juiste behandeling van patiënten en eventuele profylaxe van huishoudcontacten bij infecties veroorzaakt door (GA-)SDSE. Zonder routinematige detectie op species- en groepsniveau missen we de data die noodzakelijk zijn om een geïnformeerd besluit te kunnen nemen bij de ontwikkeling van richtlijnen. Momenteel kan ongeveer de helft van de ondervraagde Nederlandse laboratoria GA-SDSE determineren via hun beschreven diagnostisch traject. We laten zien dat correcte determinatie veelal mogelijk is door de malditof te combineren met een lancefield-agglutinatietest. Deze determinatie, gecombineerd met klinische data kan onderzoek naar dit bijzondere pathogeen faciliteren.

## Dankbetuiging

We willen Agaath Arends-van 't Klooster, Ilse de Beer-Schuurman en Claudia Burger, analisten van het NRLBM, bedanken voor de dataverzameling en registratie van isolaten gebruikt in deze studie.

## Referenties

1. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:685-94.
2. RIVM. LCI Richtlijn Groep A-streptokokkeninfectie. 2012 22th November 2021; Available from: <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/groep-streptokokkeninfectie>.
3. Wajima T, Morozumi M, Hanada S, et al. Molecular Characterization of Invasive *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2016;22:247-54.
4. Rantala S, Vuopio-Varkila J, Vuento R, Huhtala H, Syrjanen J. Clinical presentations and epidemiology of beta-haemolytic streptococcal bacteraemia: a population-based study. *Clin Microbiol Infect.* 2009;15:286-8.
5. Ekelund K, Skinhoj P, Madsen J, Konradsen HB. Invasive group A, B, C and G streptococcal infections in Denmark 1999-2002: epidemiological and clinical aspects. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11:569-76.

## Edward Jenner, pionier in de vaccinatie tegen de pokken

Gro Vlaspolder

6. Couture-Cossette A, Carignan A, Mercier A, Desruisseaux C, Valiquette L, Pepin J. Secular trends in incidence of invasive beta-hemolytic streptococci and efficacy of adjunctive therapy in Quebec, Canada, 1996-2016. *PLoS One*. 2018;13: e0206289
7. Park JH, Jung J, Kim MJ, et al. Incidence, clinical characteristics, and outcomes of *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* bacteremia in a tertiary hospital: comparison with *S. agalactiae* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38:2253-8.
8. Sunaoshi K, Murayama SY, Adachi K, et al. Molecular emm genotyping and antibiotic susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from invasive and non-invasive infections. *J Med Microbiol*. 2010;59(Pt 1):82-8.
9. Loubinoux J, Plainvert C, Collobert G, et al. Adult invasive and noninvasive infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in France from 2006 to 2010. *J Clin Microbiol*. 2013; 51:2724-7.
10. Ishihara H, Ogura K, Miyoshi-Akiyama T, Nakamura M, Kaya H, Okamoto S. Prevalence and genomic characterization of Group A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* isolated from patients with invasive infections in Toyama prefecture, Japan. *Microbiol Immunol*. 2020;64:113-22.
11. Chochua S, Rivers J, Mathis S, et al. Emergent Invasive Group A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, United States, 2015-2018. *Emerg Infect Dis*. 2019;25:1543-7.
12. Oppegaard O, Mylvaganam H, Kittang BR. Beta-haemolytic group A, C and G streptococcal infections in Western Norway: a 15-year retrospective survey. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:171-8.
13. Liao CH, Liu LC, Huang YT, Teng LJ, Hsueh PR. Bacteremia caused by group G Streptococci, Taiwan. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:837-40.
14. Bruun T, Kittang BR, de Hoog BJ, et al. Necrotizing soft tissue infections caused by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* of groups C and G in western Norway. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19:E545-50.
15. Stichting Werkgroep Antibioticabeleid (SWAB). 2021 Mon, 27 Dec 2021 [cited 2021; SwabID version: 3.47.2.]; [Available from: <https://adult.nl/antibiotica.app/>].
16. ROSCO. Diatabs™ - diagnostic tablets for bacterial identification. [cited 2021 1 November];23-26]. Available from: [https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide\(2\).pdf](https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide(2).pdf).
17. Wyllie AL, Pannekoek Y, Bovenkerk S, et al. Sequencing of the variable region of rpsB to discriminate between *Streptococcus pneumoniae* and other streptococcal species. *Open Biol*. 2017;7.
18. Jensen CS, Dam-Nielsen C, Arpi M. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry identification of large colony beta-hemolytic streptococci containing Lancefield groups A, C, and G.

*Infect Dis (Lond)*. 2015;47:575-9.

19. Nybakken EJ, Oppegaard O, Gilhuus M, Jensen CS, Mylvaganam H. Identification of *Streptococcus dysgalactiae* using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry; refining the database for improved identification. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2021;99:115207.
20. Kotb M, Norrby-Teglund A, McGeer A, et al. An immunogenetic and molecular basis for differences in outcomes of invasive group A streptococcal infections. *Nat Med*. 2002;8:1398-404.
21. Hashikawa S, Iinuma Y, Furushita M, et al. Characterization of group C and G streptococcal strains that cause streptococcal toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol*. 2004;42:186-92.
22. Tsai CT, Chi CY, Ho CM, et al. Correlation of virulence genes to clinical manifestations and outcome in patients with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2014;47:462-8.
23. Leitner E, Zollner-Schwetz I, Zarfel G, et al. Prevalence of emm types and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in Austria. *Int J Med Microbiol*. 2015. 305:918-24.
24. Humar D, Datta V, Bast DJ, Beall B, De Azavedo JC, Nizet V. Streptolysin S and necrotizing infections produced by group G *Streptococcus*. *Lancet*. 2002;359:124-9.
25. Andreoni F, Zurcher C, Tarnutzer A, et al. Clindamycin Affects Group A Streptococcus Virulence Factors and Improves Clinical Outcome. *J Infect Dis*. 2017;215:269-277.
26. Babiker A, Li X, Lai YL, et al. Effectiveness of adjunctive clindamycin in beta-lactam antibiotic-treated patients with invasive beta-haemolytic streptococcal infections in US hospitals: a retrospective multicentre cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2021;21:697-710.
27. Davies HD, McGeer A, Schwartz B, et al. Invasive group A streptococcal infections in Ontario, Canada. Ontario Group A Streptococcal Study Group. *N Engl J Med*. 1996;335:547-54.
28. Robinson KA, Rothrock G, Phan Q, et al. Risk for severe group A streptococcal disease among patients' household contacts. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:443-7.
29. Smith A, Lamagni TL, Oliver I, Efstratiou A, George RC, Stuart JM. Invasive group A streptococcal disease: should close contacts routinely receive antibiotic prophylaxis? *Lancet Infect Dis*. 2005;5:494-500.
30. Baracco, GJ. Infections Caused by Group C and G *Streptococcus (Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* and Others): Epidemiological and Clinical Aspects. *Microbiol Spectr*. 2019; 7.

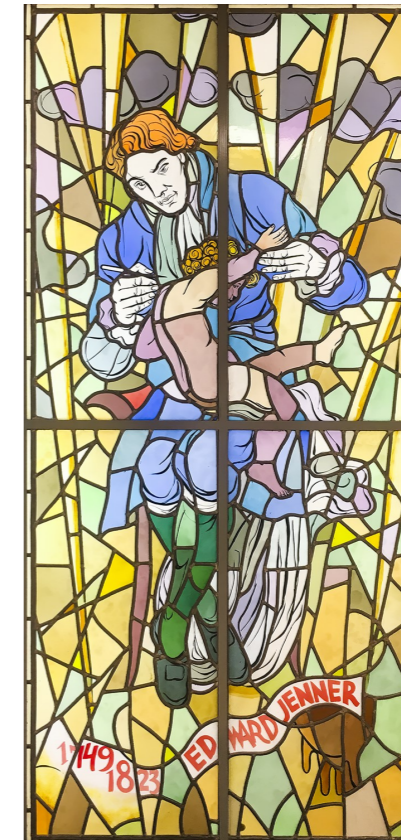
*“Ik zal nooit de pokken krijgen nadat ik de koepokken heb gehad. Nooit zal ik een afzichtelijk, pokdalig gezicht hebben.”*

Naar de overlevering hoorde de Britse plattelandsarts Edward Jenner (1749-1823) deze woorden van een melkmeisje. Dat melkmeisjes minder ontvankelijk waren voor de (mensen)pokken (*variola major*) was bekend [1].

In mei 1796 kwam Jenner in contact met het melkmeisje Sarah Nelmes, dat tijdens haar werk besmet was met koepokken. Jenner haalde wat vocht uit de koepokblaasjes op de armen van het melkmeisje en bracht dit over op de arm van een gezond achtjarig jongetje, James Phipps, de zoon van zijn tuinman. De jongen ontwikkelde milde klachten, die negen dagen na de procedure verbeterden. Ongeveer twee maanden later inoculeerde Jenner de jongen weer, maar deze keer met de pokstof van een verse mensenpoklaesie. De jongen werd niet ziek. Jenner entte vervolgens zijn zoon in met koepokken en ook hij bleek beschermd tegen de pokken [1].

Men wist dat bescherming voor ernstige ziekte kon worden verkregen door inenting. De techniek van variolatie, waarbij vocht uit pokkenblaasjes via een kleine, oppervlakkige incisie werd overgeënt op de te immuniseren persoon, was al circa 50 jaar in gebruik.

De actieve immunisatie van men-



sen door dierlijke pokstof en de verdere ontwikkeling tot ‘vaccin’, is volgens de geschiedenisboeken aan Edward Jenner te danken. Hij was echter niet de eerste die dergelijke experimenten en waarnemingen deed en teen werkzame preventiemethode ontwikkelde. Ongeveer 20 jaar voor Jenner’s experiment had Benjamin Jesty (1736-1816), een boer uit Dorset

[1,2], het vocht van koepokpustels in met een stopnaald aangebrachte krasjes op de armen van zijn vrouw en twee kinderen gewreven. Hoewel hij zijn bevindingen niet publiceerde, is op zijn grafsteen een eerbetoon te lezen.

Wat ook een grondslag geweest kan zijn voor effectieve pokkenvaccinatie was het succes van de Groningse Geert Reinders in de bestrijding van de veepest.

Geert Reinders, zoon van een korenmolenaar, was niet medisch onderlegd maar had wel gestudeerd; hij was boer op een boerderij bij Garnwerd. Bij toeval leerde Reinders professor Petrus Camper, hoogleraar aan de universiteit in Groningen, kennen toen Reinders in 1766 met hem in contact trad over een aan veeziekte gerelateerde publicatie.

Toen in 1768 de veepest heerste in het noordoosten van Nederland, werden de geneeskundig hoogleraren Petrus Camper en Wijnold Munniks door de burgemeester en de Raad van Groningen gevraagd om maatregelen te onderzoeken die de snelle verspreiding van deze ziekte kon indammen. Nadat meerdere proeven om veepest met inenting te bestrijden mislukten, riep Camper in 1769 de hulp van Reinders in. Deze kocht voor dit doel enkele koeien en begon verschillende proeven, met wisselend succes. Zijn conclusie



Figuur 1. Geert Reinders

was dat, wanneer hij een 'schoon dier' besmette met de entstof van een ziek dier, het 'schone dier' altijd ziek werd en dat dieren die de enting, of de daadwerkelijke ziekte hadden doorstaan, niet ziek werden van een volgende besmetting. Vier jaar later, in 1774 sloeg de runderpest wederom toe. Reinders hervatte zijn experimenten met entingen en deed een nieuwe ontdekking. Het viel hem op dat kalveren die geboren werden uit koeien die de ziekte hadden doorstaan - ofwel natuurlijk, ofwel door inenting - niet vatbaar waren voor deze ziekte, terwijl kalveren geboren uit koeien die niet in aanraking waren geweest met de ziekte, wel ziek werden. Wanneer hij een kalf geboren uit een koe die de ziekte had doorgemaakt inentte, werd het kalf niet ziek, ook niet wanneer het in contact kwam met zieke dieren.

In een open brief aan stadhouder Willem V en later ook aan

hoogleraren Camper en Munniks, deed Reinders verslag van zijn bevindingen. Professor Munniks noemde de ontdekking een 'bijna goddelijke bevinding' en zorgde ervoor dat de brief in het Engels werd vertaald. Petrus Camper gaf verhandelingen over de resultaten uit in Parijs en Berlijn, maar vermeldde de naam van Geert Reinders niet. Ondanks dat Reinders door het optreden van Camper geen bekendheid in het buitenland heeft genoten, kreeg hij in het binnenland gelukkig wel erkenning voor zijn werk [3,4,5].

Mogelijk zijn de bevindingen van Geert Reinders onder de aandacht van Jenner gekomen en hebben ze hem ertoe gebracht zijn experimenten met koepokken uit te voeren. Jenner schreef zijn resultaten van de koepokvaccinatie-experimenten op James Phipps op in een verhandeling en stuurde dit in 1797 aan de *Royal Society van Londen*. Het werd ontvangen met scepsis. Ondanks dat Jenner al was verkozen tot Vakgenoot van de Royal Society voor eerder werk, werd zijn verhandeling aangevoerd. Het jaar daarna, ondersteund met meer casus en bewijs voor zijn theorie, publiceerde Jenner op eigen naam een verhandeling genaamd '*An Inquiry into the Causes and Effects of Variola Vaccinae, a Disease, Discovered in some of the Western Counties of England, particularly Gloucestershire, and Known by the Name of The Cow Pox.*'

Het bestond uit drie delen: het eerste deel behandelde de hypothese dat een infectie met koepokken beschermde tegen een daaropvolgende infectie met de mensenpokken. Het tweede deel bestond uit de kritische observaties

die hij had gedaan om de hypothese te testen. Het derde deel bestond uit een lange discussie over de bevindingen en verschillende onderwerpen met betrekking tot de *variola major* [1].

Strikt gesproken was Edward Jenner niet degene die de vaccinatie heeft ontdekt, maar het staat buiten kijf dat hij de eerste persoon was die ervoor heeft gezorgd dat de procedure een wetenschappelijke status kreeg en ertoe aanzette dat hier verder wetenschappelijk onderzoek naar werd verricht. Ondanks dat de resultaten van Jenners onderzoek met gemengde reacties werden ontvangen in de medische wereld, nam de invoering van de vaccinatie daarna wereldwijd een enorme vlucht en zijn er nog veel inzichten geweest op het gebied van vaccinatie, virussen, transmissie en immunologie die de theorieën van Jenner ondersteunden [1]. De benaming 'vaccinatie', afgeleid van het Latijnse woord 'vacca' (koe), werd later door Louis Pasteur gegeven, als eerbetoon aan de bevindingen van Jenner [2], met als mooie bijkomstigheid dat dit een terechte verwijzing is naar de waardevolle experimenten die Reinders 20 jaar eerder deed.

### Referenties

1. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. BUMC proceedings 2005;18: 21-25.
2. Dobson M. Murderous contagion. A human history of disease. Chapter Smallpox 277-279. 2015.
3. Tilbusscher J. 1917 Geert Reinders de bestrijder van de veepest. /www.zuurdiek.nl/
4. Dijksterhuis P. Geert Reinders de gelukkige bestrijder van de veepest. /www.zuurdiek.nl/
5. Leden van Veterinair Historisch Genootschap. Voorgangers: dierenartsen uit vroeger tijd. Geert Reinders (1737 - 1815). /www.veterinaryhistory.nl/

## PROMOTIES & ORATIES

### PROMOTIES

#### 12 januari 2022 - M. Mulder

Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Community-Acquired Urinary Tract Infections

Promotoren: prof. dr. B.H.Ch. Stricker en prof. dr. A. Verbon  
Erasmus MC Rotterdam, afd. Klinische epidemiologie en afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten

#### 6 april 2022 - L.P. Schüle

Application of Next-Generation Sequencing in Microbiology

Promotoren: prof. dr. J.W.A. Rossen en prof. dr. A.L.W. Friedrich  
Copromotoren: dr. S. Peter en dr. N. Monge Gomes do Couto  
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

#### 20 april 2022 - L. Wang

On the role of fats and soaps in the establishment of infant gut microbiota: the case of *Faecalibacterium prausnitzii*

Promotoren: dr. ir. H.J.M. Harmsen en prof. dr. J.M. van Dijk  
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

#### 17 mei 2022 - D.E. Foudraine

Using High-Resolution Mass Spectrometry to Determine Antimicrobial Resistance in *E. coli* and *K. pneumoniae*

Promotor: prof. dr. A. Verbon  
Copromotoren: dr. W.H.F. Goessens en dr. T.M. Luider  
Erasmus MC Rotterdam, afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten

#### 23 mei 2022 - N. Peker

Exploring Next-Generation Sequencing in Clinical Microbiology

Promotoren: prof. dr. dr. B.N.M. Sinha en prof. dr. J.W.A. Rossen  
Copromotor: dr. N. Monge Gomes do Couto  
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

#### 30 mei 2022 - R. Poelman

Diagnostic stewardship: pushing boundaries with clinical virology diagnostics

Promotoren: prof. dr. H.G.M. Niesters en prof. dr. A.W. Friedrich  
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie

#### 7 juni 2022 - E. Huijser

Type I Interferons in Primary Sjögren's Syndrome: Assays and pathophysiological mechanisms

Promotor: dr. M.A. Versnel  
Copromotor: dr. W.A. Dik  
Erasmus MC Rotterdam, afd. Immunologie

#### 14 juni 2022 - S.E. Leonhard

Infections and the Guillain-Barré Syndrome - from endemic to pandemic

Promotoren: prof. dr. B.C. Jacobs en prof. dr. H.J. Willison  
Erasmus MC Rotterdam, afd. Neurologie.  
University of Glasgow



ONLINE MASTERCLASS 4 JULI | 20:00 - 21:00

UITNODIGING

# SNELLE MOLECULAIRE TEST OPLOSSINGEN VAN LAB TOT DIVERSE POC SETTINGS

3 EXPERTS OVER HUN ERVARINGEN

Ontdek de kracht van point of care voor COVID-19 testen



## KEYNOTE SPEAKERS & TOPICS ONLINE MASTERCLASS



### DR. JAYANT KALPOE

Arts-microbioloog Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Kennemerland

VAN INFLUENZA TEST IN HET LAB EN POC IN HET ZIEKENHUIS  
TOT COVID-19 TEST IN HET VERZORGINGSHUIS. ERVARINGEN  
MET EEN PLATFORM VOOR SNELLE MOLECULAIRE TESTEN



### DR. MICHIEL VAN RIJN

Arts-microbioloog IKAZIA ziekenhuis

HET GEBRUIK VAN EEN SNEL MOLECULAIR PLATFORM  
VOOR HET TESTEN VAN ZIEKENHUISPERSONEEL:  
VAN UITDAGING TOT STANDAARD WORKFLOW



### DR. KITTY LINSSEN

Arts-microbioloog Zuyderland Ziekenhuis

SNELLE COVID-19 SCREENING OP DE EERSTE HULP  
MET ID NOW: NUTTIG OF HINDERLIJK?

U KUNT ZICH INSCHRIJVEN OP [MASTERCLASSIDNOW.NL](https://masterclassidnow.nl)  
OF VIA DE QR CODE

INSCHRIJVEN →



Deze masterclass wordt mede mogelijk gemaakt door Abbott

©2022 Abbott. All rights reserved.

All trademarks referenced are trademarks of either the Abbott group of companies or their respective owners. Any photos displayed are for illustrative purposes only.