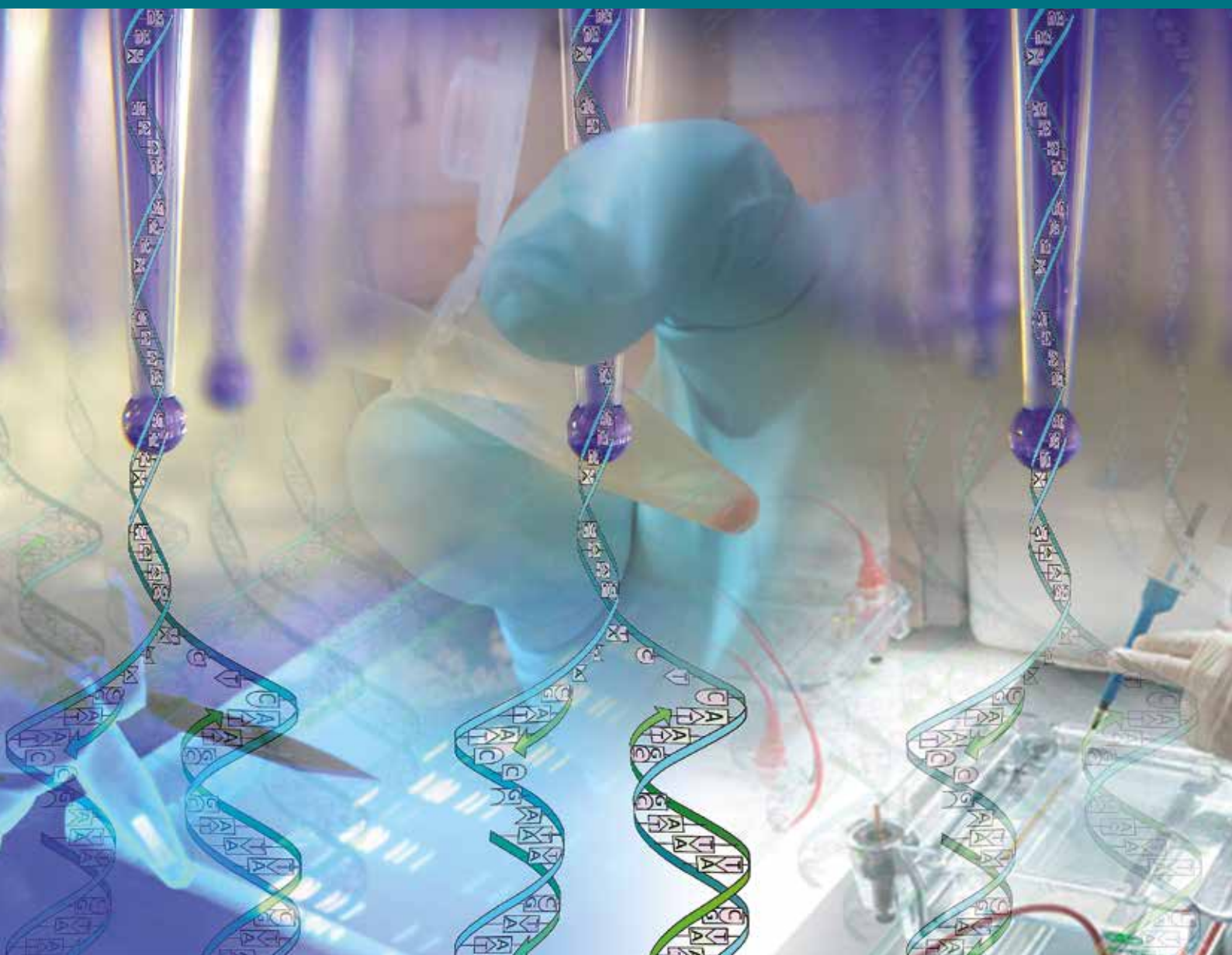


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie

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

NVMM-secretariaat

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

Hoofredactie

Dr. Esther Heikens, dr. Bert Mulder

Redactie

Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg, J.M. van Hattem, mw. N. Hanemaaijer, dr. J.J. van Hellemond, mw. M. Jager, J.A. Kaan, dr. J.S. Kalpoe, dr. B. Meek, dr. M. van Rijn, mw. A.T.R. Tholen, dr. H.F.L. Wertheim, dr. R. te Witt

Redactiesecretariaat

Van Zuiden Communications B.V.
mw. drs. R.B. Mouton-Verschoor
Tel. (0172) 476191, e-mail:
mouton@vanzuidencommunications.nl

Advertentie-exploitatie

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

Oplage en frequentie

900 exemplaren, 4 x per jaar

Abonnementen

Gratis voor leden van de NVMM en leden van de VIZ.
Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 70,- per jaar
Buiten Nederland, in Europa: € 99,- per jaar
Losse nummers: € 17,50
Opgave abonnementen:
Tel. (0172) 47 61 91



© 2016, Van Zuiden Communications B.V.

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

Algemene voorwaarden

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

ISSN 0929-0176

Inhoud

Van de redactie

- Moleculaire diagnostiek van infectieziekten: 'snel, goed en steeds goedkoper' 158
E.R. Heddema, R. te Witt

Thema: moleculaire diagnostiek

- Vrienden voor het leven: microbiota van de mens 159
E.M. Bik

- 'Search and control'-strategie voor inperking van bijzonder resistente micro-organismen 164
A. van der Zee, J.M. Ossewaarde

- Toepassingen van next generation sequencing voor klinische microbiologie en infectiepreventie 170
R.H. Deurenberg, S. Rosema, G.C. Raangs, A.W. Friedrich, J.W.A. Rossen

- Point-of-care-testen in de moleculaire diagnostiek van infectieziekten 177
A. van Belkum, E.C.J. Claas

Artikel

- Het influenzaseizoen 2015/2016 in Nederland: beheerst door influenza A(H1N1)pdm09- en B/Victoria/2/87-lijn-virussen 181
J.C. de Jong, A. Meijer, G.A. Donker, W. van der Hoek, M.M.A. de Lange, G.F. Rimmelzwaan, M.P.G. Koopmans

Boekbespreking

- Infecties op de intensive care 188
D. Ong, P. Klein Klouwenberg

Verenigingsnieuws

- Abstracts Najaarsvergadering NVMM / VIZ 2016 189

Promoties

- 191

Cursusaankondiging

- 191

Toelichting bij coverbeeld: als je iemand vraagt: "waar denk je aan bij moleculaire diagnostiek?" dan is het antwoord steevast: DNA. Hetzij DNA-replicatie (PCR) – eigenlijk de centrale afbeelding –, elektroforese en/of het verder opwerken van dit elektroforese product. Cover: Hans den Boer en Loes van Damme, Erasmus MC, afdeling medische Microbiologie & Infectieziekten, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam.

Moleculaire diagnostiek van infectieziekten: ‘snel, goed en steeds goedkoper’

Dit themanummer van het NTMM is, voor het eerst, volledig gewijd aan moleculaire diagnostiek. Moleculaire diagnostiek is al meer dan twee decennia een vast onderdeel van het geheel aan diagnostische mogelijkheden binnen de medische microbiologie. Het afgelopen decennium is het aantal moleculaire testen dat in een microbiologisch laboratorium wordt aangevraagd sterk toegenomen. Dit zijn vooral op amplificatie gebaseerde testen, zoals PCR-testen. Omdat er al jaren veel geschreven wordt over dit soort testen, leek het ons niet zo interessant om deze verandering te evalueren, maar juist wel om stil te staan bij enkele ontwikkelingen waar wij veel van verwachten.

Toen we als gastredacteuren – een arts-microbioloog en een medisch moleculair microbioloog – over de inhoud gingen nadenken, kwamen we snel uit op een groot aantal onderwerpen die ons allebei boeiden. De technische ontwikkelingen waarbij genomische informatie met behulp van steeds kleinere, snellere en goedkopere apparatuur verkregen kan worden is spannend. De technieken worden steeds beter. Het is mogelijk om op je keukentafel een volledig bacterieel genoom binnen enkele uren te sequensen. De analyse van deze data en de toepassing is nog niet volledig duidelijk, maar de mogelijkheden zijn er al. Om de nabije ‘moleculaire’ toekomst qua technische mogelijkheden te kunnen inschatten, is misschien een vergelijking met meer gangbare apparaten zoals smartphones en USB-sticks een indicatie voor de snelheid waarmee deze ontwikkelingen nu plaatsvinden. De prijsdaling en toename van opslagcapaciteit en mogelijkheden van deze apparaten is enorm snel gegaan.¹ We verwachten ook veel van de moleculaire betrokkenheid bij de toenemende resistentieproblematiek, alsook de mogelijk toekomstige klinische toepassingen van microbiom-onderzoek. De vraag is of deze ontwikkelingen de komende jaren in alle laboratoria zullen worden geïmplementeerd (of niet). Het lijkt erop dat de interactie tussen arts-microbioloog en medisch moleculair microbioloog intensiever dan ooit zal worden.

Het lijkt bijna onmogelijk om iets te maken wat *snel*, *goed* en ook nog *goedkoop* is. Toch kwamen deze termen naar boven toen we nadachten over de toekomstige ontwikkelingen. Snelheid (*snel*) wordt besproken door Van Belkum en Claas (‘point-of-care’-testen). De toepassing van deze relatief nieuwe vorm van diagnostiek lijkt niet altijd eenvoudig. Kosten, baten en kwaliteitsborging zijn de voornaamste punten die in dit stuk worden behandeld.

Snel wordt ook door Van der Zee en Ossewaarde besproken in hun artikel over het versnellen van detectie van bijzonder resistente micro-organismen (BRMO). In het Maasstad Ziekenhuis in Rotterdam is een actief surveillancesysteem opgezet voor detectie van BRMO's, waardoor de kwaliteit (*goed*) van diagnostiek en zorg wordt verhoogd. Analyse van gekweekte micro-organismen of direct op klinische monsters met behulp van ‘next generation sequencing’ (NGS)-technieken door Deurenberg et al. geeft ons meer inzicht in het ziekmakend vermogen van micro-organismen. Resistentiegenen en virulentiegenen kunnen worden geanalyseerd en de data kunnen worden gebruikt voor epidemiologische doeleinden. NGS-technieken hebben al veel toegevoegd aan basaal en klinisch toegepast onderzoek. De mogelijkheden zijn enorm, maar toepassing in de kliniek wordt nog belemmerd door praktische zaken, zoals het distilleren van de relevante klinische markers uit het geheel aan gegenereerde data, maar ook door gebrek aan validatie voor klinisch-diagnostisch gebruik.

Genetische analyse van het menselijk microbiom komt door daling van kosten en gebruiksgemak (*goedkoper*) van de benodigde apparatuur steeds meer binnen bereik van diagnostische laboratoria. Collega Bik geeft ons onder de titel *Vrienden voor het leven* een overzicht van de hiervoor gebruikte technieken, de nieuwste inzichten en mogelijk diagnostische en therapeutische toepassingen die hieruit voortvloeien voor de (nabije) toekomst. Het concept van één pathogeen behorend bij één ziekte heeft misschien zijn langste tijd wel gehad! Waarom kan het ene pathogeen floreren en een microbieel ecosysteem volledig verstoren? De rol van de microben die de ziekte schijnbaar *niet* veroorzaken, is minstens zo interessant als die van degene die wel als oorzaak wordt gezien.

Kortom: heel *goed* om *snel* kennis van te nemen in ons *open-access* tijdschrift!

Edou Heddema & René te Witt

Dr. E.R. Heddema, arts-microbioloog, Zuyderland Medisch Centrum, locatie Sittard-Geleen, e.heddema@zuyderland.nl
Dr. R. te Witt, medisch moleculair microbioloog, NMDL, renetewitt@planet.nl

Referentie

1. <https://hblok.net/blog/storage/> [geraadpleegd oktober 2016]

Vrienden voor het leven: microbiota van de mens

E.M. Bik

Samenvatting

Het menselijk lichaam biedt onderdak aan grote aantallen bacteriën en andere microben, die gezamenlijk het microbiom of microbiota genoemd worden en belangrijke functies hebben voor onder andere de spijsvertering en het immuunsysteem. Recente innovaties in sequencing-technieken en bio-informatica hebben geleid tot een spectaculaire toename in studies van de menselijke microbiom, met name in de darmen. Dit artikel geeft een kort overzicht van de technieken die gebruikt worden in het microbiomonderzoek en zet nieuwe inzichten in deze tot voor kort onzichtbare wereld uiteen. Ook komen mogelijke diagnostische en therapeutische toepassingen aan bod.

Abstract

The human body is host to large numbers of bacteria and other microbes, collectively called the microbiome or microbiota, which have important functions for digestion and the immune system. Recent innovations in sequencing techniques and bioinformatics have led to a spectacular increase in the number of studies of the human microbiome, in particular that of the gut. This paper provides a short overview of the techniques used for microbiome research and novel insights in this previously invisible world. It also provides possible diagnostic and therapeutic applications.

Trefwoorden

Microbiom, microbiota, darmbacteriën, voeding

Inleiding

Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723) was mogelijk de eerste mens die bacteriën zag. Met zijn zelfgebouwde, eenvoudige, maar zeer effectieve microscopen bestudeerde hij allerlei objecten zoals huidschilders, haren, insecten, bloed en moeraswater. In brieven aan de Royal Society of London beschreef hij zijn observaties, zoals minuscule “diertgens” in put- en grachtwater.¹ In 1683 schreef Van Leeuwenhoek opnieuw een brief naar de Royal Society. Hoewel hij zijn mond altijd goed schoonmaakte met zout en een lapje stof, had hij wat tandplak tussen zijn kiezen gezien en dat materiaal onder zijn zelfgebouwde

microscoop gelegd. Ook daar zag hij honderden kleine “beestjes”. Zijn tekeningen en beschrijvingen van deze mondbacteriën vormen vermoedelijk de ontdekking van de microben die in ons lichaam leven.¹

In de drie eeuwen die daarop volgden bloeide de microbiologie op, voornamelijk op het gebied van pathogenen. De meeste bacteriën en virussen werden als ziekteverwekkers beschouwd, een logische aanname gezien de hoge prevalentie van ziekten als cholera, tuberculose, pokken en kinkhoest. Met de komst van vaccins en antibiotica werden deze infectieziekten in de twintigste eeuw flink teruggedrongen en kon de microbiologie zich ook richten op het bestuderen van de microben in en op het menselijke lichaam.

Inmiddels weten we dat ons lichaam onderdak biedt aan complexe gemeenschappen van microben die leven op onze huid, in de mond, maag en in onze darmen. Deze microbiële consortia bestaan uit bacteriën, archaea, protozoa en schimmelsoorten, die gezamenlijk de menselijke microbiota (alle aanwezige micro-organismen) of het menselijk microbiom (alle aanwezige micro-organismen en hun genomen) genoemd worden.² Een individueel persoon huisvest honderden tot duizenden verschillende microbesoorten, voornamelijk bacteriën, en de meeste van die microben leven in de dikke darm. Een veel gebruikte maar inmiddels achterhaalde statistiek beweert dat ons lichaam tien keer meer microbiële cellen dan menselijke cellen bevat. In een recente publicatie zijn deze berekeningen overgedaan en er wordt nu geschat dat het aantal microben in en op het menselijk lichaam ongeveer gelijk is aan het aantal lichaamscellen, namelijk 4×10^{13} .³

Mensen zijn niet de enige habitat van complexe microbiële gemeenschappen. Microben zijn overal. Bijna alle levende organismen, plant of dier, leven in associatie met microben. Bovendien worden microbiële gemeenschappen

E.M. Bik, Science Editor bij uBiome, 180 Steuart St #194165, San Francisco, CA 94105, USA. Correspondentieadres: tel.: +1 415-842-2466; e-mail: eliesbik@ubiome.com

gevonden in een uitgebreide diversiteit van omgevingen, zoals in grond, zeewater, gletsjerijs en op allerlei oppervlaktes binnenshuis.

Technische ontwikkelingen

In de afgelopen twintig jaar zijn de DNA-amplificatie- en sequentietechnieken spectaculair verbeterd. Dit heeft geleid tot een groot aantal studies van microbiële gemeenschappen.² Veel van deze studies maken gebruik van de unieke eigenschappen van het 16S rRNA-gen, dat codeert voor het RNA dat onderdeel vormt van de kleine ribosomale subunit.⁴ Ribosomen zijn onderdeel van alle levende organismen en rRNA-genen komen dan ook in elk bacterieel genoom voor. Het 16S rRNA-gen heeft een unieke 'mozaïekstructuur' met zowel geconserveerde als variabele gebieden. De geconserveerde domeinen kunnen gebruikt worden voor het ontwerp van universele primers die op bijna elk bacteriegenoom passen, terwijl de tussenliggende variabele domeinen (V1 tot en met V9) uniek zijn per bacteriesoort en dus gebruikt kunnen worden voor identificatie en typering.

De nieuwe moleculaire technieken maakten het mogelijk om microbiële diversiteit van allerlei soorten monsters te bestuderen zonder afhankelijk te zijn van kweek. Dit leidde tot de ontdekking van veel onbekende bacteriële phyla en inmiddels zijn er miljoenen bacteriële en archaea-sequenties gepubliceerd.⁵

Daarnaast is het inmiddels mogelijk om het volledige genomische DNA in een monster te sequencen, zodat alle genen in een complexe gemeenschap en hun mogelijke functies bestudeerd kunnen worden (metagenomics). Ten slotte verschaffen allerlei andere innovaties op het gebied van transcriptomics, proteomics en metabolomics nieuwe inzichten in de expressie van al die genen onder bepaalde omstandigheden.⁶ Naast de innovaties op het terrein van DNA-extractie en -sequencing, is er ook geweldige vooruitgang geboekt in de bio-informatica om de enorme hoeveelheid data die met deze technieken wordt gegenereerd te kunnen analyseren.

Samenstelling van het menselijke microbiom

De nieuwe technieken maakten het mogelijk om de complexe microbiota van het menselijk lichaam te analyseren. De menselijke microbiële consortia bleken te verschillen per anatomische site, maar ook per individu en tijd.^{7,8} In 2008 werden twee grootschalige microbiota-onderzoeken opgestart. Het Europese MetaHit-consortium richtte zich op de metagenomische analyse van feces,⁹ terwijl het Amerikaanse Human Microbiome Project meerdere lichaamsdelen onderzocht.¹⁰ Twee recente grote Nederlands-Belgische studies toonden een grote invloed van voeding en medicijngebruik aan op de samenstelling van ons darmmicrobiom.^{11,12} Deze projecten hebben onze kennis over de identiteit en

functies van de microbiële bewoners van het menselijke lichaam enorm uitgebreid.

In den beginne: kolonisatie begint bij de geboorte

De microbiële kolonisatie van ons lichaam begint bij de geboorte en is min of meer compleet rond het derde of vierde levensjaar.¹³ Hoe dit kolonisatieproces in zijn werk gaat, hangt deels af van het type bevalling. Bij een natuurlijke bevalling komt de baby als eerste in aanraking met vaginale en rectale bacteriën van de moeder, terwijl bij een keizersnede dat voornamelijk huidbacteriën zijn. Door deze nieuwe inzichten smeren inmiddels sommige ouders hun nieuwgeborenen in met de vaginale microbiota van de moeder.¹⁴ Ook hoe baby's in de eerste paar maanden gevoed worden, is bepalend voor het ontwikkelen van hun darmmicrobiom. Moedermelk bevat bacteriën, terwijl kunstmatige melk steriel is. Baby's die met een keizersnede geboren worden of met kunstmatige melk gevoed, volgen daardoor mogelijk een verstoord kolonisatiepatroon met een iets hoger risico voor astma, allergische aandoeningen en zwaarlijvigheid op latere leeftijd.¹⁵ Andere factoren die bepalend zijn in de ontwikkeling van het microbiom tijdens de kindertijd, zijn de aanwezigheid van broers, zussen of huisdieren en de compositie van de microbiota van andere gezinsleden.¹⁶ Kinderen die opgroeien met een hond of op een boerderij, hebben minder kans op het ontwikkelen van astma.¹⁷ Dit lijkt een bevestiging van de 'hygiënehypothese', die stelt dat blootstelling aan bacteriën in de vroege kindertijd noodzakelijk is voor de ontwikkeling van het immuunsysteem en een hogere tolerantie voor omgevingsantigenen.

Functies van het microbiom

De microben in ons lichaam en in het bijzonder die in de darm, zijn van groot belang voor onze gezondheid. De gezamenlijke genen van onze darmbacteriën zijn goedbeschouwd een functionele uitbreiding van ons eigen genoom. Het menselijke darmmicrobiom bevat 150 keer meer genen dan het menselijke genoom, die coderen voor een groot assortiment aan enzymen die we zelf niet kunnen maken.⁹ Een belangrijke functie van de darmmicrobiota is de vertering van voedingsstoffen die we zelf niet kunnen afbreken. De meeste plantaardige koolhydraten en vezels kunnen niet in de dunne darm verteerd worden en komen onverteerd in de dikke darm terecht, waar ze door onze darmbacteriën gefermenteerd worden. De aanwezigheid van een darmmicrobiota stelt een zoogdier daardoor in staat om meer energie uit voedsel te onttrekken. Kiemvrije muizen, geboren en getogen in steriele incubators, eten 30 procent meer voedsel, maar blijven dunner dan muizen met een conventioneel microbiom.¹⁸

Naast het verteren en fermenteren van complexe koolhydraten en vezels, is de darmmicrobiota betrokken bij de productie van kortketenige vetzuren (o.a.

butyraat), vetmetabolisme, de correcte ontwikkeling van anatomische structuren in de dikke darm, besturen van het immuunsysteem, vitaminesynthese en het bezetten van lege plekken in de darm zodat pathogenen niet kunnen koloniseren.^{8-10,19} Er wordt ook steeds meer bewijs gevonden voor het bestaan van wederzijdse communicatieroutes tussen de darmmicrobiota en het centraal zenuwstelsel, de zogenaamde 'Brain-Gut Axis', waarbij er zelfs aanwijzingen zijn dat darmbacteriën een effect hebben op gedrag en humeur van hun gastheer.²⁰ Zo nemen kiemvrije muizen meer risico's dan gekoloniseerde muizen, maar hebben ze ook een minder goed geheugen. Het is vooralsnog onduidelijk of dergelijke verbanden tussen microbiota en het brein ook van belang zijn bij het gedrag van de mens.

Omdat onze darmbacteriën eigenlijk kleine chemische fabriekjes zijn met een uitgebreid arsenaal aan genen, kunnen ze ook allerlei chemische stoffen afbreken of modificeren. Ook geneesmiddelen zoals cytostatica en hartmedicatie kunnen door de darmmicrobiota worden geactiveerd of gedeactiveerd. Verschillende personen kunnen daardoor heel verschillend reageren op dezelfde medicijnen en een hogere of lagere dosis nodig hebben, afhankelijk van welke darmbacteriën ze bij zich dragen.²¹

Microbiota en voeding

Het menselijke darmmicrobioom is over het algemeen redelijk stabiel. In een studie waarin vrijwilligers gedurende lange tijd hun feces verzamelden, bleek de darmmicrobiota min of meer constant, behalve tijdens een verandering in dieet, bij buikgriep of een internationale reis.^{22,23} Recente studies naar de samenstelling van de ontlasting van niet-westerse mensen in traditionele gemeenschappen in Afrika en Zuid-Amerika toonden een grote invloed van levensstijl en voeding op het menselijke darmmicrobioom, waarbij jager-verzamelaars, traditionele landbouwers en stedelijk-industriële bevolking sterk verschillende microbiomen hadden.^{13,24-26} De darmmicrobiota van jagers-verzamelaars bevatte de hoogste bacteriële diversiteit van deze drie soorten groepen. Dit hangt zeer waarschijnlijk samen met de enorme hoeveelheid vezels die deze traditioneel-levende groepen consumeren; tien keer meer dan de gemiddelde Amerikanen en Europeanen. Deze hypothese wordt ondersteund door dierproeven waarin muizengeneraties die weinig vezels te eten kregen een progressief verlies van darmmicrobiota-diversiteit vertoonden.²⁷ Deze nieuwe inzichten kunnen helpen met het ontwikkelen van nieuwe therapieën om de microbiële diversiteit in westerse darmen te verhogen en mogelijk metabole ziekten zoals obesitas en diabetes te verminderen.

Onbedoelde bijwerkingen van antibiotica

Bij ernstige infecties kunnen antibiotica levensreddend zijn, maar ze hebben ook onbedoelde bijwerkingen op onze

microbiota. De meeste antibiotica zijn breed spectrum. Ze maken helaas geen onderscheid tussen pathogenen en de goedaardige bacteriën in ons lichaam. Veel standaard antibioticumkuren hebben een groot effect op het aantal bacteriesoorten in onze darmen, vaak zonder dat de patiënt het doorheeft. Herstel na het stoppen van de kuur is vaak onvolledig, zelfs enkele maanden na het stoppen van de kuur.^{28,29} De mondmicrobiota lijkt veel minder gevoelig voor deze verstoring dan de darmmicrobiota.²⁸

Daarnaast is uit dierproeven gebleken dat herhaaldelijke antibioticumbehandelingen voornamelijk bij jonge dieren resulteren in een blijvend verstoorde microbiota³⁰ en dat obesitas overdraagbaar is door het transplanteren van menselijke darmbacteriën in kiemvrije muizen.³¹ Dit heeft geleid tot de hypothese dat herhaaldelijke antibioticumbehandelingen in de kindertijd kunnen leiden tot een darmmicrobiota met minder bacteriesoorten.³² Een Amerikaans kind van drie jaar oud heeft gemiddeld al drie tot zes antibioticakuren gekregen, precies in de periode dat hun microbiom zich ontwikkelt. Hoewel dit aantal in Nederland lager ligt, staan het herhaaldelijk voorschrijven van antibiotica aan kinderen en de resulterende verminderde diversiteit van de darmmicrobiota mogelijk in verband tot de verhoogde prevalentie van overgewicht en diabetes in de westerse wereld. Ook hier zouden deze recente bevindingen kunnen leiden tot nieuwe klinische praktijken, zoals het terughoudend voorschrijven van antibiotica, het nog verder terugdringen van antibiotica in de veehouderij en mogelijk het aanvullen van de darmmicrobiota met probiotica.³²

Clostridium difficile-infecties en fecestransplantaties

Een van de grote succesverhalen van microbiomonderzoek is de toepassing van fecestransplantaties voor het behandelen van patiënten met *Clostridium difficile*-infecties (CDI). *C. difficile* is een sporenvormende en toxine-producerende bacterie die in geringe aantallen voorkomt in de darm bij ongeveer 10 procent van de gezonde populatie, maar in een hoger percentage bij ziekenhuis- en verpleegtehuispatiënten. Een antibiotica-kuur kan leiden tot een verstoring van het evenwicht in de darmmicrobiota, waarbij *C. difficile*, die relatief ongevoelig is voor de meeste antibiotica, ineens kan uitgroeien tot grote aantallen met diarree, buikpijn en koorts tot gevolg. In de Verenigde Staten veroorzaakt CDI bijna een half miljoen gevallen en 30.000 sterfgevallen per jaar.³³ Tot voor kort waren de behandelingsopties beperkt, met specifieke antibiotica zoals vancomycine of in uiterste gevallen resectie van een deel van het colon. Recidiverende infecties komen veel voor. Uit onderzoek van het AMC bleek echter dat fecestransplantaties met de ontlasting van een gezonde donor zeer succesvol zijn voor CDI-patiënten. Na een eerste transplantatie was het genezingspercentage al meer dan 80 procent en na een eventuele tweede poging steeg dat

percentage tot 94 procent.^{34,35} Fecustransplantaties zijn daarmee een aantrekkelijk alternatief geworden voor de behandeling van CDI en mogelijk ook voor veel andere darmziekten. Hoewel het percentage complicaties van fecustransplantaties klein is, bestaat er een risico op de overdracht van pathogene virussen of bacteriën, of de aspiratie van fecaal materiaal.³⁶

Inflammatoire darmziekten

Inflammatoire darmziekten (IBD) zoals de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa zijn lastig te behandelen ontstekingen van de darm met een onduidelijke oorzaak en een grillig verloop. Naast een genetische component zijn er ook aanwijzingen voor een rol van de darmmicrobiota. De darmmicrobiota bij IBD is enigszins anders dan die van gezonde mensen, met een lagere bacteriële diversiteit en een veranderde ratio van specifieke bacteriële groepen.³⁷ Het blijft echter onduidelijk of deze dysbiose de oorzaak is van het klinisch beeld, of juist het resultaat van langdurige ontstekingen, medicijngebruik of veranderingen in het dieet. Ondanks vele publicaties en studies is er tot nu toe geen duidelijke microbiële pathogeen gevonden. Door onder andere het succes van fecustransplantaties bij CDI-patiënten is het herstel van de microbiële diversiteit in de darm een interessante nieuwe therapieoptie geworden, maar behandeling met fecustransplantaties of probiotica-supplementen hebben tot nu toe nog geen hoge slagingspercentages voor IBD-patiënten laten zien.³⁷

Autisme

Autisme is een verzamelnaam voor verschillende ontwikkelingsstoornissen met beperkingen op het gebied van sociale interactie en met weinig behandelingsopties. Vergeleken met gezonde kinderen hebben autistische kinderen meer darmproblemen, zoals diarree of constipatie. Daardoor is er veel belangstelling voor een mogelijke rol van de microbiota in deze ziekte.²⁰ Studies naar de darmmicrobiota van individuen met autisme lijken elkaar helaas tegen te spreken en hebben tot nu toe geen duidelijke verschillen ten opzichte van gezonde mensen aan het licht gebracht.³⁸ Mogelijk wordt een deel van de afwijkende microbiota in autisme veroorzaakt door bepaalde gedragsproblemen bij deze patiënten, waaronder vaak een sterke afkeer van groentes en fruit en een voorkeur voor zetmeelrijke voedingsmiddelen. Autistische individuen missen daardoor mogelijk bepaalde voedingsstoffen, zoals vezels. Dat is mogelijk de oorzaak voor de verschillen in hun darmbacteriën die in sommige studies gevonden worden. Net zoals bij IBD is het daarom lastig om oorzaak en gevolg te onderscheiden. Hoewel de relatie tussen autisme en darmbacteriën dus nog steeds onduidelijk is en nog niet tot klinische behandelingsopties heeft geleid, worden prebiotica, probiotica en sinds kort ook

fecustransplantaties steeds populairder als 'zelfmedicatie' bij (de ouders van) individuen met autisme.³⁸

Nieuwe inzichten

Naast het toenemende besef dat darmbacteriën goed voor onze gezondheid zijn, beginnen we ook te beseffen dat we te schoon leven. Vergeleken met de huidige traditionele jagers-verzamelaars, wiens levensomstandigheden waarschijnlijk erg lijken op die van onze voorouders, brengt onze westerse levensstijl ons veel minder in contact met microben. Baby's worden vaker via een keizersnede geboren of gevoed met steriele melk, kinderen groeien op met minder broertjes en zusjes en spelen veel minder in de zandbak of op straat. Ons voedsel en drinkwater zijn bijna steriel, we komen nauwelijks in aanraking met aarde, planten of dieren, we krijgen regelmatig antibiotica, veel zepen en shampoos bevatten triclosan en antibacteriële doekjes of UV-houders om tandenborstels of telefoons te desinfecteren worden steeds populairder. Al deze factoren, in combinatie met het eten van weinig vezels, dragen er waarschijnlijk toe bij dat onze darmmicrobiota uit veel minder bacteriesoorten bestaat dan die van traditioneellevende gemeenschappen. Aangezien ons microbioom betrokken is bij vele processen in ons lichaam, waaronder de aanleg en aansturing van het immuunsysteem, staat het toegenomen gebruik van antibiotica, de afgenomen inname van vezels en de verminderde blootstelling aan bacteriën op jonge leeftijd mogelijk in verband met de toename van vele metabolische, allergische en inflammatoire darmaandoeningen.³² Uiteraard willen we niet terug naar de Middeleeuwen, waar infectieziekten de helft van de bevolking van een continent konden doden. Vaccinaties zijn belangrijk, levensbedreigende bacteriële infecties moeten met antibiotica worden behandeld en het is goed om onze handen te wassen voordat we gaan eten of patiënten gaan behandelen. Maar misschien moeten we onszelf een beetje meer aan bacteriën blootstellen, door het consumeren van gefermenteerde voedingsproducten en probiotica en vaker buitenshuis actief te zijn zoals wandelen, tuinieren of spelen in een zandbak. Daarnaast moeten we ook zorgen voor onze interne microben door het eten van meer voedingsvezels en complexe koolhydraten en minder eenvoudige suikers.

De nieuwe inzichten die voortkomen uit microbioomonderzoek passen ook goed in de ontwikkeling van 'personalised medicine', waarbij patiënten therapie op maat krijgen die past bij de individuele opmaak van hun genoom en nu dus ook hun microbioom. Het bepalen van een microbioomprofiel wordt waarschijnlijk over niet al te lange tijd een onderdeel van de reguliere zorg, waarbij het ontbreken of aanwezig zijn van bepaalde bacteriële groepen gebruikt kan worden voor de diagnostiek of als startpunt kan dienen van een behandelingsplan voor ziektes die tot

nu toe lastig te behandelen zijn. Een zorgelijke ontwikkeling die hiermee samenhangt, is de opkomst van commerciële bedrijven die hun speciale probioticamixen en fecestransplantatiepillen aanbieden. Veel van deze supplementen worden verkocht zonder wetenschappelijke onderbouwing of kwaliteitscontrole. Hoewel sommige probioticastammen in specifieke situaties een bewezen positief effect hebben, maakt de wildgroei van dit soort producten het lastig om het kaf van het koren te scheiden. Desondanks is het microbioomonderzoeksveld een zeer dankbaar en spannend vak om in te werken en ik verwacht dat we in de nabije toekomst nog veel onverwachte functies en effecten van onze interne vrienden op onze gezondheid zullen gaan ontdekken.

Referenties

- Gest H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond* 2004;58:187-201.
- Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012;13:151-70.
- Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell* 2016;164:337-40.
- Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5088-90.
- Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:686-91.
- Franzosa EA, Hsu T, Sirota-Madi A, Shafquat A, Abu-Ali G, Morgan XC, et al. Sequencing and beyond: integrating molecular "omics" for microbial community profiling. *Nat Rev Microbiol* 2015;13:360-72.
- Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009;326:1694-7.
- Bik EM. Composition and function of the human-associated microbiota. *Nutr Rev* 2009;67:S164-S71.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010;464:59-65.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486:207-14.
- Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, et al. Population-level analysis of gut microbiome variation. *Science* 2016;352:560-4.
- Zhernakova A, Kurilshikov A, Bonder MJ, Tigchelaar EF, Schirmer M, Vatanen T, et al. Population-based metagenomics analysis reveals markers for gut microbiome composition and diversity. *Science* 2016;352:565-9.
- Yatsunen T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* 2012;486:222-7.
- Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med* 2016;22:250-3.
- Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med* 2015;21:109-17.
- Song SJ, Lauber C, Costello EK, Lozupone CA, Humphrey G, Berg-Lyons D, et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife* 2013;2:e00458.
- Fall T, Lundholm C, Örtqvist AK, Fall K, Fang F, Hedhammar Å, et al. Early Exposure to Dogs and Farm Animals and the Risk of Childhood Asthma. *JAMA Pediatr* 2015;169:e153219.
- Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15718-23.
- Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JL. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 2011;474:327-36.
- O' Mahony SM, Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome and childhood diseases: Focus on brain-gut axis. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2015;105:296-313.
- Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, Turnbaugh PJ. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:273-87.
- David LA, Materna AC, Friedman J, Campos-Baptista MI, Blackburn MC, Perrotta A, et al. Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome Biol* 2014;15:R89.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505:559-63.
- Gomez A, Petzelkova KJ, Burns MB, Yeoman CJ, Amato KR, Vlckova K, et al. Gut Microbiome of Coexisting BaAka Pygmies and Bantu Reflects Gradients of Traditional Subsistence Patterns. *Cell Rep* 2016;14:2142-53.
- Schnorr SL, Candela M, Rampelli S, Centanni M, Consolandi C, Basaglia G, et al. Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat Commun* 2014;5:3654.
- Obregon-Tito AJ, Tito RY, Metcalf J, Sankaranarayanan K, Clemente JC, Ursell LK, et al. Subsistence strategies in traditional societies distinguish gut microbiomes. *Nat Commun* 2015;6:6505.
- Sonnenburg ED, Smits SA, Tikhonov M, Higginbottom SK, Wingreen NS, Sonnenburg JL. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations. *Nature* 2016;529:212-5.
- Zaura E, Brandt BW, Teixeira de Mattos MJ, Buijs MJ, Caspers MPM, Rashid M-U, et al. Same Exposure but Two Radically Different Responses to Antibiotics: Resilience of the Salivary Microbiome versus Long-Term Microbial Shifts in Feces. *MBio* 2015;6:e01693-e01615.
- Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4554-61.
- Nobel YR, Cox LM, Kirigin FF, Bokulich NA, Yamanishi S, Teittler I, et al. Metabolic and metagenomic outcomes from early-life pulsed antibiotic treatment. *Nat Commun* 2015;6:7486.
- Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science* 2013;341:1241214.
- Cox LM, Blaser MJ. Antibiotics in early life and obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11:182-90.
- Leffler DA, Lamont JT. Clostridium difficile infection. *N Engl J Med* 2015;372:1539-48.
- Drekonja D, Reich J, Gezahegn S, Greer N, Shaikat A, MacDonald R, et al. Fecal Microbiota Transplantation for Clostridium difficile Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med* 2015;162:630-8.
- Van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent Clostridium difficile. *N Engl J Med* 2013;368:407-15.
- Baxter M, Colville A. Adverse events in faecal microbiota transplant: a review of the literature. *J Hosp Infect* 2016;92:117-27.
- Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead. *Gastroenterology* 2014;146:1489-99.
- Rosenfeld CS. Microbiome Disturbances and Autism Spectrum Disorders. *Drug Metab Dispos* 2015;43:1557-71.

‘Search and control’-strategie voor inperking van bijzonder resistente micro-organismen

A. van der Zee, J.M. Ossewaarde

Samenvatting

In het Maasstad Ziekenhuis in Rotterdam is een actief surveillancesysteem opgezet voor detectie van bijzonder resistente micro-organismen (BRMO's). Van 6218 patiënten met een verhoogd risico op BRMO-dragerschap werd in 2015 een rectummonster gescreend met conventionele en moleculaire bepalingen. Per resistentiemechanisme werden de volgende getallen gevonden; 9,1 procent extended-spectrum betalactamase (ESBL), 8,5 procent een andere BRMO en 1,3 procent een carbapenem-resistent micro-organisme, op een totaal van 870 BRMO-positieve patiënten (14 procent). Selectieve kweek, PCR en fenotypische gevoeligheidsbepalingen resulteerden in 32 bla_{OXA-48}-isolaten, 1 bla_{NDM}-isolaat en 21 bla_{VIM}-isolaten. Kolonisatie met ESBL-producerende of aminoglycoside/fluorochinolon-resistente *E. coli* werd gevonden bij respectievelijk 486 en 325 patiënten. Voor *Klebsiella spp.* waren dat respectievelijk 77 en 48 patiënten. Van de BRMO kwam 76 procent uit screening en 24 procent uit klinische kweken.

Carbapenem-resistente isolaten en ESBL-producerende *Klebsiella spp.* worden routinematig getypeerd met AFLP. Andere micro-organismen worden alleen bij verdenking van een epidemiologisch verband getypeerd. Er werden negen clusters gevonden met identieke AFLP-fingerprints die wezen op transmissie of op besmetting vanuit een gemeenschappelijke bron. Hierop is actie ondernomen door infectiepreventie. De ‘search and control’-strategie voorkomt uitbraken en draagt bij aan de patiëntveiligheid.

Abstract

At Maasstad Hospital in Rotterdam, an active surveillance system was implemented for detection of multi drug resistant (MDR) isolates. One rectal swab of patients at risk for carriage or infection was analyzed by molecular and conventional methods for the presence of MDR. The following resistance mechanisms were found; 1.3 percent carbapenem resistance, 9.1 percent ESBL and 8.5 percent of another MDR isolate. A total of 870 patients were colonized with one or more MDR isolates. Selective culturing, PCR and susceptibility testing, confirmed 32 bla_{OXA-48} isolates, 1 bla_{NDM} and 21 bla_{VIM} isolates. Respectively, 486 and 325 patients were colonized

with ESBL-producing or aminoglycoside/fluoroquinolon resistant *E.coli*. For *Klebsiella spp.* this was respectively 77 and 48 isolates. Of MDR isolates, 24 percent were from clinical cultures and 76 percent from screening.

Carbapenem resistant isolates and ESBL *Klebsiella spp.* are routinely genotyped using AFLP. Other MDR isolates are typed only when an epidemiological link is suspected. Nine clusters of identical AFLP fingerprints were found, indicating transmission between patients or spread from a common environmental source. Hygienic measures were taken for containment. The ‘search and control’ strategy can prevent outbreaks and contributes to improved safety for patients.

Inleiding

Enkele decennia geleden meenden beleidsmakers dat met de toen beschikbare antibiotica en vaccins, infectieziekten geen bedreiging meer zouden vormen voor de volksgezondheid. De zogenaamde bijzonder resistente micro-organismen (BRMO) vormen echter in toenemende mate een bedreiging voor patiënten, doordat de beschikbare antibiotische therapie niet altijd meer toereikend is voor de behandeling van infecties veroorzaakt door deze micro-organismen. De ontwikkeling van nieuwe antibiotica houdt geen gelijke tred met de toegenomen resistentie en het aantal multiresistente micro-organismen neemt toe. Bovendien verspreiden ze zich steeds sneller over de wereld. Inmiddels zijn multiresistente micro-organismen ook in Nederland heel gewoon geworden.^{1,2} De Nederlandse regering heeft vorig jaar een beleidsplan opgesteld om de prevalentie van BRMO terug te dringen. Vroege opsporing en monitoring door het vormen van regionale netwerken zijn belangrijk voor de inperking van BRMO. Het succes van dit beleid hangt mede af van de mogelijkheden om snel en tegen aanvaardbare kosten BRMO te kunnen detecteren en typeren. Omdat bekend

J.M. Ossewaarde, arts-microbioloog, Laboratorium voor Medische Microbiologie, A. van der Zee, medisch moleculair microbioloog, Moleculaire Diagnostiek Unit, Maasstad Ziekenhuis, Rotterdam. Correspondentieadres: A. van der Zee, Maasstadweg 21, 3079 DZ, Rotterdam. Tel.: 010-2912511, e-mail: zeea@maasstadziekenhuis.nl

is dat klinische infecties het topje van de ijsberg zijn, is alleen door screening aan te tonen dat een ziekenhuis carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (CRE)-'groen' is.³ In het Maasstad Ziekenhuis is hiertoe een actief 'search and control'-surveillancesysteem opgezet. Dit systeem bestaat uit de screening via ophoping⁴, moleculaire detectiemethoden^{5,6} en selectieve media van een rectummonster van patiënten met een verhoogd risico voor dragerschap of op het verwerven van een infectie met een BRMO. Het doel van deze 'search and control'-screening is om uitbraken voor te zijn. Hier beschrijven wij onze ervaringen met deze BRMO-screening over het jaar 2015.

Selectie van patiënten

Bij alle patiënten die minder dan twee maanden geleden langer dan 24 uur in een buitenlands ziekenhuis werden verpleegd en alle patiënten die overkomen uit een ander Nederlands ziekenhuis van een afdeling waar een BRMO-uitbraak heerst, wordt, in overeenstemming met de WIP-richtlijn,⁷ gericht onderzoek gedaan naar BRMO. In ons ziekenhuis worden daarnaast alle patiënten die opgenomen worden op de intensive care, het brandwondencentrum en de neonatologie- of kinderafdeling ook als hoog risico beschouwd en gescreend op BRMO. Verder worden patiënten die langer dan een week opgenomen zijn vanaf de zevende dag wekelijks gescreend.

De patiënten die bekend waren met een BRMO uit voorgaande jaren zijn hier buiten beschouwing gelaten.

Uitvoering van screening

Voor de BRMO-screening, inclusief de screening op VRE, wordt eenmalig een rectumwat afgenomen.

Deze screening staat overigens geheel los van de MRSA-screening, waarvoor een neus-, keel-, en perineumwat wordt afgenomen. De routinediagnostiek bij een klinische verdenking op een infectie vindt vanzelfsprekend doorgang zoals gebruikelijk.

Alhoewel de NVMM-richtlijn 'Laboratory detection of highly resistant microorganisms (HRMO)⁸ geen duidelijk advies geeft over het wel of niet gebruiken van een vloeibaar verrijkingsmedium, hebben wij op basis van de beschikbare literatuur⁴ besloten om selectief te verrijken met Brain-Heart Infusion bouillon (BHI). Omdat imipenem en meropenem niet stabiel zijn in oplossing, werd gekozen voor ertapenem in het selectieve aankweekmedium. De rectumwat wordt gesuspenderd in 2 ml BHI, waarna er 0,1 ml hiervan wordt overgebracht naar zeven BHI-buizen met verschillende antibiotica (tabel 1). Alle buizen worden overnacht geïncubeerd bij 35°C.

Kweken

Na overnacht incubatie wordt er vanuit elke BHI-buis 10 µl afgeënt op vaste media volgens het schema in tabel 1 en overnacht geïncubeerd. Vervolgens worden de kolonies op deze voedingsbodems beoordeeld. Van verdachte kolonies wordt een identificatie en een gevoeligheidsbepaling uitgevoerd volgens de richtlijnen van de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)⁹ met behulp van Vitek-MS en Vitek2 (Biomérieux). Productie van extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) wordt fenotypisch bevestigd overeenkomstig de NVMM-richtlijn⁸ met de combinatie disk-diffusietest (Total ESBL/AmpC-test, Rosco Diagnostica).

Tabel 1. Selectieve media voor verrijking en isolatie van verschillende BRMO

	Vloeibaar medium voor verrijking BHI met antibioticum (concentratie)	PCR direct op BHI	Kweek	Vast medium voor isolatie
1.	Ceftazidim (1 mg/l)	-	+	Brilliance ESBL-agar (OXOID, PO5302A)
2.	Cefotaxim (1 mg/l)	-	+	Brilliance ESBL-agar (OXOID, PO5302A)
3.	Gentamicine en ciprofloxacine (resp. 4 mg/l en 1 mg/l)	-	+	McConkey3-agar met gentamicine en ciprofloxacine
4.	Tobramycine en ciprofloxacine (resp. 4 mg/l en 1 mg/l)	-	+	McConkey3-agar met tobramycine en ciprofloxacine
5.	Ceftazidim en ciprofloxacine (resp. 4 mg/l en 1 mg/l)	-	+	McConkey3-agar met ceftazidim en ciprofloxacine
6.	Ertapenem (0,25 mg/l)	+	-a	McConkey3-agar
7.	Polymyxine B sulfaat (10 mg/l), aztreonam (2 mg/l) en Vancomycine (4 mg/l)	+	-a	Brilliance VRE-agar (OXOID, PO1175A)

PCR: Polymerase Chain Reaction

a: Alleen bij positieve PCR op de BHI met antibioticum

Moleculaire diagnostiek direct op BHI-bouillon

Metagenomisch DNA wordt geëxtraheerd uit de BHI-bouillon met de Extract-Namp™ Plant PCR Kit (SIGMA). 50 µl van de cultuur wordt gemengd met 100 µl Extraction Solution (E7526). Dit wordt 10 min. geïncubeerd bij 95°C, waarna 100 µl SIGMA Dilution Buffer (D5688) wordt toegevoegd. Amplificatie wordt gedaan met Extract-N-Amp PCR ReadyMix™ (E3004, SIGMA).

Op DNA van de ertapenem-buis wordt vervolgens PCR verricht op de carbapenemasegenen OXA-48, VIM, IMP, KPC en NDM zoals eerder beschreven^{5,6} met een aanpassing van de IMP-primers en -probes. Op DNA van de vancomycine-buis wordt een multiplex PCR verricht op VanA, VanB en *E. faecium*-genen (zie tabel 2 voor primer- en probesequenties). Bij een positieve PCR wordt de bouillon afgeënt om zo de stam in handen te krijgen (tabel 1). De aanwezigheid van carbapenemasegenen en vancomycine-resistentiegenen wordt vervolgens geconfirmeer met real-time PCR op het verdachte isolaat.

AFLP genotypering

CRE worden routinematig getypeerd, evenals Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producerende *Klebsiella spp.*-isolaten. Andere BRMO-isolaten worden alleen getypeerd bij verdenking op een epidemiologisch verband tussen de patiënten.

Genotypering van isolaten wordt uitgevoerd met multi-enzyme amplified fragment polymorphism (AFLP), zoals eerder beschreven¹⁰, met de aanpassing dat agarose-gel-elektroforese is vervangen door fragmentanalyse op een DNA-sequencer (ABI3500) door labeling van de AFLP-primers. Bandenpatronen worden vergeleken met behulp van Bionumerics (Applied Math, Biomérieux). Identieke fingerprints kunnen wijzen op transmissie of besmetting vanuit een gemeenschappelijke bron. In alle gevallen zijn de uitslagen van typering voor de afdeling infectiepreventie een reden voor nader onderzoek.

Isolatiemaatregelen

Bij identificatie van een BRMO worden direct isolatiemaatregelen genomen en wordt screening van de patiënt wekelijks vervolgd. Wanneer er sprake is van een epidemische verheffing wordt daarnaast contactonderzoek gestart.

Resultaten

In 2015 zijn 6218 patiënten gescreend op dragerschap van een BRMO. Daarvan waren 5051 patiënten negatief. Per resistentiemechanisme zijn de volgende getallen gevonden: 567 patiënten waren gekoloniseerd met een ESBL (9,1 procent), 527 met een aminoglycoside- en fluorochinolone-resistent isolaat (AmQui) (8,5 procent) en 81 patiënten met CRE of ander carbapenemaseproducerend micro-organisme (CP-MO) (1,3 procent) (figuur 1). In totaal waren 870 patiënten gekoloniseerd met een of meerdere BRMO's.

Tabel 2. Primer- en probesequenties voor detectie van IMP-genen, *E. faecium*, VanA en VanB

Target	Oligonucleotide (3'-5')
IMP-F IMP-R1 IMP-R2 IMP-probe	GGCGGAATAGAGTGGCTTAATTCTC CGTACGGTTTAAACAAAACAACCACC ATTTTGTAGCTTGTACCTTACCGTATT TATGCATCTGWATTAACAAATGAAC
EFAE-F EFAE-R EFAE-probe	GCAACTAAGATACAGTAGGAAGCATCA TGCGGATCGATTTGGA/TTTG CGCGTCCAACACGTCCACGAA
VanA-F VanA-R VanA-probe	CCCGGTTTCACGTCATACAGT CAATCAGTTCGGGAAGTGAA CCTGCAGCGGCCATCATACGG
VanB-F VanB-R VanB-probe	CAATACAAACAGMCCCTGTATCG CGGCGTATTGAYGTGGCTTT TCCTCCCCGATTTGCCATGC

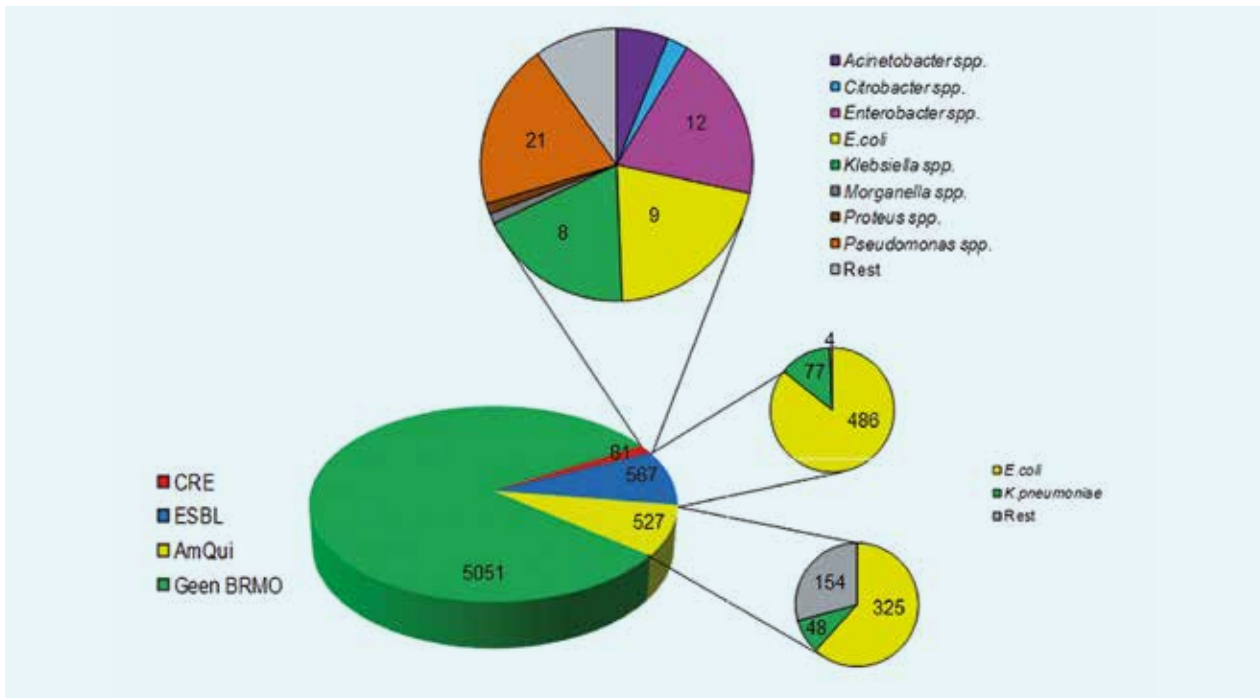
Uitwerking van de kweken leverde respectievelijk 486 en 77 patiënten op die gekoloniseerd waren met een ESBL-producerende *E.coli* of *Klebsiella spp.* Vier patiënten hadden een ander ESBL-producerend micro-organisme. Aminoglycoside/fluorochinolone-resistente *E. coli* of *Klebsiella spp.* kwamen voor bij respectievelijk 325 en 48 patiënten en 154 patiënten hadden een ander AmQui-resistent micro-organisme. OXA-48 werd 53 keer gevonden: 16 *Enterobacter cloacae*, 13 *E. coli*, 12 *Klebsiella spp.*, 4 *Citrobacter freundii* en 1 *Morganella morgani* en *Proteus mirabilis*. Bij vijf *Acinetobacter spp.* werd een OXA-48-like carbapenemase aangetoond. *K. pneumoniae* blaNDM werd één keer gevonden en *Pseudomonas spp.* blaVIM werd bij 21 patiënten gevonden. Zeven patiënten hadden een ander CRE/CP-MO (bijvoorbeeld *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*).

Figuur 2 geeft een overzicht van de nieuw gevonden BRMO-positieve patiënten per week in 2015. Opvallend is dat vooral de toename van ESBL piekt na vakanties in week 14, 36 en 49. Van de hier getoonde BRMO-isolaten is 76 procent gedetecteerd door middel van screening en 24 procent is afkomstig van klinische kweken. In 2015 werden met AFLP negen clusters van ten minste twee nauw verwante micro-organismen geïdentificeerd (figuur 3). In het geval van transmissie konden door isolatie van patiënten en verscherpte controle op hygiëne¹⁰ deze verheffingen snel ingeperkt worden. Bij een deel van de uitbraken betrof het een besmetting vanuit een gemeenschappelijke bron uit de omgeving (onder andere *Pseudomonas aeruginosa* en enkele *E. cloacae*-isolaten).

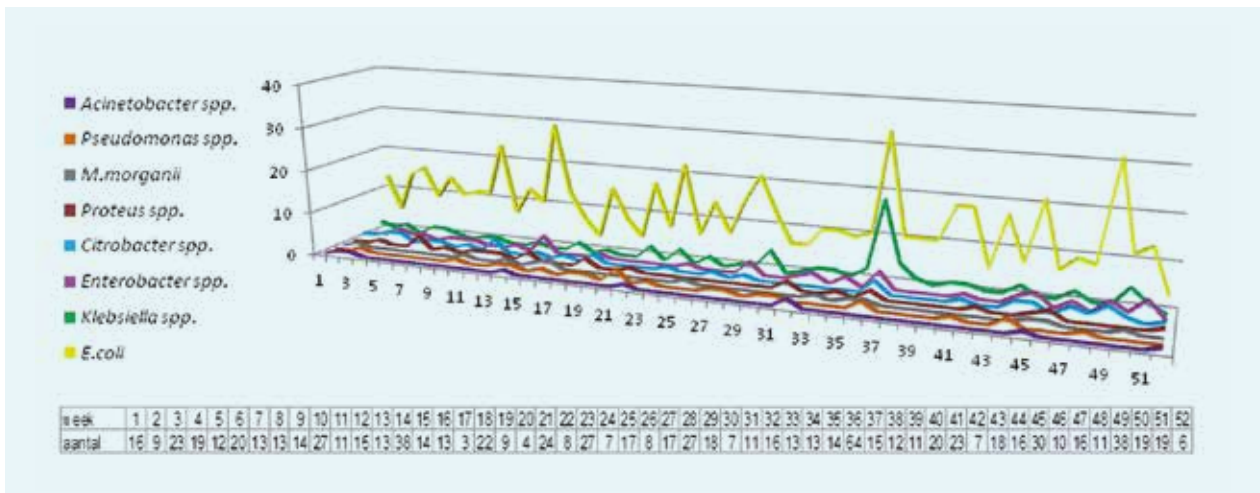
VRE

In 2015 waren 13 patiënten op 8 verschillende afdelingen gekoloniseerd met vancomycine-resistente enterokok

Figuur 1. Verhouding van gevonden species per resistentie criterium. CRE; carbapenem resistent (ook CP-MO), AmQui; aminoglycoside/fluoroquinolon resistent



Figuur 2. Aantal nieuwe patiënten met een BRMO per week, uitgesplitst naar eerst gevonden isolaat. De verschillende genera of species worden door kleuren aangegeven zoals naast de figuur is verklaard



(VRE): 12 keer werd er een VanA-gen aangetoond en 1 keer een VanB-gen. VRE wordt niet routinematig getypeerd en in 2015 was er geen aanleiding om dat te doen. Slechts in één geval was transmissie niet uit te sluiten.

Kosten

In 2015 zijn er 14058 monsters getest. Van allemaal is de PCR voor VRE- en carbapenemase-detectie gedaan en daarnaast 3x een selectieve kweek. Dit kost € 7,22 per monster. Uitwerken van screeningpositieven (ongeveer 20 procent) met behulp van Vitek-MS en Vitek2, E-test, ESBL/AmpC-test, PCR-confirmatie en AFLP-typering

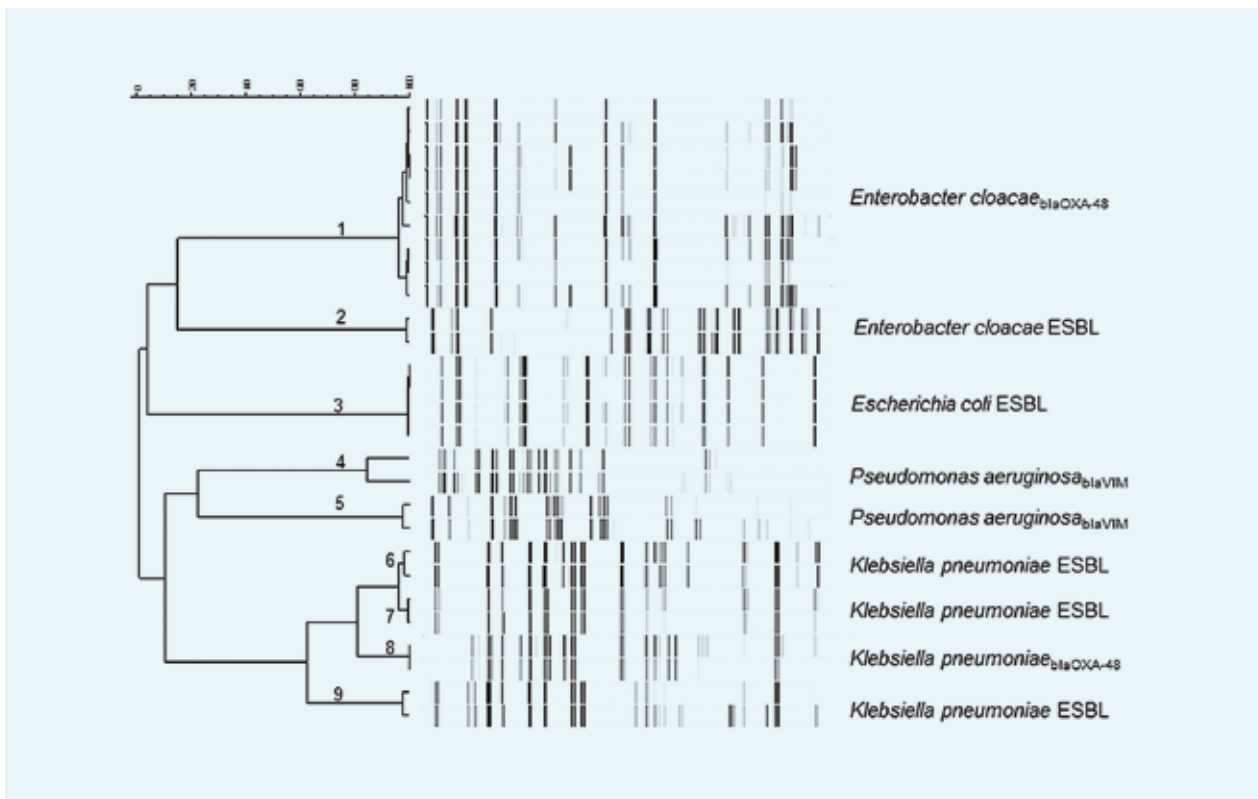
kost € 80,68 per isolaat ($870/14058 = 6$ procent van de materialen).

Gemiddeld kost de screening per monster, inclusief personeel en afschrijving van apparatuur en exclusief overhead, ongeveer € 15,00. Het gaat om daadwerkelijk gemaakte kosten.

Discussie

Het inperken van verspreiding van BRMO is belangrijk voor de veiligheid van onze patiënten. Onopgemerkt dragerschap kan leiden tot verspreiding¹¹ die pas opgemerkt wordt wanneer er bij patiënten infecties

Figuur 3. Clusteranalyse van AFLP-fingerprints afkomstig van isolaten van verschillende patiënten. Links zijn de nummers van de respectievelijke clusters genoemd. Rechts zijn de micro-organismen genoemd met > 90 procent overeenkomst in de clusteranalyse



optreden. Met de ‘search and control’-strategie kunnen we waarschijnlijk het grootste deel van de dragers van BRMO in kaart brengen. Het modulaire systeem kan naar behoeven worden aangepast door het weglaten van bepaalde media of het toevoegen van nieuwe media voor nieuwe resistentiemechanismen. Hoewel er voldoende methodes zijn gepubliceerd om CRE/CP-MO te kunnen detecteren¹²⁻¹⁶ en er ook een richtlijn is opgesteld,⁸ lijkt de screening nog niet breed geïmplementeerd te zijn. De moleculaire screening voor de aanwezigheid van CRE/CP-MO of VRE is efficiënt, werklust-besparend en geeft een snelle uitslag voor negatieve monsters. Verdachte patiënten kunnen daarmee ook eerder uit isolatie.

Door routinematige genotypering van CRE en ESBL *Klebsiella* kan een klonale verwantschap met eerder getypeerde isolaten direct worden gevonden en de epidemiologische link worden onderzocht. Deze methode werkt sneller en efficiënter dan wanneer eerst de verdenking op epidemische verheffing geformuleerd moet worden en er al transmissie naar andere patiënten kan hebben plaatsgevonden.

Analoog aan het ‘search and destroy’-beleid voor MRSA dat wereldwijd als een succes wordt gezien, is de ‘search and control’ voor BRMO een systeem dat transmissie minimaliseert, de epidemische verheffingen beperkt en ook het daarmee samenhangende contactonderzoek. Studies hebben aangetoond dat MRSA-screening kosteneffectief

is.¹⁷ Omdat de kosten van een (grote) uitbraak hoog zijn, lijkt de BRMO-screening ook kosteneffectief te zijn.

Het kostenaspect van de screening en de hogere werkdruk kunnen drempels zijn voor de implementatie. Binnen het eigen ziekenhuis ervaren we ook enige weerstand. Isolatie van patiënten en de implicaties van BRMO-dragerschap voor behandeling of operatie van patiënten blijft een lastige zaak.

Conclusie

We concluderen dat de ‘search and control’-strategie succesvol is om vroegtijdige transmissie op te sporen, klinische infecties te beperken en grote verheffingen van BRMO’s te voorkomen. Ook geeft deze strategie inzicht in gezondheidszorg-gerelateerde transmissie van CRE/CP-MO vanuit omgevingsbronnen.

Referenties

1. Reuland EA, Al Naiemi N, Kaiser AM, Heck M, Kluytmans JA, Savelkoul PH, et al. Prevalence and risk factors for carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Amsterdam. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1076-82.
2. Willemsen I, Oome S, Verhulst C, Pettersson A, Verduin K, Kluytmans J. Trends in Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing Enterobacteriaceae and ESBL Genes in a Dutch Teaching Hospital, Measured in 5 Yearly Point Prevalence Surveys (2010-2014). *PLoS ONE* 2015;10:e0141765.

3. Nederland CRE-groen. Optimalisatie van de beheersing van antimicrobiële resistentie door regionale netwerkvorming. Visiedocument NVMM, oktober 2015.
4. Murk JLAN, Heddema ER, Hess DLJ, Bogaards JA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Debets-Ossenkopp YJ. Enrichment Broth Improved Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Bacteria in Throat and Rectal Surveillance Cultures of Samples from Patients in Intensive Care Units. *J. Clin. Microbiol* 2009;47:1885-7.
5. Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PHM, et al. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infectious Diseases* 2014;14:27
6. Van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Ossewaarde JM. Screening rectal swabs for carbapenemase genes. *J Clin Microbiol* 2014;52:4401-3.
7. http://www.wip.nl/UK/free_content/Richtlijnen/HRMO.pdf
8. Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Guideline Laboratory detection of highly resistant microorganisms, version 1.0. 2011. Leeuwarden:NVMM;2011. Available from: <http://www.medinfo>.
9. www.eucast.org/organization/nac/
10. Van der Zee A, Steer N, Thijssen E, Nelson J, van't Veen A, Buiting A. Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. *J Clin Microbiol* 2003;41:798-802.
11. Willemssen I, Nelson J, Hendriks Y, Mulders A, Verhoeff S, Mulder P, et al. Extensive dissemination of extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Dutch nursing home. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2015;36:394-400.
12. Voets GM, Fluit AC, Scharringa J, Cohen Stuart J, Leverstein-van Hall MA: A set of multiplex PCRs for genotypic detection of extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases, plasmid-mediated AmpC β -lactamases and OXA-lactamases. *Int J Antimicrobial Agents* 2011;37:356-9.
13. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P: Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:119-23.
14. Österblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba NP Test for Carbapenemase Detection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014;58:7553-6.
15. Hrabák J, Študentová V, Walková R, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 Carbapenemases by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012;50:2441-3.
16. Van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. Rohde H, ed. *PLoS ONE* 2015;10:e0123690.
17. Kunoria T, Cookson B, Roberts JA, Stonec S, Kibbler C. Cost-effectiveness of different MRSA screening methods. *J Hosp Infect* 2002;51:189-200.

Toepassingen van next generation sequencing voor klinische microbiologie en infectiepreventie

R.H. Deurenberg, S. Rosema, G.C. Raangs, A.W. Friedrich, J.W.A. Rossen

Samenvatting

Met next generation sequencing (NGS) kan de DNA-sequentie van een compleet genoom worden bepaald en uit deze DNA-sequentie kan de aanwezigheid van onder andere resistentie- en/of virulentiegenen worden geanalyseerd. De NGS-data kunnen ook gebruikt worden voor het typeren van een micro-organisme om de moleculaire epidemiologie ervan te bestuderen en/of voor het vaststellen van uitbraken. Verder is het mogelijk om op basis van de NGS-data een uitbraakspecifieke moleculairdiagnostische test te ontwikkelen. Een 'metagenomics' benadering met NGS kan niet alleen direct de aanwezigheid van bacteriën en/of virussen in klinisch materiaal, zoals bloed, weefsel of feces bepalen, maar ook de expressie van de genen van de gastheer vaststellen. In dit overzichtsartikel presenteren we een algemene inleiding over NGS, beschrijven we de belangrijkste kenmerken van de meest voorkomende NGS-apparatuur, zoals de MiSeq (Illumina) en de Ion PGM™ (ThermoFisher), en beschrijven we enkele mogelijkheden van NGS in het klinisch-microbiologisch laboratorium. Vervolgens geven we informatie over de software die gebruikt kan worden voor de bio-informatica-analyses.

Trefwoorden

Ion PGM™, microbiologie, MiSeq, next generation sequencing, NGS, WGS, MinION, Sequel

Abstract

Next generation sequencing (NGS) can determine the DNA sequence of a complete genome. From these data, a number of determinants, such as resistance and/or virulence genes, can be obtained. Furthermore, the NGS data can be used for molecular typing of micro-organisms to study their molecular epidemiology and to reveal outbreaks. It also allows the development of an outbreak strain-specific molecular diagnostic test. A metagenomics approach using NGS cannot only detect the presence of bacteria and/or viruses in samples, but also determines the expression level of human genes. In this review, we present a general introduction to NGS, we describe the most important characteristics of the most common

NGS platforms, such as the MiSeq (Illumina) and the Ion PGM™ (ThermoFisher) and we describe some possible applications of NGS in the clinical microbiology laboratory setting. Finally, we give some information on the software that can be used for bio-informatics analyses.

Introductie

Moleculairbiologische technieken spelen een belangrijke rol in de medische microbiologie. Ze reduceren niet alleen de tijd van monsterontvangst tot resultaat, maar maken het ook mogelijk om niet of moeilijk kweekbare pathogenen aan te tonen en dragen daarmee bij aan het oog hebben voor het onzichtbare. Een van de moleculairbiologische technieken die wordt gebruikt binnen het medisch-microbiologisch laboratorium is het analyseren van de genetische informatie van pathogenen door de basepaarvolgorde te bepalen van bepaalde genen of complete genomen, de zogenaamde sequentie-analyse.

Sanger sequencing

Sequentie-analyses kunnen worden gebruikt voor het beantwoorden van verschillende vraagstellingen, waaronder het bepalen van de genetische verwantschap van virussen en bacteriën en het opsporen van mutaties in virale of bacteriële genen waardoor resistentie ontstaat tegen antivirale middelen of antibiotica.^{1,2} Verder kunnen sequentie-analyses worden gebruikt voor de identificatie van schimmels door sequentie-analyse van het 18S ribosomaal desoxyribonucleïnezuur (rDNA) of de 'internal transcribed spacer' (ITS)-regio en identificatie van bacteriën door sequentie-analyse van het 16S en/of 23S rDNA.^{3,4} Standaard worden deze bepalingen uitgevoerd

R.H. Deurenberg, S. Rosema, G.C. Raangs, A.W. Friedrich, J.W.A. Rossen, Afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Rijksuniversiteit Groningen, Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG), Groningen, Nederland. Correspondentieadres: J.W.A. Rossen, Afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG), Postbus 30001, 9700 RB Groningen, Nederland, Telefoon: +31 (0)50 - 381 34 80. E-mail: john.rossen@gmail.com

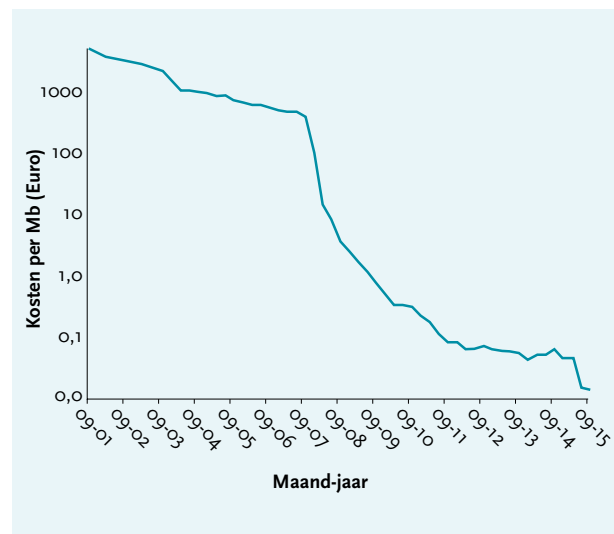
met behulp van ‘Sanger sequencing’, waarbij per gen een amplificatiestap (PCR) en vervolgens twee verschillende sequentiereacties (‘forward’ en ‘reverse’) moeten worden uitgevoerd en geanalyseerd. Het succes om mutaties te kunnen opsporen hangt onder meer af van de gevoeligheid van de PCR die gebruikt is voor de amplificatiestap. Daarnaast is er specifieke (en vaak prijzige) software nodig om mutaties in een achtergrond van wild-type sequenties te kunnen aantonen, zeker als de mutatie in slechts een klein deel van de populatie aanwezig is.

Voor de identificatie van pathogenen in direct materiaal kan dezelfde methode gebruikt worden. Deze heeft als nadeel dat bij de aanwezigheid van meerdere bacteriën/virussen, sequenties door elkaar heen zullen lopen waardoor de identificatie van pathogenen uiterst moeilijk tot niet mogelijk is. Daarnaast zijn de kosten om met Sanger sequencing een bacterieel genoom in kaart te brengen hoog en is de benodigde tijd die daarvoor nodig is lang.

Next generation sequencing

Met de introductie van next generation sequencing (NGS) is het mogelijk geworden in korte tijd van meerdere pathogenen tegelijkertijd het hele genoom in kaart te brengen. Zowel de investerings- als running-kosten hiervoor zijn de afgelopen jaren enorm gedaald (*figuur 1*). Er zijn veel mogelijkheden om deze nieuwe manier van sequensen binnen het medisch microbiologisch laboratorium en voor infectiepreventiedoeleinden te gebruiken. Een groot voordeel van NGS is dat het voor zowel identificatie- als typeringsdoeleinden van alle pathogenen gebruikt kan worden. Er zijn geen species-specifieke primers nodig, zoals dat voor Sanger sequencing wel het geval is. In een sequentierun wordt de sequentie van het hele genoom van een micro-organisme in fragmenten bepaald. Het tevoren fragmenteren van het genoom is noodzakelijk, omdat de maximale sequentielengte van de huidige zogenaamde ‘benchtop sequencers’ varieert van 100 tot 1000 basen (b) en de sequentievorgorde van het genoom dus niet als één fragment bepaald kan worden.^{5,6} Daarom vereist NGS over het algemeen de bereiding van bibliotheken waarbij de fragmenten van DNA of RNA worden gefuseerd/gekoppeld aan adapters en barcodes, gevolgd door PCR-amplificatie en sequensen. Hierbij is een robuuste bereiding van deze bibliotheken noodzakelijk, zodat ze een representatieve bron van het DNA of RNA van het te onderzoeken genoom vormen. Fragmentatie kan op verschillende manieren worden uitgevoerd, mechanisch gevolgd door adaptor-ligatie of enzymatisch, bijvoorbeeld met behulp van transposomen zoals die in de Nextera XT-kit (Illumina) worden gebruikt. Laatstgenoemde heeft als voordeel dat de fragmentatie en de fusie van de adapters aan de te onderzoeken fragmenten in één stap kan gebeuren, hetgeen automatiseren eenvoudiger maakt.

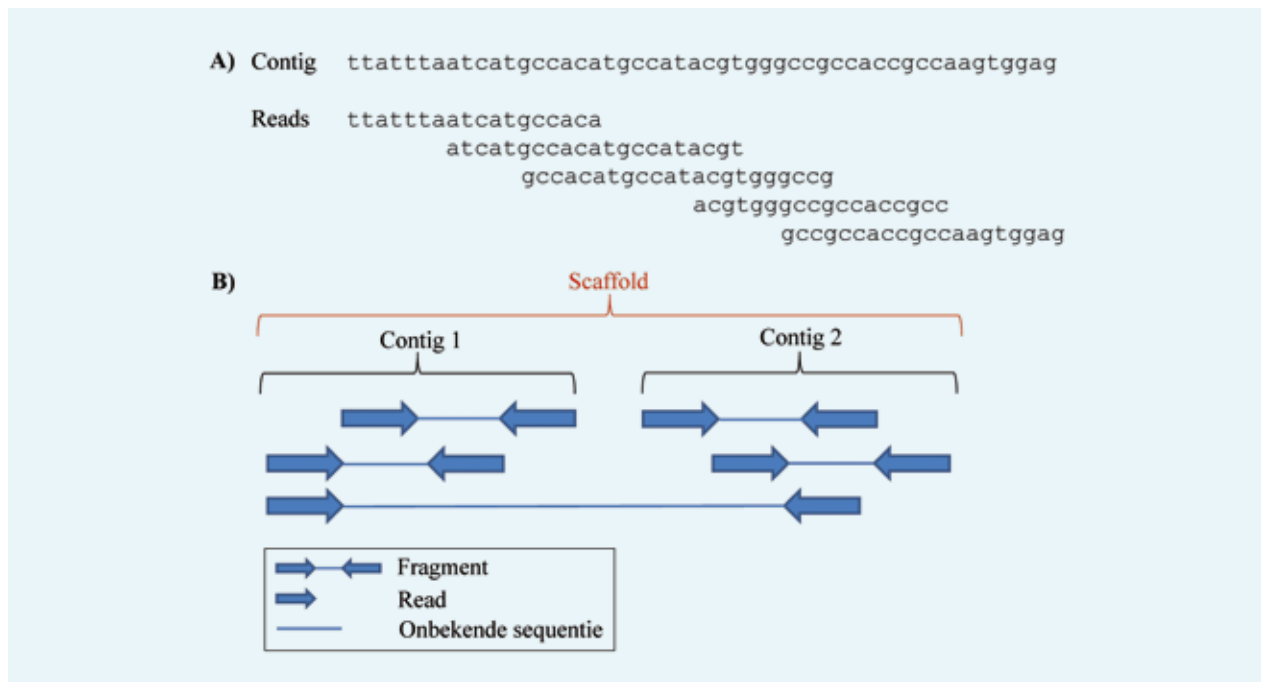
Figuur 1. De kosten van sequensen per Mb (Euro) tussen 2001 en 2015. Bron: www.genome.gov/27541954/dna-sequencing-costs-data



Bovendien is voor deze laatste methode minder input van DNA nodig. Mechanische fragmentatie heeft als voordeel dat het genereren van de gewenste fragmentlengte minder beïnvloed wordt door enzym-remmende factoren in het te sequensen materiaal. Daardoor is deze manier bijzonder geschikt voor het maken van een bibliotheek uit direct materiaal, zoals biopten en feces.

Nieuwe generatie sequencers zoals de MinION (Oxford Nanopore) en de Sequel (Pacific Biosciences), kunnen grotere fragmenten tot meer dan 200 kb analyseren waardoor de sequentievorgorde van kleinere micro-organismen ‘lineair’ bepaald kan worden. De betreffende sequencers zijn echter nog amper aanwezig in de klinisch-microbiologische laboratoria; deels vanwege de kosten en deels vanwege de kwaliteit van de sequentiedata. Het is goed om te realiseren dat NGS-bibliotheken fouten kunnen bevatten die de kwaliteit van NGS-datasets kunnen verminderen, wat kan leiden tot verkeerde interpretatie van de NGS-data. Gedetailleerde kennis van de aard van deze fouten is van essentieel belang voor de juiste interpretatie van NGS-data, bij het zoeken naar manieren om de kwaliteit van de bibliotheken te verbeteren en om bio-informaticasoftware te ontwikkelen ter compensatie van deze fouten. Opvallend is dat vrijwel alle stappen van de verschillende protocollen fouten kunnen introduceren. Dit is vooral het geval bij RNA-sequensen, dat technisch lastiger is in vergelijking met DNA-sequensen.^{5,6} Na sequensen kunnen de fragmenten van welke de sequenties zijn bepaald met behulp van een software-programma aan elkaar worden gezet op basis van overlap in sequentie tussen de verschillende fragmenten (reads), de zogenaamde genoomassemblage (*figuur 2*). In het algemeen geldt dat hoe groter de fragmenten zijn, hoe

Figuur 2. De schematische weergave van genoomassemblage. A) De ruwe sequentiedata (reads) worden geassembleerd tot contigs op basis van overlappende stukken sequenties. B) De scaffolds bestaan uit meerdere contigs met daartussen een onbekende sequentie ('gap'). Deze 'gaps' ontstaan indien reads behorende bij hetzelfde fragment overlappen met reads in twee verschillende contigs. Aangezien de lengte van de fragmenten waarvan de sequentie wordt bepaald ongeveer bekend is kan het aantal baseparen tussen twee contigs geschat worden



makkelijker en nauwkeuriger de genoomassemblage zal verlopen. De belangrijkste eigenschappen van de meest gebruikte apparaten in laboratoria, zoals de output en de fragmentlengte van de vastgestelde sequenties, zijn weergegeven in *tabel 1*.⁵⁻⁸

Voor NGS worden door de fabrikanten verschillende technieken gebruikt (*box 1*). Door de technologische ontwikkelingen zijn de kosten van NGS tussen 2001 en 2015 sterk afgenomen (*figuur 1*), terwijl de snelheid waarmee de sequentie van een genoom kan worden bepaald juist enorm is toegenomen.^{8,9}

NGS in de klinische microbiologie

In verschillende medisch-microbiologische laboratoria wordt NGS reeds toegepast binnen de routinediagnostiek, de infectiepreventie en voor de moleculaire epidemiologie tijdens uitbraken. Daarnaast wordt NGS gebruikt om nieuwe, onbekende resistentiegenen op te sporen. Hiervoor zijn niet alleen analisten nodig die het laboratoriumwerk uitvoeren, maar ontstaat er daarnaast de behoefte om analisten (om) te scholen in het analyseren van de sequentiedata (als/naar zogenaamde E-lab-analisten).

Uitbraakmanagement

Het gebruik van deze techniek voor uitbraakmanagement kan geïllustreerd worden aan de hand van een uitbraak die plaatsvond in het Universitair Medisch Centrum

Groningen (UMCG) en een aan het UMCG verbonden revalidatiekliniek (*figuur 3*). De overdracht van een CTX-M-15-producerende *Klebsiella pneumoniae*-stam met sequentie-type (ST) 15 tussen patiënten in een lokaal gezondheidscentrum en de daaropvolgende inter-institutionele verspreiding van deze *K. pneumoniae*-stam door patiënten tussen mei 2012 en september 2013, werd mede onderzocht met behulp van NGS. Hiermee werden de volledige genomen van de isolaten in kaart gebracht en werd de aanwezigheid van resistentie- en virulentiegenen aangetoond. De verdenking op een epidemiologisch verband tussen de klinische *K. pneumoniae*-isolaten werd ondersteund door het in kaart brengen van patiënt-patiënt-contacten en de fylogenetische analyse van de NGS-data. Hierdoor kon ook een patiënt in november 2012 in verband

Box 1. De verschillende technieken van NGS

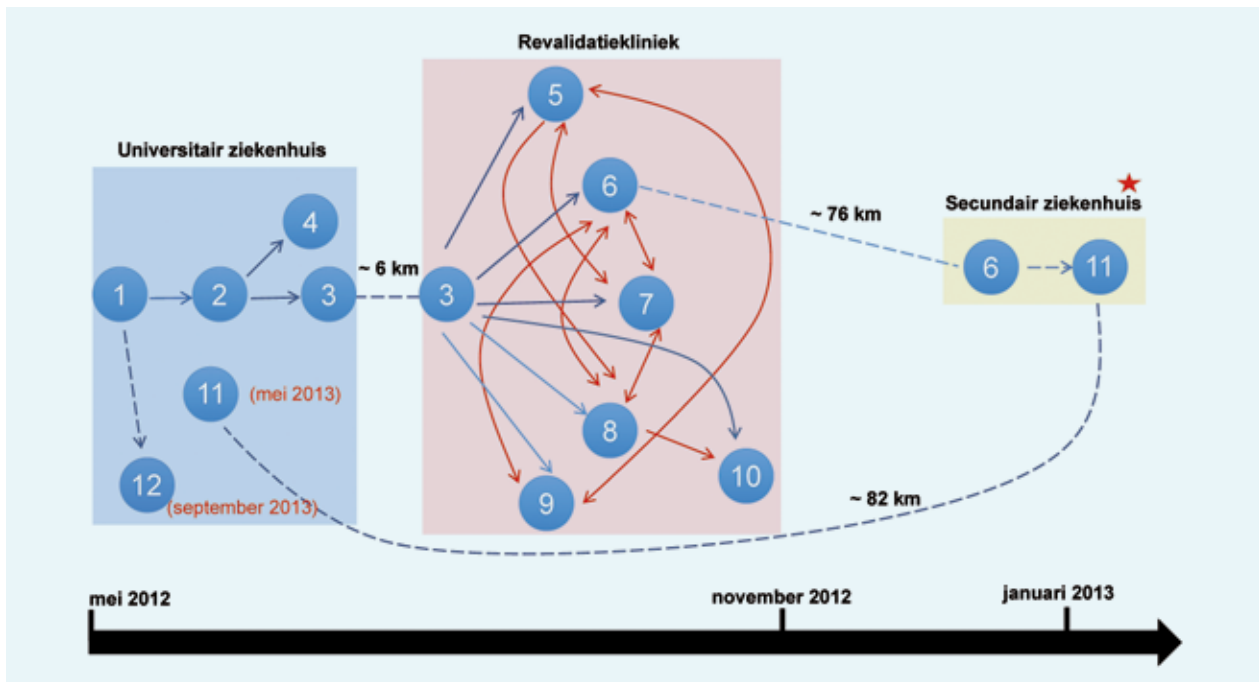
Illumina-sequencers maken gebruik van sequensen door synthese met behulp van fluorescerende, reversibele terminatoren. ThermoFisher gebruikt halfgeleiders die de pH-verandering tijdens de inbouw van nucleotiden meten. Pacific Biosciences gebruikt fluorescerende nucleotiden in hun single molecule real-time (SMRT)-technologie. Oxford Nanopore ten slotte, maakt gebruik van een nanoporiën waardoor het DNA wordt geleid en waarbij een nucleotide-specifieke verandering in de stroom die door de porie stroomt wordt gemeten. Uitgebreide informatie over de verschillende technieken is beschikbaar op de webpagina's van de fabrikanten.

Tabel 1. Belangrijkste eigenschappen van NGS apparatuur

Bedrijf	Apparaat	Output/run (Gb)	Maximale read lengte (bp)	Reads (x 10 ⁶)	Looptijd
Illumina	MiniSeq	0,6 - 7,5	2 x 150	25	4 - 24 uur
Illumina	Miseq	0,3 - 15	2 x 300	25	5 - 55 uur
Illumina	NextSeq	20 - 120	2 x 150	130/400	12 - 30 uur
Illumina	HiSeq 3000	125 - 700	2 x 150	2500	< 3,5 - 1 dagen
ThermoFisher	Ion PGM™	0,03 - 2	200 - 400	0,4 - 5,5	2 - 7 uur
ThermoFisher	Ion 5S™	0,6 - 15	200 - 400	3 - 80	2,5 - 4 uur
ThermoFisher	Ion 5S™ XL	0,6 - 15	200 - 400	3 - 80	< 24 uur
Oxford Nanopore	MinION	21 - 42	230.000 - 300.000	2,2 - 4,4	1 min - 48 uur
Pacific Biosciences*	Sequel	0,75 - 1,25	> 20.000	370.000	30 min - 6 uur
Pacific Biosciences	RSII	0,5 - 1	> 20.000	55.000	30 min - 4 uur

*Pacific Biosciences data zijn per smart cell; beide apparaten kunnen 1-16 smart cellen per run draaien.

Figuur 3. De mogelijke transmissieroutes van de uitbraak gereconstrueerd met behulp van epidemiologische en WGS-data



Een blauwe cirkel stelt een patiënt voor en een pijl geeft een mogelijke transmissie van patiënt naar patiënt weer. Een blauwe pijl met doorgetrokken lijn geeft een rechtstreekse transmissie weer, ondersteund door zowel epidemiologische en WGS-data en een rode pijl geeft een mogelijke alternatieve transmissieroute weer. Een blauwe pijl met stippellijn geeft een indirecte overdracht weer (bijvoorbeeld via de omgeving), ondersteund door epidemiologische data. Transport van een patiënt van het ene naar het andere ziekenhuis wordt aangegeven met een blauwe stippellijn, waarbij de afstand tussen de verschillende gezondheidsinstellingen is weergegeven. De rode ster geeft een uitbraak weer in het secundaire ziekenhuis, waarvan de isolaten niet beschikbaar waren voor verder onderzoek.¹⁰

worden gebracht met deze uitbraak. Verder werd in mei 2013 een patiënt geïdentificeerd die werd behandeld in twee instellingen in twee steden en die betrokken bleek bij de herintroductie van deze hoog-risicokloon (plaatselijke verspreiding, productie van CTX-M-15 en productie van hypervirulentiefactoren) in het UMCG. Een uitbraakspecifieke multiplex-PCR werd ontwikkeld voor de screening van patiënten en met behulp hiervan werd in september 2013 een andere patiënt geïdentificeerd. Uit de fylogenetische analyse van de *K. pneumoniae*-isolaten, inclusief vergelijking met eerder gepubliceerde *K. pneumoniae*-genomen met ST15, bleek dat de isolaten nauw verwant waren met eerder gevonden *K. pneumoniae*-isolaten in de Verenigde Staten van Amerika. Verder onderzoek toonde aan dat verontreiniging van de omgeving en gebrek aan consistente patiëntenscreening mede verantwoordelijk waren voor de verspreiding van deze *K. pneumoniae*-kloon. De studie laat de voordelen van het toepassen van NGS zien voor de tijdige opsporing van multiresistente micro-organismen, welke de neiging hebben tot snelle nosocomiale verspreiding en langdurige circulatie in de regionale patiëntenpopulatie.¹⁰ Hierbij moet worden opgemerkt dat er niet alleen overdracht van bacteriën tussen patiënten kan plaatsvinden, maar dat antibiotica-resistentiegenen (ARGs) ook kunnen worden overgedragen

door verspreiding van plasmiden.¹¹ Duidelijk is echter dat inter-institutionele en regionale samenwerking op infectie- en uitbraakbeheer noodzakelijk is om snel een uitbraak het hoofd te kunnen bieden. Hierbij zullen zowel epidemiologische als genetische data gedeeld moeten worden.¹⁰ Daarnaast is het essentieel dat er een referentie-sequentiendatabase beschikbaar is/komt om snel genomen en/of plasmiden van nieuwe stammen te kunnen vergelijken met die van de reeds binnen en buiten de regio circulerende stammen. Laboratoria die gegevens (sequenties en metadata) aan de database willen toevoegen, moeten daarbij voldoen aan vooraf vastgestelde kwaliteitscriteria en deelnemen aan externe kwaliteitsrondzendingen.

Nieuwe resistentiegenen

Met behulp van NGS kan ook gezocht worden naar een verklaring voor onbegrepen resistentie van bacteriën. Nieuwe varianten van ARGs kunnen hiermee worden geïdentificeerd. Door verdere experimenten kan worden aangetoond dat deze genen inderdaad verantwoordelijk zijn voor de gevonden resistentie.^{12,13} Reeds aanwezige NGS-data kunnen op eenvoudige wijze worden gebruikt om te screenen op de aanwezigheid van een nieuw ARGs (in silico-screening). Hierdoor was het mogelijk om in meer dan 2000 Nederlandse *Enterobacteriaceae*-isolaten

waarvan de sequenties reeds bepaald waren, zeer snel vast te stellen of het MCR-1-gen, betrokken bij colistineresistentie, aanwezig was.¹⁴

Metagenomics

Het is ook mogelijk om al het humaan, bacterieel en/of viraal DNA, aanwezig in patiëntenmateriaal, te sequencen (metagenomics). Hiermee kunnen zowel in het monster aanwezige pathogenen als (resistentie)genen worden bestudeerd. De menselijke darm vormt een dynamisch reservoir van ARGs. Behandeling met antibiotica heeft een effect op de samenstelling van de intestinale bacterieflora en kan leiden tot verhoogde horizontale overdracht van ARGs en selectie van antibioticaresistente bacteriën. In een studie uit Tuebingen werd het profiel van intestinale ARGs onderzocht in materiaal van twee gezonde personen, tijdens een zesdaagse behandeling met ciprofloxacine. Hiervoor werd gebruik gemaakt van metagenomics en verschillende ARG-kwantificeringsmethodes. Vier weken na het einde van de antibioticabehandeling was de samenstelling van de ARGs weer gedeeltelijk in de oude staat. Het in deze studie gepresenteerde analyse-algoritme voor de bepaling van antibioticaselectiedruk kan worden toegepast in de kliniek voor de vergelijking van verschillende therapeutische opties en het effect daarvan op het intestinale resistoom. Deze informatie is van essentieel belang voor artsen-microbioloog bij de keuze van het voor te schrijven antibioticum. Een antibioticum met een lage selectiedruk op de intestinale ARGs van patiënten, zal mogelijk resulteren in een vermindering van de verspreiding van antibioticaresistentie en een verminderde impact van ziekenhuisgerelateerde infecties met multi-drug-resistente micro-organismen.¹⁵

Metagenomics kan ook gebruikt worden voor de detectie van pathogenen in klinische monsters. In tegenstelling tot de huidige moleculaire testen zoals PCR, wordt gekeken naar al de mogelijk aanwezige pathogenen, verwacht en onverwacht, en niet alleen maar naar die pathogenen waarvan er primers in de test zitten. Het gebruik hiervan binnen de moleculaire diagnostiek wordt momenteel echter belemmerd door het gebrek aan kennis aangaande de analytische prestaties en de complexiteit van de data-analyse. In een recent gepubliceerde studie werd op RNA-sequensen gebaseerde metagenomics gebruikt voor de detectie van respiratoire virussen. De verkregen resultaten werden vergeleken met een commercieel PCR-panel. Voor de studie werd gebruik gemaakt van geselecteerde respiratoire virus-positieve ($n = 42$) en niet-geselecteerde ($n = 67$) pediatrische nasofaryngeale swabs.¹⁶ De data-analyse werd uitgevoerd met behulp van Taxonomer, een ultrasnelle, interactieve, web-gebaseerde metagenomics data-analysetool.¹⁷ Met metagenomics was de detectie mogelijk van 86 procent van de virussen in de bekend positieve monsters. Van de zes virussen die

niet gedetecteerd waren met metagenomics, konden er echter maar twee door een derde test worden bevestigd. Bij de niet geselecteerde monsters hadden de resultaten van metagenomics en de commerciële PCR-test een concordantie van 93 procent. De detectie met behulp van metagenomics toonde 12 additionele virussen aan, die niet werden gedetecteerd met de commerciële PCR-test door ofwel mutaties in de primersites of door de afwezigheid van primers voor de desbetreffende targets. De genormaliseerde virale lading, bepaald met behulp van metagenomics, correleerde met de virale lading bepaald met behulp van de commerciële PCR-test. Bovendien werd een hoge intra- en inter-bepaling reproduceerbaarheid gevonden. Gedeeltelijke of complete virale genoom-sequenties werden gegenereerd in 86 procent van de geanalyseerde testmonsters. Dit maakt het mogelijk om ook anti-virale resistentie en fylogenetische verwantschap te onderzoeken. Concluderend werd met deze techniek epidemiologisch en klinisch relevante informatie verkregen. Hoewel de doorlooptijden in deze studie te lang zijn (12 dagen) voor gebruik in de moleculaire diagnostiek, zijn inmiddels, mede door gebruik te maken van automatisering, doorlooptijden van twee dagen mogelijk.¹⁶

Software voor data-analyse

De grootste hobbel voor de introductie van NGS in een klinisch laboratorium is wellicht de data-analyse. Echter, zelfs met weinig kennis over bio-informatica is het mogelijk om zelf NGS-data-analyses uit te voeren (box 2). Met wgMLST is het mogelijk om bacteriën op genoomniveau te vergelijken door het verschil in allelen tussen de genomen te vergelijken. Belangrijk hierbij is om binnen het beroepenveld afspraken te maken over hoeveel allelen twee genomen mogen verschillen om deze verwant of gelijk te noemen. Hetzelfde probleem komt men tegen indien men genomen gaat vergelijken met behulp van een single-nucleotide polymorfisme (SNP)-analyse.¹⁸ Het voordeel van de wgMLST-benadering

Box 2. Software voor data-analyse

Softwarepakketten, zoals CLC Genomic Workbench (Qiagen), SPAdes en Velvet maken het mogelijk om snel en nauwkeurig een genoom te assembleren. De genetische verwantschap tussen isolaten kan, met behulp van whole genome multi-locus sequence typing (wgMLST), worden onderzocht met SeqSphere (Ridom) of een speciale module van BioNumerics (Biomerieux). wgMLST is ook mogelijk met behulp van de online tools Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk>) en BIGSdb (Bacterial Isolate Genome Sequence Database).¹⁹ Voor het opsporen van virulentie- of resistentiegenen kunnen de online tools VirulenceFinder of ResFinder van het Center for Genomic Epidemiology (www.genomicepidemiology.org) worden gebruikt als eerste screeningsmethode. Hiervoor is het alleen nodig de ruwe sequentiedata te uploaden. Verdere vergelijkingen en analyses van genomen zijn mogelijk met bijvoorbeeld Artemis, Artemis Comparison Tool (ACT) en DNA-plotter van het Sanger Instituut (www.sanger.ac.uk/science/tools).

is dat de compatibiliteit tussen oude en nieuwe typeringsmethoden is gewaarborgd. Zo geven de softwarepakketten BioNumerics en SeqSphere na analyse van de data het ST zoals bepaald door MLST en het *spa*-type (bij *Staphylococcus aureus*).

Voor het opsporen van virulentie- of resistentiegenen kunnen de online tools worden gebruikt als eerste screeningsmethode. Verdere vergelijkingen en analyses van genomen zijn ook mogelijk. Specifieke vraagstellingen vereisen echter de kennis van Unix computerbesturingsystemen en de diverse daarop draaiende programma's. Daarnaast is het voor sommige analyses noodzakelijk dan wel zeer wenselijk om computerscripts te programmeren en te gebruiken. Hiervoor is kennis van programmeertalen

zoals Python onontbeerlijk. Hoewel de kosten van sequensen de afgelopen jaren zijn gedaald, zijn de kosten voor data-opslag en data-analyse gestegen. Dit is te wijten aan de steeds groter wordende NGS-databestanden en de steeds complexer wordende data-analyses.

Concluderend kan worden gesteld dat NGS een steeds grotere rol zal gaan spelen binnen de medische microbiologie, niet alleen voor onderzoeksdoeleinden, maar ook voor het volgen van uitbraken, het ontwikkelen van uitbraakspecifieke PCRs, het bepalen van de juiste antibioticatherapie en de identificatie van pathogenen.

De referenties behorend bij dit artikel zijn te vinden op pagina 187.

Point-of-care-testen in de moleculaire diagnostiek van infectieziekten

A. van Belkum en E.C.J. Claas

Samenvatting

‘Point-of-care testing’ (POCT) is een relatief nieuwe vorm van direct patiënt-georiënteerd onderzoek waarbij de analyses in geval van ziekenhuisopnames ‘aan het bed’ kunnen worden uitgevoerd. Dit heeft als resultaat dat zowel de clinicus als de patiënt snel antwoorden krijgt op vragen die van belang zijn voor het in te zetten therapeutisch traject of het aanvragen van additionele testen. Snelheid is hier de cruciale term, hoewel ook de gevoeligheid en specificiteit van testen een belangrijk gebruikscriterium is. POCT is een relatief recente ontwikkeling en de toepassing is niet altijd eenvoudig. Vooral het feit dat de testen buiten het klassieke laboratorium en vaak door medewerkers in de zorg zonder specifieke laboratoriumopleiding worden uitgevoerd, wordt vaak als een belemmering gezien, zeker met het oog op de kwaliteitsborging in geaccrediteerde diagnostische laboratoria. Verder zijn ook kosten en de soms onduidelijke balans met de klinische baten een belangrijk discussiepunt. We bespreken de aard van POCT en proberen antwoorden aan te leveren op een aantal pertinente vragen rond de moleculaire versies van POCT.

Summary

Point-of-care testing (POCT) is a relatively new form of patient-oriented diagnostics in which the analyses can be carried out ‘at bedside’ in case of hospitalization. This generates test results that facilitate quick answers for both the clinician and the patient to questions that are important for therapeutic management or for additional tests. The key is speed, although sensitivity and specificity of testing is an important criterion for successful use as well. Application of POCT is not always easy. Especially the fact that the tests are conducted outside the traditional laboratory and often by health care workers without specific laboratory training may be seen as an obstacle, especially in relation to quality control and laboratory accreditation. Furthermore, costs, balance between costs and clinical benefit and a number of additional parameters are still subject to considerable debate. We here discuss the nature of POCT and try to provide answers to some pertinent questions regarding the functioning of molecular POCT.

Trefwoorden

Moleculaire diagnostiek, PCR, point-of-care, POCT, toepassing, kwaliteitscontrole.

Moleculaire diagnostiek van infectieziekten: een korte historie

De moleculaire diagnostiek van infectieziekten heeft het laatste decennium een significante vlucht genomen. Nadat eerst immunologische testen sterk waren verbeterd, werd daarna ‘polymerase chain reaction’ (PCR) ontwikkeld en aangepast voor kwantitatieve en real-time detectie van meerdere pathogenen in een enkele test en in sommige gevallen gecombineerd met nadere analyses, zoals DNA-sequencing.¹ Letterlijk duizenden PCR-testen voor alle denkbare ziekteverwekkers en combinaties van pathogenen, maar ook andere relevante biomarkers, werden ontwikkeld en het aantal publicaties over testontwikkelingen en klinische applicaties is enorm. Een simpele zoektocht op PubMed met de trefwoorden “PCR” en “infection” levert bijna 58.000 publicaties op. Een groot aantal diagnostische bedrijven heeft een fors aantal van deze testen vercommercialiseerd en daarmee geïntroduceerd in de routine van klinisch-microbiologische laboratoria.²

Hoewel deze testen belangrijk zijn in het klinisch diagnostisch laboratorium, zijn er verschillende parameters die overwogen dienen te worden alvorens tot implementatie over te gaan. Heeft men echt behoefte aan de exclusieve gevoeligheid van een PCR? Is de hoge snelheid echt nodig en, even belangrijk, zijn moleculaire testen wel echt zo snel? Wat is de klinische relevantie van de detectie van kleine hoeveelheden bacteriën of virusdeeltjes? Kan infectie worden onderscheiden van kolonisatie?

A. van Belkum, bioMérieux, Chief Scientific Officer, Scientific Office 3, Route de Port Michaud, 38390, La Balme Les Grottes, Frankrijk, E.C.J. Claas, Leids Universitair Medisch Centrum, Moleculair Medisch Microbioloog, Afdeling Medische Microbiologie, Albinusdreef 2, 2333 ZA, Leiden. Correspondentieadres: tel. +33 609 487 905, e-mail: alex.vanbelkum@biomerieux.com

Moleculaire testen vinden alleen datgene waar je specifiek naar zoekt. Is het voldoende om specifieke 'single target'-testen te ontwikkelen of is een meer generiek, alomvattend 'catch-all'-testsysteem beter? Hoe zit het met de kostenaspecten? Is er behoefte aan gespecialiseerde instrumenten, een specifieke infrastructuur en/of hoogwaardig, goed getraind personeel? Hoe borgen we de kwaliteit van deze testen? Antwoorden op dit soort vragen zijn bepalend voor de (on)zin van moleculaire testen.³ Voor het voeren van deze discussie gaat het te ver om alle bestaande testen te bespreken. De observatie dat een grote verscheidenheid aan moleculaire testen de laatste jaren is geïntroduceerd in medisch-microbiologische laboratoria is voldoende. Hierdoor is het serviceniveau van die laboratoria sterk verbeterd: veel verschillende pathogenen kunnen, soms tegelijkertijd, met hoge gevoeligheid en zelfs kwantitatief gedetecteerd worden. Naast species-identificatie kunnen ook bepaalde intrinsieke of verkregen eigenschappen (bijvoorbeeld antibioticumresistentie in Methicilline Resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycine-resistente enterokok (VRE) en carbapenem-resistente *Enterobacteriaceae* (CRE) geanalyseerd worden. Voor specifieke klinische materialen geldt dat er snelle detectie van een veelheid aan pathogenen simultaan mogelijk is. De belangrijkste vraag waar we in de rest van ons verhaal een antwoord op zoeken, is of de huidige stand van de moleculaire diagnostiek het toelaat om bestaande testen buiten het diagnostisch laboratorium uit te voeren.

Achtergrond en ontwikkeling van POC

Point-of-care testing (POCT of 'bed-side testing') wordt gedefinieerd als elke vorm van medisch testen die wordt uitgevoerd waar de diagnostische nood hoog is en waar de patiënt er het meest mee gediend is.⁴ In tegenstelling tot klassieke diagnostiek vindt POCT plaats buiten de geijkte omgeving en in het geval van detectie van infectieuze organismen in het medisch-microbiologisch laboratorium. Dit neemt niet weg dat POCT ook gebruik kan maken van klassieke microbiologische technieken.⁵ Een alternatieve definitie van POCT is: POCT omvat analyses die niet in een specifiek laboratorium uitgevoerd dienen te worden.⁶ Echter, beide bovenstaande definities zijn nogal 'product-centraal'. Een tweede alternatieve definitie van POCT zou meer *doelgericht* kunnen zijn: POCT levert diagnostische resultaten die leiden tot snelle, heldere en actieve beslissingen aangaande de behandeling van een patiënt of de behoefte aan een confirmatietest.⁶ De meest efficiënte vorm van POCT is syndroomgeoriënteerd: testen die gelijktijdig een heel panel aan virussen, bacteriën en parasieten kunnen detecteren zijn al beschikbaar voor respiratoire infecties, gastro-enteritis en meningitis.⁷

POCT elimineert primair de behoefte aan (potentieel langdurig en kwaliteit ondermijnend) transport van het

klinisch materiaal. De tijdsduur van de diagnostiek kan hiermee worden verkleind tot uren in plaats van dagen. In het geval van de toch al snelle moleculaire diagnostiek kan de duur van uren tot minuten worden verkort. In principe is POCT permanent (24/7) beschikbaar en hiermee wordt een 'personalized and pre-emptive diagnosis' haalbaar. POCT-instrumenten zijn vaak draagbaar en specifieke laboratoriumexpertise is normaliter onnodig. Als een POC-test een grote therapeutische impact kan hebben, worden vanzelfsprekend aan de gevoeligheid en specificiteit van zulke testen terecht hoge eisen gesteld. In de moleculaire diagnostiek is POCT synoniem aan kleine, relatief goedkope apparatuur (al dan niet batterijgevoed), kant-en-klare en test-cassettes voor eenmalig gebruik met een korte testtijd (maximaal een uur) en een 'sample in, result out'-format. POCT voor infectieziekten maakt veel gebruik van PCR, maar dat is zeker niet exclusief.⁸

Recent zijn er richtlijnen betreffende de aard en specificaties van POC-testen gepubliceerd. Deze zijn collectief bekend als de ASSURED-richtlijnen: Affordable, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid & Robust, Equipment-free, Delivered (bij de eindgebruiker).⁹ POCT moet ook onderworpen worden aan NEN- en ISO-certificering, met zelfs een specifieke ISO22870-norm voor POCT. Hierbij wordt een groot aantal kwaliteitscriteria toegepast waaronder mobiliteit, toegankelijkheid, monitoring op afstand, management van het instrument, gebruiksvriendelijkheid, kwaliteitscontrole en nakoming van kwaliteitsparameters. Vanzelfsprekend worden POC-testen in het ontwikkeltraject beoordeeld door de Food and Drug Administration (FDA) en is CE-certificering noodzakelijk voor succesvolle commerciële introductie.

De betekenis van POC in de moleculaire diagnostiek

Snelle, eenvoudig bruikbare diagnostische tests – bij voorkeur 'multi-analyte' – zijn essentieel voor de detectie van pathogenen en de vertaling van de resultaten in klinisch bruikbare adviezen in een zo kort mogelijke tijd. Echter, de transitie van standaard diagnostische zorg is traag (medische microbiologie is een conservatief vakgebied) en gaat gepaard met uitdagingen in zowel de organisatie als in wettelijke aspecten. Laboratoria hebben vaak langdurige contracten met de leveranciers van diagnostische testen, wat de overgang naar snellere testen vertraagd. Doordat klinische studies tijdrovend en kostbaar zijn, zit ook in het traject van testontwikkeling een vertragende component. Echter, de meerwaarde van snelle testen is onomstotelijk vastgesteld, zeker als het gaat om de diagnose en behandeling van acute ziektebeelden met mogelijk infectieuze grondslag.¹⁰ De klinische noodzaak is duidelijk: acuut zieke patiënten hebben behoefte aan de snelst mogelijke diagnostiek om de juiste behandeling tijdig vorm te geven en zo onjuist gebruik van antibiotica tegen te gaan (en daarmee resistentie voor te blijven)

en morbiditeit en mortaliteit te reduceren. Patiënten met vermoede sepsis hebben een sterk afnemende overlevingskans met elk uur dat therapie – lees: adequate diagnostiek – uitblijft. POCT maakt gebruik van verschillende technieken, maar momenteel leveren de moleculaire testen de beste prestaties.

Wat is de plaats van moleculaire POCT van infectieziekten?

Klassieke moleculaire diagnostiek vindt plaats in gespecialiseerde laboratoria. De complexiteit van de klassieke testen en de biologische risico's van nucleïnezuuramplificatie maakten dit een vereiste. Echter, de huidige generatie moleculaire testen kunnen probleemloos buiten een laboratorium worden uitgevoerd. De voorbehandeling van de klinische materialen en de extractie van nucleïne-zuren zijn geïntegreerd in het instrument en ook de detectietesten zijn geprefabriceerd. Testen zijn 'single use' en na afloop van de moleculaire testen kunnen cassettes weggegooid worden zonder risico op contaminatie. Dit elimineert de behoefte aan externe manipulatie met vloeistof waarmee een praktische belemmering wordt weggenomen. Na de test wordt de uitkomst automatisch weergegeven en resultaten zijn meestal 'mobiel', waardoor ze per e-mail, app of telefoon kunnen worden doorgegeven aan de eindgebruiker(s). POCT levert directe antwoorden op vragen die niet alleen door behandelend artsen worden gesteld, maar ook door patiënten zelf. Het feit dat patiënten sneller antwoord kunnen krijgen op meer vragen wordt als waardevol gezien voor patiënttevredenheid. Het is van belang zich te realiseren dat de aanschaf en uitvoer van *in vitro*-testen niet een compleet raamwerk van POCT levert. Het is van groot belang om ook snelle communicatiesystemen te ontwerpen en een infrastructuur op te stellen die een snelle toepassing van een therapie mogelijk maken.⁶ Aanpassing van het laboratorium- of zelfs het ziekenhuis-informatiesysteem is meestal onvermijdbaar.

Wat moet er (technisch) nog gebeuren om dit te realiseren?

Er is al een behoorlijk panel aan moleculaire POC-testen voorhanden,¹¹ dus technisch zijn er niet veel overblijvende vereisten. De duur van de testen kan nog verder verkort worden (minuten in plaats van uren is technisch mogelijk zonder de gevoeligheid van de test aan te tasten) en ook het aantal beschikbare panels kan worden uitgebreid. Verder gaat de voorkeur, vanzelfsprekend, uit naar het gebruik van minimaal-invasieve procedures voor het verkrijgen van klinisch materiaal.

Drie wat meer fundamentele zaken staan brede applicatie nog in de weg. Ten eerste zijn moleculaire POC-testen nog relatief duur. Met een toenemende concurrentie en bredere toepassing zullen de prijzen ongetwijfeld gaan dalen. Ten tweede wordt het in verschillende landen als probleem

ervaren dat testen die voorheen in een centraal laboratorium werden uitgevoerd, nu door 'leken' in een perifeer laboratorium of in een verpleegruimte worden uitgevoerd. Hiervoor bestaat behoefte aan ruimer professioneel en misschien ook politiek draagvlak.¹² Totdat dit soort territoriale problemen zijn opgelost, zal snelle introductie van POCT lastig blijven. Ten derde zijn patiënten voor wie de diagnostische nood het hoogst is, vaak het moeilijkst bereikbaar. Ook hiervoor dienen de kosten verlaagd te worden en moeten logistieke problemen opgelost worden. Gebruik van POCT in ontwikkelingslanden stelt soms ook additionele kwaliteitseisen aan de testen. Denk hierbij bijvoorbeeld aan temperatuurtolerantie of gebruik bij hoge vochtigheidsgraad.

De kwaliteit van de test blijft voorop staan en ook moet het testen zelf, alsmede de interpretatie van de resultaten, in alle gevallen eenduidig zijn. Ten slotte en eveneens vanzelfsprekend: POCT kan ook in een bestaand laboratorium worden uitgevoerd, maar dan gaat kostbare tijd verloren met veelal overbodige logistieke handelingen.

Hoe lang duurt het voordat hier in de diagnostiek mee kan worden gewerkt?

Elk microbiologisch laboratorium kan vandaag besluiten om bepaalde analyses POC uit te voeren. De testen bestaan en zijn simpel en eenvoudig uitvoerbaar buiten het laboratorium. Introductie vergt een beetje durf, maar met precieze monitoring van kwaliteit zal brede acceptatie snel volgen. Buiten het technische aspect van de uitvoering geldt ook dat het uiteindelijke gebruik van het testresultaat aan strikte controle moet worden onderworpen. Het snel binnenhalen van een betrouwbaar resultaat moet gekoppeld worden aan een juiste interpretatie en een goede vertaling naar een therapeutisch traject.¹³ Recent zijn spectaculaire resultaten gerapporteerd over POCT van tuberculose bij hiv-positieve patiënten.¹⁴ Snelle detectie in urine kon gebruikt worden om anti-tuberculosebehandeling te optimaliseren, resulterend in een lagere mortaliteit. De uitvoering van de test en het uiteindelijk correct interpreteren van een testuitslag zijn zaken die afzonderlijk beschouwd dienen te worden. In sommige gevallen is POCT haalbaar, maar zal de interpretatie centraal moeten worden uitgevoerd. Medische kosten moeten tenslotte verhaald kunnen worden, soms op de patiënt maar in veel gevallen op de ziektekostenverzekering. Voor alle betrokkenen dienen goede afspraken gemaakt te worden over de financiële consequenties. De potentieel hogere kosten van POCT dienen in alle gevallen afgewogen te worden tegen het klinisch resultaat en medisch gewin voor de patiënt: kosten en gewin dienen in balans te zijn. Overtuigend bewijs over kosteneffectiviteit van POCT voor tuberculose, malaria en syfilis is al beschikbaar.⁷

Het bovenstaande betoog is vooral gespitst op de ziekenhuissituatie. Echter, ook andere vormen van POCT zijn

denkbaar, zoals in de ambulance, in de thuiszorg, bij de huisarts, tijdens gedecentraliseerde therapie, in verzorgingstehuizen en zelfs 'on the road' in moeilijk bereikbare gebieden. De discussie waar 'point-of-care' echt een meerwaarde is, is nog niet afgerond en is van een veelheid aan factoren afhankelijk. Zelfs de manier waarop POCT wordt gedefinieerd kan implicaties hebben op het gebruik en zelfs op de vergoeding door een verzekeraar.¹⁵ Voor al deze vormen van POCT zullen de randvoorwaarden subtiel van elkaar verschillen. Belangrijkste blijft om de voordelen van tijdswinst te blijven afwegen tegen de gecombineerde effecten van betere medische zorg, in sommige gevallen tegen hogere kosten. Wel dient gewaakt te worden voor onnodig testen. Als het uitvoeren van een test eenvoudig en snel is zal een lagere drempel voor het gebruik kunnen ontstaan. Indien toepassing van POCT geen directe medische consequenties heeft, is er geen directe meerwaarde en dient het vermeden te worden.

De toekomst van POC

Verdere miniaturisering zal plaatsvinden, evenals versnelling van de apparatuur en de methodiek. Nanotechnologie en microfluidics zijn belangrijk voor de technische ontwikkeling,¹⁶ terwijl ook verbetering van de nucleïnezuurextractie en bijvoorbeeld optimalisering van de enzymkwaliteit een continu proces is. Dat geldt ook voor uitbreiding van het aantal panels of het aantal te detecteren pathogenen. Uitwisseling van gegevens met gebruik van smartphonetechnologie levert een universele oplossing voor communicatieproblemen, zelfs in afgelegen gebieden: de draagbare telefoon is overall! Ook de (klinisch) microbioloog zal begrijpen dat dit een pad is dat uiteindelijk ingeslagen gaat worden. Immers: POCT moet te allen tijde 'point-of-need testing' blijven.¹⁷

Hoewel voor sommige testen tijdswinst essentieel is, zal voor een groot aantal belangrijke testen de laboratoriumomgeving noodzakelijk blijven. Het medisch microbiologisch laboratorium houdt een beperkter aantal kerntaken, maar dient betrokken te blijven bij de initiële validatie van nieuwe POC-testen, interpretatie van resultaten, borging van de resultaten in het patiëntendossier, externe kwaliteitsanalyse (rondzendingen) en de integratie van verbeteringen in bestaande POC-testen. Mogelijkerwijs kan het aantal laboratoria verminderd worden en krijgen de resterende laboratoria meer een functie als epidemiologisch of referentie-instituut. Het POCT-tijdperk is nabij!

Alex van Belkum is werknemer bij bioMérieux. De meningen en conclusies in dit artikel zijn exclusief die van de auteur en zijn niet noodzakelijkerwijs identiek aan die van bioMérieux.

Referenties

1. Zumla A, Al-Tawfiq JA, Enne VI, Kidd M, Drosten C, Breuer J, et al. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections--needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis* 2014;14:1123-35.
2. St John A, Price CP. Existing and emerging technologies for Point-of-Care Testing. *Clin Biochem Rev* 2014;35:155-67.
3. Jenum S, Dhanasekaran S, Lodha R, Mukherjee A, Kumar Saini D, et al. Approaching a diagnostic point-of-care test for pediatric tuberculosis through evaluation of immune biomarkers across the clinical disease spectrum. *Sci Rep* 2016;6:18520.
4. MUSAAD SM, Herd G. Point-of-care testing governance in New Zealand: a national framework. *N Z Med J* 2013;126:72-9.
5. DaCosta RS, Kulbatski I, Lindvere-Teene L, Starr D, Blackmore K, Silver JI, et al. Point-of-care autofluorescence imaging for real-time sampling and treatment guidance of bioburden in chronic wounds: first-in-human results. *PLoS One* 2015;10:e0116623.
6. Pai M, Ghiasi M, Pai NP. Point of care diagnostic testing in global health: what is the point? *Microbe* 2015;10:103-7.
7. Drancourt M, Michel-Lepage A, Boyer S, Raoult D. The point-of-care laboratory in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:429-47.
8. Hsieh K, Ferguson BS, Eisenstein M, Plaxco KW, Soh HT. Integrated electrochemical microsystems for genetic detection of pathogens at the point of care. *Acc Chem Res* 2015;48:911-20.
9. Wu G, Zaman MH. Low-cost tools for diagnosing and monitoring HIV infection in low-resource settings. *Bull WHO* 2012;90:914-20.
10. Davids M, Dheda K, Pant Pai N, Cogill D, Pai M, Engel N. A Survey on use of rapid tests and tuberculosis diagnostic practices by primary health care providers in South Africa: implications for the development of new Point-of-Care tests. *PLoS One* 2015;10:e0141453.
11. Dunne W.M, Van Belkum A. Molecular and genomic methods for antimicrobial susceptibility testing. *Exper Rev Mol Diagn* 2017, in press.
12. Kaman WE, Elshout G, Bindels PJ, Mitsakakis K, Hays JP. Current problems associated with the microbiological point-of-care testing of respiratory tract infections in primary care. *Future Microbiol* 2016;11:607-10.
13. Kutz A, Hausfater P, Oppert M, Alan M, Grolimund E, Gast C et al. Comparison between B·R·A·H·M·S PCT direct, a new sensitive point-of-care testing device for rapid quantification of procalcitonin in emergency department patients and established reference methods – a prospective multinational trial. *Clin Chem Lab Med* 2016;54:577-84.
14. Peter JG, Zijenah LS, Chanda D, Clowes P, Lesosky M, Gina P, et al. Effect on mortality of point-of-care, urine-based lipoarabinomannan testing to guide tuberculosis treatment initiation in HIV-positive hospital inpatients: a pragmatic, parallel-group, multicountry, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387:1187-97.
15. Hänscheid T, Rebelo M, Grobusch MP. Point-of-care tests: where is the point? *Lancet Infect Dis* 2014;14:922.
16. Egatz-Gomez A, Wang C, Klacsmann F, Pan Z, Marczak S, Wang Y et al. Future microfluidic and nanofluidic modular platforms for nucleic acid liquid biopsy in precision medicine. *Biomicrofluidics* 2016;10:032902.
17. Natoli L, Guy RJ, Shephard M, Whiley D, Tabrizi SN, Ward J et al. Public health implications of molecular point-of-care testing for chlamydia and gonorrhoea in remote primary care services in Australia: a qualitative study. *BMJ Open* 2015;5:e006922.

Het influenzaseizoen 2015/2016 in Nederland: beheerst door influenza A(H1N1)pdm09- en B/Victoria/2/87-lijn-virussen

J.C. de Jong, A. Meijer, G.A. Donker, W. van der Hoek, M.M.A. de Lange, G.F. Rimmelzwaan, M.P.G. Koopmans

Samenvatting

De influenza-epidemie van het seizoen 2015/2016 begon in week 1 van 2016 en duurde 11 weken. In week 7 was de incidentie maximaal met 14,7 geregistreerde patiënten met influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) per 10.000 inwoners.

De A(H1N1)pdm09-virussen domineerden. Virussen van dit subtype zijn sinds de pandemie van 2009 antigenetisch niet significant veranderd en het gebruikte vaccin was tegen deze virussen dus optimaal werkzaam. Evenals in het voorgaande seizoen, behoorde het circulerende A(H1N1)pdm09-virus fylogenetisch tot clade 6B.1.

Daarnaast werden ook frequent influenza B-virussen van de fylogenetische lijn B/Victoria/2/87 (clade 1A) waargenomen. Binnen deze lijn was sinds het seizoen 2013/2014 wel antigene drift opgetreden. Het in 2015/2016 gebruikte vaccin bevatte echter een virus van de lijn B/Yamagata/16/88, zodat de vaccinstam dus niet overeenkwam met de meeste B-virussen. Bij de zelden aangetroffen virussen van de B/Yamagata/16/88-lijn (clade 3) werd, vergeleken met seizoen 2013/2014, geen significante antigene drift geconstateerd.

Influenza A(H3N2)-virussen werden weinig frequent gedetecteerd. Fylogenetisch behoorden de meeste tot clade 3C.2a en enkele tot clade 3C.3b, die beide het voorgaande seizoen ook al circuleerden.

Voor het seizoen 2015/2016 op het noordelijk halfrond had de WHO de volgende vaccinsamenstelling aanbevolen:¹

- voor A(H1N1)pdm09: een A/California/7/2009-achtig virus;
- voor A(H3N2): een A/Switzerland/9715293/2013-achtig virus;
- voor B: een B/Phuket/3073/2013-achtig virus, van de lijn B/Yamagata/16/88.

Van de 1247 geteste virussen was er één A(H1N1)pdm09-virusisolaat, dat een sterk verminderde gevoeligheid voor oseltamivir vertoonde. Een deel van de virussen in dit isolaat bevatte de H275Y-aminozuursubstitutie in het neuraminidase. Eén A(H3N2)

virus vertoonde sterk verminderde gevoeligheid voor oseltamivir en zanamivir, mogelijk veroorzaakt door de aangetroffen E105K-aminozuursubstitutie.

Abstract

The influenza epidemic in the 2015/2016 season in the Netherlands lasted for 11 weeks. The antigenically unchanged A(H1N1)pdm09-viruses prevailed. Also influenza B viruses from the phylogenetic lineage B/Victoria/2/87 were frequently detected. These were shown to differ antigenically from viruses of this lineage circulating since the 2013/2014 season. In contrast, the few isolated influenza B viruses from the phylogenetic lineage B/Yamagata/16/88 did not display substantial antigenic drift. Influenza A(H3N2)-viruses were rarely observed in the 2015/2016 season. Whether they deviated antigenically from the A(H3N2)-viruses circulating in the previous season could not be assessed.

Trefwoorden

Influenza, antigene drift, epidemiologie, vaccin, antivirale middelen.

Influenzavirussen

Influenzavirussen worden onderverdeeld in de typen A, B, C en D. Binnen type A worden subtypen

G.F. Rimmelzwaan, M.P.G. Koopmans, J.C. de Jong, virologen, Erasmus MC, afdeling Viroscience, Nationaal Influenza Centrum, Rotterdam, G.A. Donker, huisarts-epidemioloog, NIVEL Zorgregistraties eerste lijn, Peilstations, Utrecht, A. Meijer, viroloog, RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Bilthoven, W. van der Hoek, arts-epidemioloog, RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Bilthoven, M.M.A. de Lange, epidemioloog, RIVM, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Centrum Infectieziektebestrijding, Bilthoven.
Correspondentieadres: J.C. de Jong, Erasmus MC, afdeling Viroscience, Nationaal Influenza Centrum, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam, e-mail: jong7662@planet.nl.

onderscheiden, waarvan A(H₃N₂) en A(H₁N₁)pdm09 bij de mens voorkomen.³ Binnen type B circuleren twee fylogenetische lijnen, de B/Victoria/2/87-lijn en de B/Yamagata/16/88-lijn, die ook anti-genetisch verschillen.³ Alle vier genoemde soorten influenza virus ondergaan regelmatig kleine antigenen veranderingen ('antigenen drift') die kunnen worden gekwantificeerd met de haemagglutinatieremmingstest (HAR).^{2,4} Het influenzavaccin dat nu in Nederland wordt gebruikt, bevat geïnactiveerd virus van beide A-subtypen en één van de twee B-lijnen en wordt jaarlijks door de WHO eventueel aangepast aan de antigenen veranderingen.

Influenzasurveillance

In Nederland wordt de influenzasurveillance uitgevoerd door NIVEL, het Nederlands Instituut voor Onderzoek van de Gezondheidszorg te Utrecht, en het Nationaal Influenza Centrum (NIC), een samenwerkingsverband van het Erasmus Medisch Centrum (NIC-Erasmus MC) te Rotterdam en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (NIC-RIVM) te Bilthoven.

De veertig huisartspeilstations participeren in NIVEL Zorgregistraties eerste lijn registreren wekelijks het aantal bij hen consulterende IAZ-patiënten, waaruit NIVEL de landelijke IAZ-incidentie berekent.⁵ Tevens worden wekelijks steekproefsgewijs genomen neus- en keelmonsters afkomstig van bovengenoemde patiënten met IAZ of een andere acute respiratoire infectie (ARI) door het NIC-RIVM onderzocht op de aanwezigheid van influenza virus, RS-virus, rinovirus en enterovirus en influenzavirus uit positieve monsters gekweekt. Daarnaast ontvangt het NIC-Erasmus MC influenzavirusisolaten en influenzaviruspositieve klinische monsters van diagnostische ziekenhuislaboratoria. Bij voldoende hoge virale lading (lage Ct-waarde in RT-PCR) wordt geprobeerd uit de klinische monsters influenzavirus te kweken.

Een deel van de zo verkregen virusisolaten wordt in het NIC-Erasmus MC nader geanalyseerd met de HAR.⁴ Geven antisera bereid met virussen van voorgaande seizoenen tegen virussen van het afgelopen seizoen antilichaamtiter die een factor vier of meer lager zijn dan de corresponderende homologe titers, dan is er sprake geweest van

antigenen drift. Geven antisera bereid met vaccinvirussen gebruikt in het afgelopen seizoen tegen epidemische virussen van het afgelopen seizoen antilichaamtiter die een factor vier of meer lager zijn dan de corresponderende homologe titers, dan is er sprake geweest van een antigenen mismatch.

Daarnaast worden de virussen uit de peilstations en uit de diagnostische laboratoria onderzocht op gevoeligheid voor antivirale middelen in respectievelijk NIC-RIVM en NIC-Erasmus MC.^{6,7} Ziekenhuizen verzenden uit zichzelf virussen die resistent zijn tegen neuraminidaseremmers naar het NIC-RIVM voor nader onderzoek.

Wekelijks worden de resultaten doorgegeven aan het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) in Stockholm en de WHO in Kopenhagen (Europees regionaal) en Genève (mondiaal). Tevens wordt een selectie van de virusisolaten naar het WHO Collaborating Centre in Londen verzonden. Jaarlijks brengt de WHO in februari en september in Genève advies uit over de vaccinsamenstelling voor het daaropvolgende influenzaseizoen op het noordelijk respectievelijk zuidelijk halfrond.^{8,9}

Resultaten en discussie

De influenza-epidemie van het seizoen 2015/2016

Gegevens van NIVEL Zorgregistraties eerste lijn lieten zien dat de influenza-epidemie van het seizoen 2015/2016 in week 1 van 2016 de epidemische drempel overschreed van 5,1 patiënten met influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) per 10.000 inwoners (figuur 1). Met 11 weken duurde de epidemie wat langer dan de gemiddelde lengte van een influenza-epidemie van 8 weken. De incidentie was in week 7 maximaal met 14,7 geregistreerde IAZ patiënten per 10.000 inwoners.

Overzicht van de onderzochte influenzavirussen

In het seizoen 2015/2016, weken 40 van 2015 tot en met 20 van 2016, werden door het NIC 3403 influenzavirussen onderzocht: 428 afkomstig uit de NIVEL/RIVM-influenzasurveillance en 2975 door het Erasmus MC ontvangen van diagnostische laboratoria (tabellen 1 en 2 en figuren 2 en 3). Evenals in vorige seizoenen, kon een aanzienlijk deel waarmee een kweekpoging is gedaan,

Tabel 1. Influenzavirusdetecties (n = 559) door het NIC-RIVM in respiratoire monsters van patiënten met IAZ of een acute respiratoire infectie gemeld door de peilstations van week 40 van 2015 tot en met week 20 van 2016

Type A		Type B	
Nederland: 263 (47 procent)		Nederland: 296 (53 procent)	
Gesubtypeerd ¹⁾		Fylogenetische lijn bepaald ¹⁾	
A(H ₁ N ₁)pdm09: 254 (97 procent)	A(H ₃ N ₂): 9 (3 procent)	B/Victoria/2/87: 283 (96 procent)	B/Yamagata/16/88: 13 (4 procent)

¹⁾Bij deze monsters kon wegens onvoldoende virus geen nadere analyse met kweek of PCR worden verricht.

Tabel 2. Influenzavirussen (n = 2975) ontvangen door het NIC-Erasmus MC uit Nederlandse diagnostische laboratoria van week 40 van 2015 tot en met week 20 van 2016

Type A: 2028 (68 procent)		Type B: 947 (32 procent)	
Gesubtypeerd: 1920 (95 procent)		Niet gesubtypeerd 1): 108 (5 procent)	
Fylogenetische lijn bepaald: 847 (89 procent)		Onbepaald 1): 100 (11 procent)	
A(H1N1): 1882 (98 procent)	A(H3N2): 38 (2 procent)	B/Victoria/2/87: 796 (94 procent)	B/Yamagata/16/88: 51 (6 procent)

1) Bij deze monsters kon wegens onvoldoende virus geen nadere analyse met kweek of PCR worden verricht.

niet worden gekweekt. Bij de virussen uit de peilstations was type A wederom dominant (61 procent), waarbij de A(H1N1)pdm09-virussen overheersten (97 procent van de type A-virussen, *tabel 1*). Bij type B (39 procent) waren vrijwel alle virussen van de B/Victoria/2/87-lijn (96 procent). Van een aanzienlijk aantal kon een virus gekweekt worden. Bij de virussen uit diagnostische ziekenhuislaboratoria domineerde zoals gewoonlijk type A nog meer (68 procent), met A(H1N1)pdm09 weer als meest voorkomend subtype (98 procent van de type A virussen, *tabel 2*). Bij type B werden ook hier vooral virussen van de B/Victoria/2/87-lijn gevonden (94 procent).

Karakterisering influenza A(H1N1)pdm09-virussen

Sinds het pandemisch verschijnen van A(H1N1)pdm09 in 2009 is er binnen dit subtype geen significante antigene drift opgetreden en heeft het vaccin derhalve optimale bescherming tegen de epidemische A(H1N1)pdm09-virussen geboden (*tabel 3*). Fylogenetische analyse lokaliseerde alle willekeurig geselecteerde 43 onderzochte A(H1N1)pdm09-influenzavirussen in clade 6B.1.

Karakterisering influenza A(H3N2)-virussen

Het was voor ons niet mogelijk de influenza A(H3N2)-virussen antigeen te karakteriseren. De meeste van het dit seizoen kleine aantal gedetecteerde virussen van

dit subtype bleken niet te kweken. Ook is onlangs twijfel gerezen of de traditioneel uitgevoerde HAR met A(H3N2)-virussen betrouwbare informatie geeft. Er zijn aanwijzingen dat de hemagglutinatie van de recente A(H3N2)-virussen niet meer verloopt via het hemagglutinine, maar via het neuraminidase.¹⁰ Het gebruik van oseltamivir zou hemagglutinatie door neuraminidase voorkomen en weer doen berusten op het hemagglutinine. Later werden deze waarnemingen bevestigd, ook door ons laboratorium. De meeste van de weinige gekweekte A(H3N2)-virussen uit het afgelopen seizoen vertoonden echter helemaal geen HA-activiteit, terwijl van de wel hemagglutinerende virussen de HA-titer bij toevoeging van 20 nM oseltamivir zo sterk daalde dat het virus onbruikbaar werd voor de HAR. De oplossing van dit probleem ligt in het gebruik van een virusneutralisatietest die momenteel in ontwikkeling is.

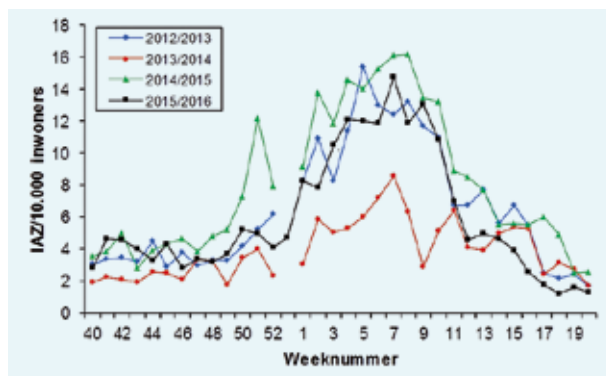
Op het NIC werden vijf A(H3N2)-virussen fylogenetisch geanalyseerd. Hiervan behoorden er twee tot clade 3C.3b en drie tot clade 3C.2a. In Europa werden voornamelijk virussen uit clades 3C.2a (74 procent) en 3C.3a (24 procent) gevonden.¹¹ De meeste virussen van clade 3C.3b zijn antigenetisch verschillend van de vaccinreferentiestam A/Switzerland/9715293/2013 (vaccinismatch). Volgens de WHO lijken virussen van clades 3C.2a en 3C.3a antigenetisch op de vaccinreferentiestam A/Switzerland/9715293/2013, dat behoort tot clade 3C.3a.¹² In februari 2016 adviseerde de WHO de huidige A(H3N2)-vaccinreferentiestam A/Switzerland/9715293/2013 opnieuw te gebruiken voor het komende seizoen.⁸

Karakterisering van influenza B-virussen van de B/Victoria/2/87-lijn

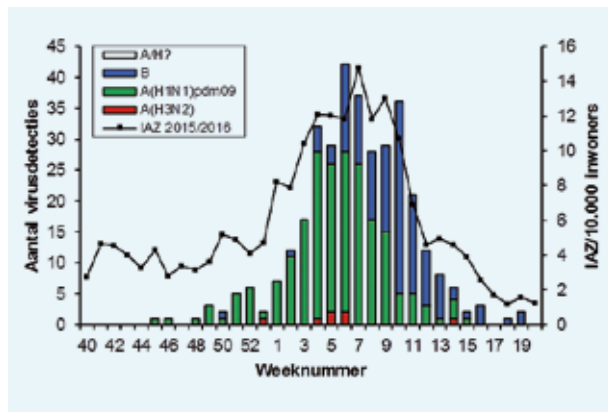
Binnen de influenza B/Victoria/2/87-lijn is er duidelijk antigene drift waarneembaar tussen de seizoenen 2011/2012 en 2015/2016. Antisera tegen B/Netherlands/441/2012 en B/Netherlands/2241/2013 gaven titers tegen virussen uit 2015/2016 die mediaan 4- respectievelijk 16-voudig lager waren dan de corresponderende homologe titers (*tabel 4*).

Fylogenetische analyse liet zien dat alle 36 onderzochte B/Victoria/2/87-lijnvirussen van 2015/2016 behoorden tot clade 1A. Hierin bevindt zich vaccinreferentiestam

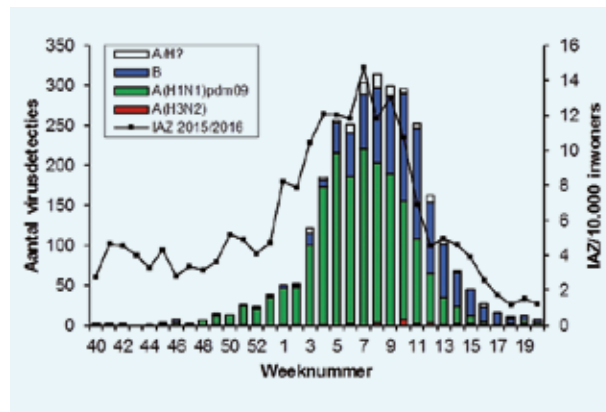
Figuur 1. Klinische influenza-activiteit in Nederland in de seizoenen 2012/2013 tot en met 2015/2016 (rode lijn) weergegeven als het wekelijkse aantal patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) per 10.000 inwoners, aangemeld bij de peilstations. Bron: NIVEL Zorgregistraties eerste lijn.



Figuur 2. Virusdetecties in het influenzaseizoen 2015/2016 in door de peilstations afgenomen monsters van patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ). Afgebeeld zijn de wekelijkse aantallen influenzavirusdetecties, opgesplitst naar (sub)type. De aantallen zijn weergegeven als balken, af te lezen op de linker verticale as. Bron: RIVM. Tevens is weergegeven het aantal IAZ per 10.000 inwoners per week, af te lezen op de rechter verticale as. Bron: NIVEL Zorgregistraties eerste lijn.



Figuur 3. Virussen in het influenzaseizoen 2015/2016 verzonden naar het Erasmus MC vanuit diagnostische ziekenhuislaboratoria. Afgebeeld zijn de wekelijkse aantallen virussen, opgesplitst naar (sub)type. De aantallen zijn weergegeven als balken, af te lezen op de linker verticale as. Bron: Erasmus MC. Tevens is weergegeven het aantal IAZ per 10.000 inwoners per week, af te lezen op de rechter verticale as. Bron: NIVEL Zorgregistraties eerste lijn.



Tabel 3. Antigene analyse van Nederlandse influenza A(H1N1)-virusisolaten uit het seizoen 2015/2016. Weergegeven zijn de titers van frettenantiserum bereid met referentiestammen, de vaccinstam en representatieve Nederlandse virusisolaten, bepaald in een hemagglutinerremmingstest (HAR) met kalkoenerythrocyten

Virusstam	Seizoen	HAR-titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met				
		A/California	X-181	A/N/602/09	A/N/148/15	A/N/2917/15
A/California/4/2009 [#]		1280	640	1280	6400	640
R.A/California/7/2009 X-181 [^]		1280	2560	1280	1280	2560
A/Netherlands/602/2009	2009/2010	1280	2560	2560	2560	2560
A/Netherlands/148/2015	2014/2015	2560	1280	1280	1280	2560
A/Netherlands/2917/2015	2015/2016	2560	2560	2560	2560	2560
A/Netherlands/2905/2015	2015/2016	2560	1280	2560	2560	5120
A/Netherlands/2915/2015	2015/2016	2560	2560	2560	5120	5120
A/Netherlands/2925/2015	2015/2016	1280	1280	2560	1280	2560
A/Netherlands/012/2016	2015/2016	1280	1280	1280	1280	2560
A/Netherlands/151/2016	2015/2016	1280	1280	2560	2560	1280
A/Netherlands/996/2016	2015/2016	2560	1280	2560	2560	2560

* Alle virusstammen werden geïsoleerd op eieren of MDCK-cellen en kregen ten minste de laatste passage op MDCK-cellen. Virusnamen: de laatste twee cijfers geven het jaar aan waarin de stam werd geïsoleerd. De titer in de HAR is de omgekeerde waarde van de hoogste verdunning van het frettenantiserum in de betreffende kolom die de hemagglutinatie van kalkoenerythrocyten door een standaarddosering van het influenzavirus in de betreffende rij nog juist volledig remt. Homologe titers zijn **vet** gedrukt. Verschillen tussen titers uit verschillende kolommen zijn niet informatief. Binnen één kolom zijn de titers wel vergelijkbaar, waarbij alleen titerverschillen van ten minste een factor vier als significant worden beschouwd.

[#] A/California/4/2009 is nauw verwant aan A/California/7/2009, die de WHO-A(H1N1)-vaccinreferentiestam was/zal zijn voor de seizoenen 2010/2011 tot en met 2015/2016.

[^] X-181, een reassortant van A/California/7/2009, was/is de vaccinstam voor de seizoenen 2012/2013 tot en met 2015/2016.

Tabel 4. Antigene analyse van Nederlandse influenza B-virusisolaten van de fylogenetische B/Victoria/2/87-lijn uit het seizoen 2015/2016. Weergegeven zijn de titers van frettenantiserum bereid met referentiestammen en representatieve Nederlandse virusisolaten, bepaald in een hemagglutineringsremmingstest (HAR) met kalkoenerijthocyten.

Virusstam	Seizoen	HAR-titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met						
		Malaysia	Brisbane	N/385/09	N/441/12	N/2241/13	N/076/14	N/2914/15
B/Malaysia/2506/2004 [#]		640	80	< 10	40	160	80	20
B/Brisbane/60/2008 [^]		320	1280	320	640	1280	640	320
B/Neth/385/2009	2008/2009	< 10	40	640	640	160	320	320
B/Neth/441/2012	2011/2012	< 10	640	640	1280	640	640	640
B/Neth/2241/2013	2013/2014	< 10	640	160	320	1280	320	320
B/Neth/076/2014	2013/2014	< 10	640	160	640	1280	640	640
B/Neth/2914/2015	2015/2016	< 10	40	320	320	80	320	320
B/Neth/2922/2015	2015/2016	< 10	40	320	320	160	160	320
B/Neth/2928/2015	2015/2016	< 10	20	320	320	80	160	160
B/Neth/0833/2016	2015/2016	< 10	40	320	320	160	320	320
B/Neth/1153/2016	2015/2016	< 10	20	320	160	160	160	160
B/Neth/1597/2016	2015/2016	< 10	20	320	320	160	160	160
B/Neth/1739/2016	2015/2016	< 10	10	160	320	80	160	160
B/Neth/2973/2016	2015/2016	< 10	40	320	320	320	160	160
B/Neth/2308/2016	2015/2016	< 10	40	320	640	80	160	160
B/Neth/2307/2016	2015/2016	< 10	< 10	160	160	40	80	80
B/Neth/3192/2016	2015/2016	< 10	10	320	320	40	160	160

* Zie eerste voetnoot van tabel 3.

[#] B/Malaysia/2506/2004 was de WHO B-vaccinreferentiestam voor 2006/2007 en 2007/2008.

[^] B/Brisbane/60/2008 wordt de WHO B-vaccinreferentiestam voor 2016/2017.

B/Brisbane/60/2008, welke aanbevolen is door de WHO voor opname in het trivalent vaccin voor 2016/2017.⁸

Karakterisering van influenza B-virussen van de B/Yamagata/16/88-lijn

De antisera bereid tegen influenzavirussen B/Netherlands/257/2014 uit seizoen 2013/2014 en B/Netherlands/1551/2015 uit seizoen 2014/2015 gaven beide tegen zes virusisolaten uit 2015/2016 mediane titers die minder dan een factor vier afweken van de homologe titer (tabel 5). In de B/Yamagata/16/88-lijn lijkt daarom sinds 2013/2014 geen significante antigene drift te zijn opgetreden. Het in seizoen 2015/2016 gebruikte vaccin bevatte B/Phuket/3073/2013, een virus van de lijn B/Yamagata/16/88 dat antigeen in slechts beperkte

mate afwijkt van de in dit seizoen geïsoleerde virussen van deze lijn (tabel 5). Het vaccin zal dan ook redelijke bescherming hebben geboden tegen influenza B-virussen van deze lijn.

Fylogenetische analyse liet zien dat beide onderzochte B/Yamagata/16/88-lijnvirussen van 2015/2016 behoorden tot clade 3, waarin zich ook vaccinstam B/Phuket/3073/2013 bevindt.

Vaccineffectiviteit

De vaccineffectiviteit was dit seizoen matig met brede betrouwbaarheidsintervallen (BI), zowel voor influenza A(H1N1)pdm09 (42 procent; 95 procent BI – 40 tot 76 procent) als voor influenza B (53 procent; 95 procent BI - 61 tot 86 procent).⁶

Tabel 5. Antigene analyse van Nederlandse influenza B-virusisolaten van de fylogenetische B/Yamagata/16/88-lijn uit het seizoen 2015/2016. Weergegeven zijn de titers van frettenantiserum bereid met referentiestammen en representatieve Nederlandse virusisolaten, bepaald in een hemagglutineringsremmingstest (HAR) met kalkoenerijthocyten

Virusstam	Seizoen	HAR-titer* van antiserum van fretten geïnfecteerd met				
		B/Florida	B/Phuket	B/N/257/14	B/N/1551/15	B/N/3066/15
B/Florida/4/2006 [#]		2560	1280	640	640	640
B/Phuket/3073/2013 [^]		640	1280	640	1280	1280
B/Neth/257/2014	2013/2014	640	640	1280	1280	1280
B/Neth/1551/2015	2014/2015	640	1280	1280	1280	1280
B/Neth/3066/2015	2015/2016	640	640	640	640	1280
B/Neth/961/2016	2015/2016	320	320	1280	640	640
B/Neth/1531/2016	2015/2016	80	320	320	640	320
B/Neth/2304/2016	2015/2016	80	320	320	640	320
B/Neth/3186/2016	2015/2016	160	320	640	640	640
B/Neth/3202/2016	2015/2016	80	640	640	640	640

* Zie voetnoot 1 van tabel 3.

[#] B/Florida/4/2006 was de WHO B-vaccinreferentiestam voor 2008/2009.

[^] B/Phuket/3073/2013 was de WHO B-vaccinreferentiestam voor 2015/2016.

Vaccinsamenstelling voor het seizoen 2016/2017

In februari 2016 adviseerde de WHO voor het influenza-vaccin voor het seizoen 2016/2017 op het noordelijk halfrond de volgende samenstelling:⁸

- A/California/7/2009 (H1N1)pdm09-like virus;
- A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2)-like virus – een clade 3C.2a virus;
- B/Brisbane/60/2008-like virus – een virus van de B/Victoria/2/87-lijn.

Gevoeligheid voor antivirale middelen

Uit het seizoen 2015/2016 werden 1247 influenzavirussen – 1145 A(H1N1)pdm09, 42 A(H3N2) en 60 type B – onderzocht op gevoeligheid voor antivirale middelen. Eén virusisolaat, een A(H1N1)pdm09-virus, vertoonde een sterk verminderde gevoeligheid voor oseltamivir. Een deel van de virussen in het isolaat bevatte de H275Y-aminozuursubstitutie in het neuraminidase, wat de verminderde gevoeligheid voor oseltamivir verklaart. Het virus werd wel normaal geremd door zanamivir. Eén A(H3N2)-virus vertoonde sterk verminderde gevoeligheid voor oseltamivir en zanamivir, mogelijk veroorzaakt door de E105K-aminozuursubstitutie. Echter, in het klinisch monster kon deze aminozuursubstitutie niet teruggevonden worden.

Alle huidige influenza A-virussen zijn van nature resistent tegen de M2-ionkanaalblockers amantadine en rimantadine. Dit werd voor 41 A(H1N1)pdm09- en 4 A(H3N2)-virussen uit 2015/2016 met genetisch onderzoek bevestigd.

Conclusie

De influenza-epidemie van het seizoen 2015/2016 duurde 11 weken. De antigeen onveranderde A(H1N1)pdm09-virussen domineerden. Daarnaast werden ook frequent influenza B-virussen van de fylogenetische lijn B/Victoria/2/87 waargenomen. Hierin was sinds het seizoen 2013/2014 wel antigeen drift opgetreden. In de virussen van de zelden aangetroffen B/Yamagata/16/88-lijn daarentegen, werd in dezelfde periode geen significante antigeen drift geconstateerd. Influenza A(H3N2)-virussen werden in het afgelopen seizoen weinig frequent gedetecteerd. Of deze antigeen verschillen van de A(H3N2)-virussen in het afgelopen seizoen, kon niet worden nagegaan.

Dankbetuigingen

Ook in het seizoen 2015/2016 waren de bijdragen van de peilstationhuisartsen van NIVEL Zorgregistraties eerste lijn – registratie van gevallen van IAZ en verzending van klinische monsters naar het NIC-RIVM – essentieel voor de influenzasurveillance in Nederland. Zonder de

bereidwilligheid van de hoofden van de diagnostische laboratoria om influenzaviruspreparaten naar het Erasmus MC te sturen, was deze surveillance evenmin mogelijk geweest.

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

De auteurs danken R. van Beek, M. Pronk, M. Silva (het NIC-Erasmus MC), M. Bagheri, T. Marzec, G. Goderski, S. van den Brink, A-M. van den Brandt, P. Overduin en A. Teirlinck (het NIC-RIVM), M. Heshusius-van Valen en J. Gravestijn (NIVEL) voor de uitstekende technische ondersteuning.

Potentieel belangenconflict: G.F. Rimmelzwaan is parttime medewerker van ViroClinics Biosciences BV, een bedrijf dat contractresearch uitvoert voor de farmaceutische industrie. De andere auteurs melden geen mogelijk belangenconflict.

Referenties

1. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015-2016 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2015;90:97-108.
2. Shaw ML, Palese P. Orthomyxoviridae. In: Knipe DM, Howley PM (eds). *Fields Virology*, 6th ed. (2013), Chapter 40, pp 1151 - 1185. Wolters Kluwer, Philadelphia.
3. Lindstrom SE, Hiromoto Y, Nishimura H, Saito T, Nerome R, Nerome K. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J Virol* 1999;73:4413-26.
4. De Jong JC, Meijer A, Donker GA, van der Hoek W, de Lange MMA, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Het influenzaseizoen 2013/14 in Nederland: lage influenza-activiteit. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2014;22:153-61.
5. Donker GA. Jaarverslag 2015 van de Continue Morbiditeits Registratie peilstations Nederland, Utrecht, www.nivel.nl/nzr/zorgverlener/huisarts-peilstations.
6. Teirlinck AC, van Asten L, Brandsema PS, Dijkstra F, Donker GA, van Gageldonk-Lafeber AB, Hooiveld M, de Lange MMA, Meijer A, van der Hoek W. Surveillance of influenza and other respiratory infections in the Netherlands: winter 2015/2016, RIVM rapport 2016-0071, Bilthoven, <http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:322933&type=org&disposition=inline>
7. Meijer A, Jonges M, Abbink F, Ang W, van Beek J, Beersma M, et al. Oseltamivir-resistant pandemic A(H1N1) 2009 influenza viruses detected through enhanced surveillance in the Netherlands, 2009-2010. *Antiviral Res* 2011;92:81-9.
8. WHO 2016b, rapport 29 september 2016. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2017 southern hemisphere influenza season.
9. Lin YP, Gregory V, Collins P, Kloess J, Wharton S, Cattle N, Lackenby A, Daniels R, Hay A. Neuraminidase receptor-binding variants of human influenza A(H3N2) viruses resulting from substitution of aspartic acid 151 in the catalytic site: a role in virus attachment? *J Virol* 2010;84:6769-81.
10. ECDC. Influenza virus characterisation, Summary Europe, July 2016 <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/influenza-virus-characterisation-july-2016.pdf>
11. WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014-2015 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2014;89:93-104.
12. WHO 2016a. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016-2017 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec* 2016;91:121-132.

Referenties behorend bij artikel 'Toepassingen van next generation sequencing voor klinische microbiologie en infectiepreventie' van p. 170-176

Referenties

1. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008;8:747-63.
2. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1277:84-90.
3. Reiss E, Obayashi T, Orle K, Yoshida M, Zancoppe-Oliveira RM. Non-culture based diagnostic tests for mycotic infections. *Med Mycol* 2000;38 Suppl 1:147-59.
4. Liu W, Li L, Khan MA, Zhu F. Popular molecular markers in bacteria. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 2012;14:7.
5. Junemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, et al. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol* 2013;31:294-6.
6. Loman NJ, Misra RV, Dallman TJ, Constantinidou C, Gharbia SE, Wain J, et al. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nat Biotechnol* 2012;30:434-9.
7. Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:803-13.
8. Dark MJ. Whole-genome sequencing in bacteriology: state of the art. *Infect Drug Resist* 2013;6:115-23.
9. Sboner A, Mu XJ, Greenbaum D, Auerbach RK, Gerstein MB. The real cost of sequencing: higher than you think! *Genome Biol* 2011;12:125.
10. Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, Tepper M, Arends JP, Raangs EG, et al. Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum beta-lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 2016;6:20840.
11. De Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, et al. Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS Genet* 2014;10:e1004776.
12. Nijhuis RH, Oueslati S, Zhou K, Bosboom RW, Rossen JW, Naas T. OXY-2-15, a novel variant showing increased ceftazidime hydrolytic activity. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1429-33.
13. Bathoorn E, Rossen JW, Lokate M, Friedrich AW, Hammerum AM. Isolation of an NDM-5-producing ST16 *Klebsiella pneumoniae* from a Dutch patient without travel history abroad, August 2015. *Euro Surveill* 2015;20.
14. Kluytmans-van den Bergh MF, Huizinga P, Bonten MJ, Bos M, De Bruyne K, Friedrich AW, et al. Presence of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009. *Euro Surveill* 2016;21.
15. Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, Schutz M, Weidenmaier C, Autenrieth IB, et al. Antibiotic selection pressure determination through sequence-based metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:7335-45.
16. Graf EH, Simmon KE, Tardif KD, Hymas W, Flygare S, Eilbeck K, et al. Unbiased detection of respiratory viruses by use of RNA sequencing-based metagenomics: a systematic comparison to a commercial PCR Panel. *J Clin Microbiol* 2016;54:1000-7.
17. Flygare S, Simmon K, Miller C, Qiao Y, Kennedy B, Di Sera T, et al. Taxonomer: an interactive metagenomics analysis portal for universal pathogen detection and host mRNA expression profiling. *Genome Biol* 2016;17:111.
18. Maiden MC, Jansen van Rensburg MJ, Bray JE, Earle SG, Ford SA, Jolley KA, et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat Rev Microbiol* 2013;11:728-36.
19. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 2010;11:595.

Infecties op de intensive care

H. Rommes en R. van Saene

Het boek *Infecties op de intensive care* door Hans Rommes en Rick van Saene geeft een beknopt overzicht van de verschillende aspecten die belangrijk zijn bij de diagnostiek en therapie van infecties op de intensive care (IC) en is vooral vanuit een praktisch oogpunt geschreven. De auteurs hebben duidelijk ruime ervaring met betrekking tot dit onderwerp, vooral op het gebied van selectieve darmdecontaminatie (SDD). Hoewel de doelgroep met name intensivisten zal zijn, is dit boek ook geschikt voor iedereen die meer wil leren over de basisprincipes van infectiologie en microbiologie in deze specifieke patiëntenpopulatie. Het boek leest gemakkelijk en heeft een overzichtelijke hoofdstukindeling. Micro-organismen, afweermechanismen, controle van infecties, klinische microbiologie voor het IC-team, behandeling, virusinfecties, resistentie en uitbraken komen allemaal aan de orde.

Het taalgebruik is helder en opvallend laagdrempelig. Vaak wordt gebruik gemaakt van lekentermen, zoals 'witte bloedcellen' in plaats van leukocyten. Her en der zijn de gebruikte parameters en termen niet courant. De lezer dient rekening te houden met af en toe sterke 'lokale smaken'. Bepaalde aspecten worden soms te ongenueanceerd belicht en over specifieke onderwerpen hebben de auteurs een duidelijk gekleurde mening, onder andere ten aanzien van de keuze van antibiotica en de therapieduur bij diverse behandelindicaties. Twee voorbeelden zijn de empirische antimicrobiële behandeling bij intra-abdominale infecties die volgens de auteurs altijd amfotericine B moet bevatten om eventuele gisten mee te dekken en de noodzaak voor verneveling van antibiotica bij enkel kolonisatie van de luchtwegen zonder verschijnselen van infectie. Tevens ontbreken bij sommige stellingen de bijbehorende referenties, zoals voor de onderbouwing van bepaalde (te) stellige behandeladviezen.

Op microbiologisch-/laboratorium-technisch gebied loopt het boek achter wat betreft de nu gebruikelijke methoden en gangbare diagnostiek. De toepassing van Malditof wordt niet besproken, terwijl deze techniek tegenwoordig onmisbaar is geworden voor de routinediagnostiek in een microbiologisch laboratorium. Er wordt vooral gesproken

over klassieke resistentiebepalingen met schijfjes-agar en zeer beperkt ingegaan op de meer gangbare geautomatiseerde methodes.

Desalniettemin blijft dit boek zonder meer interessant om te lezen voor degenen die meer willen weten over dit thema, bijvoorbeeld voor artsen-microbioloog (in opleiding) die IC-consulten doen. Het boek levert tal van interessante gezichtspunten op en geeft inzicht waarom specifieke preventieve strategieën zoals SDD in Nederlandse IC-centra zijn geïmplementeerd. Tevens biedt het 'voer voor discussie' over bepaalde ingeslopen gewoontes met betrekking tot antimicrobieel beleid op de IC. De afwisseling met intermezzo's en casuïstiek maakt het lezen van dit boek onderhoudend.

Concluderend: het boek *Infecties op de intensive care* is begrijpelijk geschreven door twee duidelijk bevoegen specialisten met een grote affiniteit voor SDD en bevat diverse leerzame aspecten. Hiermee is het voor een redelijk brede doelgroep interessant en een waardevolle aanvulling in het domein waar de intensive care en microbiologie elkaar overlappen.

*Dr. David Ong en dr. Peter Klein Klouwenberg
Artsen-microbioloog i.o., Afdeling Medische Microbiologie,
UMC Utrecht*



ISBN: 9789058982940
232 pagina's
Eerste druk, juni 2016
Uitgever: de Tijdstroom
Prijs: € 29,00
Taal: Nederlands

Abstracts Najaarsvergadering NVMM / VIZ 2016

Update in fungale infecties

P.E. Verweij

Afdeling Medische Microbiologie, Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen

Schimmels veroorzaken een scala aan infecties bij de mens. De echinocandines zijn de eerste keus behandeling geworden bij invasieve candida-infecties. Ze zijn effectiever dan de azolen, wat recent opnieuw duidelijk is geworden bij een vergelijkend onderzoek tussen caspofungine en isavuconazol. De echinocandines zijn actief in vitro tegen *Candida albicans* en tegen gisten die verminderd gevoelig zijn voor fluconazol zoals *C. glabrata* en *C. krusei*. Het gebruik van echinocandines bij de behandeling van *C. parapsilosis*-infecties is controversieel omdat ze in vitro verminderde activiteit tonen. Analyse van een groot cohort van patiënten met *C. parapsilosis*-candidemie laat zien dat ze ten minste even effectief zijn als fluconazol en daarom gebruikt kunnen worden bij invasieve infecties door deze gist. Resistentie tegen azolen en echinocandines komt het meest voor bij *C. glabrata*, maar de resistentiefrequenties zijn nog steeds laag.

Isavuconazol is even effectief als voriconazol bij de behandeling van invasieve aspergillose, met minder bijwerkingen. Het middel is ook effectief bij mucormycose, maar de ervaring is nog beperkt. In Nederland is invasieve aspergillose gevonden als complicatie bij influenzapneumonie. Een retrospectief onderzoek op de IC's van de acht UMC's toonde invasieve aspergillose aan bij 17 procent van de patiënten met influenzapneumonie. Hierbij viel op dat de patiënten op voorhand niet een hoog risico hadden op invasieve aspergillose op basis van een onderliggende ziekte. De letaliteit was 56 procent en delay bij het stellen van de diagnose en antifungale therapie was geassocieerd met sterfte. Azoolresistentie is een belangrijk probleem bij invasieve aspergillose door *A. fumigatus*. Resistentiefrequenties van 26 tot 31 procent zijn onlangs gevonden bij hoogrisicopatiënten, zoals patiënten met hematologische maligniteiten en IC-patiënten. Bij deze patiëntengroepen wordt steeds meer afgestapt van azoolmonotherapie als initiële therapie, gezien de hoge sterftekans bij azoolresistente ziekte. Veelal wordt behandeld met een combinatie (azool en echinocandine of liposomaal amfotericine B en azool) of met liposomaal amfotericine B. Het diagnosticeren van resistentie is vaak moeilijk, hoewel moleculaire testen beschikbaar komen die resistentiemutaties kunnen aantonen direct in patiëntmateriaal.

Een ander toenemend probleem is schimmelkeratitis, vaak geassocieerd met het dragen van contactlenzen. *Fusarium*-soorten worden veelal gevonden, schimmels die multi-resistent zijn. Er zijn bemoedigende resultaten met topische behandeling met chloorhexidine.

Inventarisatie en terugkoppeling van antibioticagebruik leidt tot beter gebruik bij verpleeghuizen

I. Groothuis¹, R.R. Jansen^{1,2}, A. Bosma¹, B. Weijer¹, R. El Moussaoui¹, P. Boermans¹

¹MC Zuiderzee, Lelystad, ²Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Amsterdam

Deze data zijn niet reeds eerder vermeld op een ander congres, wel is er een 'best practice'-abstract ingediend voor de Ateam terugkomdag 2016 waar een deel van deze data ook in wordt besproken.

Het overgrote deel van de antibioticacconsumptie vindt plaats buiten de tweede lijn, waarbij beperkt aandacht is voor verpleegtehuizen.

Deze studie werd uitgevoerd in twee verpleeghuizen (verpleeghuis A met 401 bedden en verpleeghuis B met 236 bedden). Gedurende februari 2016 werden alle patiënten geïnculdeerd die antibiotica kregen voorgeschreven. De dosis en duur van het antibioticum, de werkdiagnose, de ingezette diagnostiek en co-morbiditeit werden verzameld. Twee maanden na terugkoppeling van de data werd dezelfde meting opnieuw verricht in verpleeghuis A (juni 2016). De gegeven antibioticakuren werden vergeleken met NHG- en SWAB-richtlijnen

Er zijn in totaal 102 antibiotische behandelingen geïnculdeerd. De indicaties voor het starten van antibiotica waren: luchtweginfecties (LWI) (50 procent), urineweginfecties (UWI) (33 procent), wondinfecties (7 procent) en overige infecties (10 procent). Het aantal antibioticakuren per bed was vergelijkbaar voor beide huizen (resp. 17 en 14 procent). Gemiddeld was in beide huizen 34 procent van de antibioticakuren conform de richtlijnen (in verpleeghuis A 30 procent, in verpleeghuis B was dit 44 procent). Het afwijken van de richtlijnen berustte in de meeste gevallen op een onjuiste duur van de geven antibiotica (37 procent (38/102)). Het type antibioticum voldeed niet aan de richtlijn in 10 procent (11/102) van de gevallen. De antibiotische behandeling was meestal empirisch op basis van klinisch en lichamelijk onderzoek.

De tweede meting in verpleeghuis A toonde met 61 procent een aanzienlijke verbetering in voorschriften en voldeed aan de richtlijnen. Subanalyse toonde niet alleen verbetering bij LWI's (mogelijk seizoenseffect), maar ook bij UWI's (van 58 naar 76 procent).

Dragerschap van bijzonder resistente micro-organismen (BRMO): niet alleen in de darm

J. van Prehn, A. Kaiser, M. Koningstein, S. Ruhe-van der Werff, C. Vandenbroucke-Grauls
Medische Microbiologie en Infectiepreventie, VUmc, Amsterdam

Voor het vervolgen van dragerschap van Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producerende *Enterobacteriaceae* (ESBL-E) verwijst de richtlijn van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie naar de aanbevelingen die gelden voor dragers van *Salmonella* spp., dat wil zeggen: vervolgen middels kweken van feces of anusuitstrijk en niet van andere materiaalsoorten. Bij klinische patiënten is het materiaal waaruit ESBL-E voor het eerst geïsoleerd wordt echter soms ander materiaal. Teneinde te bepalen of voor het vervolgen van dragerschap kweken van feces of anusuitstrijk voldoende is, hebben wij de resultaten van alle kweken van alle patiënten die van januari 2011 tot augustus 2016 ooit een kweek positief voor ESBL-E hebben gehad geëxtraheerd uit het laboratoriummanagementsysteem. Dit leverde kweekresultaten van 1011 patiënten op. Bij 423 patiënten werd nooit een anusuitstrijk ingezonden; deze patiënten werden geëxcludeerd uit de analyse. Bij 588 patiënten waren 12.436 kweken afgenomen, waarvan bij elke patiënt een of meerdere anuskweken. Bij 82 patiënten (13,9 procent) werd de ESBL-E niet in de anus gevonden, wel in ander materiaal, bij 326 patiënten (55,4 procent) alleen in de anus en bij 180 patiënten (30,6 procent) zowel in de anus als op een andere locatie. De patiënten bij wie géén ESBL-E in de anus werd aangetroffen, hadden gemiddeld 6,3 ESBL-E-negatieve anuskweken, gemiddeld 3 dagen na een positieve ESBL-E-kweek. Hieruit blijkt dat bij ongeveer 1 op de 7 dragers van ESBL-E deze BRMO niet in anuskweken werden aangetroffen. Wij adviseren daarom voor BRMO-follow-up niet uitsluitend te vertrouwen op kweken van anusuitstrijken, maar ook kweken af te nemen van de lichaamslocaties waar de ESBL-E eerder is aangetroffen.

BK polyomavirus seroreactivity of kidney donors predicts viremia and nephropathy in recipients

H.F. Wunderink^{1*}, E. van der Meijden¹, C.S. van der Blijde Brouwer¹, M.J.K. Mallat², G.W. Haasnoot³, E.W. van Zwet⁴, E.C.J. Claas¹, J.W. de Fijter², A.C.M. Kroes¹, F. Arnold⁵, A. Touzé⁵, F.H.J. Claas³, J.I. Rotmans^{2#}, M.C.W. Feltkamp^{1#}.

Departments of ¹Medical Microbiology, ²Nephrology, ³Immunohematology and Blood Transfusion, ⁴Medical Statistics and Bioinformatics, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands, ⁵UMR INRA ISP1282, Université François Rabelais, Tours, France. #Contributed equally to this paper

Kidney transplant donors are currently not implicated in predicting BK polyomavirus (BKPyV) infection in kidney transplant recipients. It has been postulated, however, that BKPyV infection originates from the kidney allograft. Since BKPyV-seroreactivity correlates with BKPyV-replication and, therefore, might mirror the infectious load, we investigated whether BKPyV-seroreactivity of the donor predicts viremia and BKPyV-associated nephropathy (BKPyVAN) in the recipient. In a retrospective cohort of 407 living kidney donor-recipient pairs pretransplantation donor and recipient sera were tested for BKPyV IgG-levels and correlated with the occurrence of recipient BKPyV viremia and BKPyVAN within one year posttransplantation. As such, donor BKPyV IgG-level was strongly associated with BKPyV viremia and BKPyVAN ($p < 0.001$), while recipient BKPyV-seroreactivity showed a non-significant inverse trend. Pairing of high BKPyV-seroreactive donors with low seroreactive recipients resulted in a 10-fold increased risk for BKPyV viremia (HR 10.1, 95% CI: 3.5 – 29.0, $p < 0.001$). In multivariate analysis, donor BKPyV-seroreactivity was the strongest pretransplantation factor associated with viremia ($p < 0.001$) and BKPyVAN ($p = 0.007$). The proportional relation between donor BKPyV-seroreactivity and recipient infection suggests that donor BKPyV-seroreactivity reflects the infectious load of the kidney allograft, and calls for the use of pretransplantation BKPyV-serological testing of (potential) donors and recipients.

Funding: Dutch Kidney Foundation

Virale infecties bij immuunsuppressie

J.J.A. van Kampen
Afdeling Viroscience, unit klinische virologie, Erasmus MC, Rotterdam

Het beloop, de diagnostiek en behandeling van virale infecties bij immuungecompromitteerde patiënten is anders dan bij immuuncompetente patiënten. In deze presentatie wordt vooral ingegaan op virale infecties bij patiënten na een orgaantransplantatie of een beenmergtransplantatie. Veel voorkomende virusinfecties zoals infecties met herpesvirussen en polyomavirussen kennen over het algemeen een mild beloop bij immuuncompetente patiënten. Bij transplantatie patiënten kunnen deze infecties echter levensbedreigend verlopen. Aan de hand van casuïstiek zal worden ingegaan op het beloop, de diagnostiek en behandeling van deze virale infecties.

PROMOTIES

6 juli 2016

C.M. Gossner

Surveillance and response to food- and water-borne disease outbreaks in the European Union

Promotor: prof. dr. C.J.P.A. Hoebe

Co-promotor: dr. B. de Jong

Maastricht UMC, CAPRI. GGD-Zuid Limburg, Geleen

6 juni 2016

K.M. Mothapo

Inflammation in HIV-associated neurocognitive disorders

Promotor: prof. dr. A.J.A.M. van der Ven

Co-promotores: dr. F.F. Stelma en dr. P.P. Koopmans

Radboudumc Nijmegen, afd. Interne Geneeskunde

7 juli 2016

K.A.T.M. Teunissen

Peer-driven testing for *Chlamydia trachomatis* in sexual and social networks; the value for Chlamydia control

Promotores: prof. dr. C.J.P.A. Hoebe en prof. dr. G.J. Kok

Co-promotor: dr. N.H.T.M. Dukers-Muijers

Maastricht UMC, CAPRI en Sectie Toegepaste Sociale Psychologie. GGD-Zuid Limburg, Geleen

16 september 2016

J.W.M. van der Linden

Azole resistance in *Aspergillus*: epidemiology and surveillance

Promotores: prof. dr. P.E. Verweij en prof. dr. A. Warris

Co-promotor: dr. W.J.G. Melchers

Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie. University of Aberdeen, United Kingdom

16 september 2016

H.F.T. Margot

Improvement of methods for the detection of Gram-negative foodborne pathogens

Promotor: prof. dr. ir. M.H. Zwietering

Co-promotores: prof. dr. H.M.L.J. Joosten en

prof. dr. R. Stephan

Wageningen Universiteit, afd. Agrotechnologie en Voedingwetenschappen

22 september 2016

A.L. Wyllie

Molecular surveillance of pneumococcal carriage in the Netherlands

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

Co-promotor: dr. K.P. Trzcinski

UMC Utrecht/Wilhelmina Kinderziekenhuis, Vakgroep: Pediatrische Immunologie en Infectieziekten. RIVM, Bilthoven

27 september 2016

C. Dorobantu

Role of PI4-kinases and PI4P lipids in picornavirus replication

Promotor: prof. dr. F.J.M. van Kuppeveld

Co-promotor: dr. H. van Tongeren – van der Schaar

Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Afdeling Infectieziekten & Immunologie, Divisie Virologie

5 oktober 2016

J.H. Verhagen

Influenza A Viruses in Migratory Birds: Ecology, evolution and the wild-domestic interface

Promotor: prof. dr. R.A.M. Fouchier

Co-promotor: prof. dr. T. Kuiken

Erasmus MC Rotterdam, afd. Viroscience

CURSUSAANKONDIGING

Outbreak-onderzoek

Outbreaks komen altijd onverwacht. Volg deze module om inzicht te krijgen in de epidemiologische en operationele stappen in een outbreak-onderzoek en breng deze vaardigheden in de praktijk.

Voor wie: artsen infectieziektebestrijding, bedrijfsartsen, huisartsen, dierenartsen en medisch microbiologen die in de praktijk te maken (kunnen) hebben met infectieziektebestrijding of die hun kennis op dat gebied willen vergroten.

Data: 7 en 14 februari, 7 en 14 maart 2017, Utrecht

Kosten: € 1540

Locatie: Utrecht

Link: https://www.nspoh.nl/scholing.php?t=outbreak-onderzoek&action=view&Scholing_Id=1284&Uitvoering_Id=6192&Module_Id=932&Opleiding_Id=65

Inlichtingen: www.nspoh.nl, tel: 030-8100500, e-mail info@nspoh.nl

PROMOTIES

28 oktober 2016

R. Derking

Antigenic structure of the HIV-1 envelope glycoprotein trimer

Promotor: prof. dr. B. Berkhout

Co-promotor: dr. R.W. Sanders

AMC Amsterdam, afd. Medische Microbiologie

28 oktober 2016

M.C. van Aalderen

The individuality of (virus-specific) CD8+ T cells

Promotores: prof. dr. R.A.W. van Lier en

prof. dr. R.J.M. ten Berge

AMC Amsterdam, afd. Inwendige Geneeskunde.

Sanquin Amsterdam, Division Research

2 november 2016

S. Hansenova Manaskova

Exploring *Staphylococcus aureus* sortase A for potential anti-infective applications

Promotor: prof. dr. E.C.I. Veerman

Co-promotores: dr. F.J. Bikker en dr. W.J.B. van Wamel

Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam.

VUmc Amsterdam, Faculteit Tandheelkunde

7 november 2016

J.W.H. Dik

Impact of medical microbiology. A clinical and financial analysis

Promotores: prof. dr. A.W. Friedrich, prof. dr. B.N.M. Sinha

en prof. dr. M.J. Postma UMC Groningen, afd. Medische

Microbiologie

7 november 2016

D.E.T. Bastiaans

Making things easier: How to improve antiviral drug treatment for children

Promotores: prof. dr. D.M. Burger en prof. dr. A. Warris

Radboudumc Nijmegen, Radboud Institute for Health

Sciences, afdeling Apotheek. University of Aberdeen, UK

16 november 2016

T.E. Hoornweg

Breaking barriers. Early events in chikungunya and dengue virus infections

Promotor: prof. dr. J.M. Smit

UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie

17 november 2016

J.M. Matz

Life in a bubble: host cell refurbishment by the malaria parasite

Promotores: prof. dr. R.W. Sauerwein en

prof. dr. K. Matuschewski

Co-promotor: dr. T.W.A. Kooij

Radboudumc Nijmegen, afd. Medische Microbiologie.

Humboldt-Universität, Berlin, Molecular Parasitology

30 november 2016

S.J. Hulleger

Diagnosis and treatment of acute hepatitis C among HIV positive men having sex with men

Promotor: prof. dr. A. Verbon

Co-promotor: dr. B.J.A. Rijnders

Erasmus MC Rotterdam, afd. Medische Microbiologie &

Infectieziekten en afd. Inwendige Geneeskunde – Sectie

Infectieziekten

2 december 2016

M.D. Fernández Ramirez

Characterisation of *Lactobacillus plantarum* single and multi-strain biofilms

Promotores: prof. dr. T. Abee en prof. dr. E.J. Smid

Co-promotor: dr. M.N. Nierop Groot

Wageningen Universiteit, afd. Agrotechnologie en

Voedingswetenschappen

2 december 2016

S. Gouma

Unravelling Factors Contributing to Mumps Outbreaks

Promotor: prof. dr. M.P.G. Koopmans

Co-promotor: dr. R.S. van Binnendijk

Erasmus MC Rotterdam, afd. Viroscience

13 december 2016

H.I. Bax

Improving Treatment of Mycobacterial Infections

Promotor: prof. dr. A. Verbon

Co-promotores: dr. J.E.M. de Steenwinkel en

dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg

Erasmus MC Rotterdam, afd. Medische Microbiologie &

Infectieziekten en afd. Inwendige Geneeskunde – Sectie

Infectieziekten

15 december 2016

A. Platteel

Navigating the immune system: Improving CD8+ T cell responses for vaccine design

Promotor: prof. dr. W. van Eden

Co-promotor: dr. E.J.A.M. Sijts

UMC Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, afd.

Infectieziekten & Immunologie

20 december 2016

F.M. Mobegi

Deciphering the etiology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* through bioinformatics

Promotores: prof. dr. P.W.M. Hermans en

prof. dr. R. de Groot

Co-promotores: dr. A.L. Zomer en dr. S.A.F.T. van Hijum

Radboud UMC Nijmegen, afd. Kindergeneeskunde