

Arbovirusserologie in een veranderende wereld

Louella Kasbergen*, Babs Verstrepen*, Corine Geurts van Kessel, Reina Sikkema, Marion Koopmans

Samenvatting

Arbovirussen komen in Nederland relatief weinig voor, maar toenemend reisverkeer en de opmars van arbovirussen door klimaatverandering zullen hoogstwaarschijnlijk in de komende decennia leiden tot een toename van het aantal patiënten dat zich presenteert met arbovirale klachten. Dit artikel bespreekt de mogelijkheden en beperkingen van arboviruslaboratoriumdiagnostiek en het belang van een uitgebreide anamnese, nu en in de toekomst.

Abstract

Arboviruses are relatively unknown in the Netherlands, however, increasing travel and climate change will likely lead to an increasing number of arbovirus infected patients in the coming decades. This article describes the current and future possibilities and limitations of laboratory diagnostics and underlines the value of a complete medical history, including travel and vaccination.

Introductie

Arbovirussen, voluit ARthropod-BORne virussen, danken hun naam aan de geleedpotige vectoren (artropoden) die nodig zijn voor transmissie van arbovirussen. Teken en muggen maar ook zandvliegen en knutten kunnen als vector dienen voor de transmissie tussen gastheren [1]. Mensen maken bij sommige arbovirussen zoals westnijlvirus, Japanse encefalitisvirus en usutu virus geen deel uit van de transmissiecyclus, omdat zij onvoldoende viremie ontwikkelen om de vector te infecteren tijdens een beet (*figuur 1, pagina 14*). Voor andere arbovirussen, zoals zikavirus, gelekoortsvirus, chikungunyavirus en denguevirus kan de mens wel als reservoir dienen, wat kan leiden tot explosieve uitbraken (*figuur 1A*) [1,2]. In veel gevallen zijn vogels het reservoir voor arbovirussen zoals bij het westnijlvirus, Japanse encefalitisvirus en usutu virus (*figuur 1B*).

De meerderheid van de arbovirussen die klinisch relevant zijn voor de mens behoort tot de families van

de *Flaviviridae* (genus *flavivirus*) en *Togaviridae* (genus *alphavirus*). Tot de bekende flavivirussen behoren zikavirus, denguevirus, westnijlvirus, gelekoortsvirus, tekenencefalitisvirus en Japanse encefalitisvirus, en tot de alphavirussen onder meer chikungunyavirus, sindbisvirus en de paardenencefalitisvirussen [1]. Het overgrote deel van de infecties met deze arbovirussen verloopt asymptomatisch [1]. In de overige gevallen is er sprake van algemene malaise die gepaard kan gaan met griepachtige verschijnselen als koorts, hoofdpijn, misselijkheid en spierpijn [1]. Bij ongeveer 1 procent van de infecties verloopt het ziektebeeld ernstiger, waarbij vaak één, of een combinatie, van drie syndromen wordt beschreven [1]:

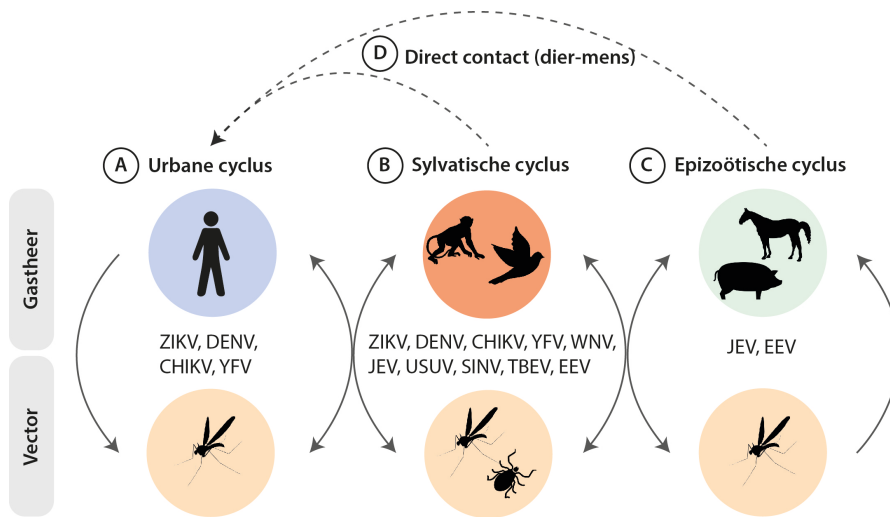
1. huiduitslag zoals exantheem of maculopapulaire uitslag en/of artralgie, polyartralgie en polyarthritis;
2. neurologisch syndroom bestaande uit myelitis, meningitis en/of encefalitis;
3. hemorragisch syndroom bestaande uit petechiën, spontane of aanhoudende bloedingen en/of shock.

Daarnaast zijn voor individuele virussen specifiekere symptomen of ziektebeelden zoals hepatitis, gastro-intestinale pijn, bronchopneumonie en conjunctivitis beschreven [1].

Ongeveer 80 procent van de wereldbevolking leeft in arbovirusendemische of -epidemische regio's met een reële kans op blootstelling [3]. Tot ongeveer zes jaar geleden werden arbovirussen in Nederland alleen als importziekte gevonden bij reizigers terugkerend uit endemische gebieden. Casuïstiek in Nederland wordt

*Deze auteurs hebben evenveel bijgedragen. Erasmus MC referentielab, Rotterdam, Nederland, afdeling Viroscience, drs. L.M.R. Kasbergen, PhD-kandidaat; dr. B.E. Verstrepen, onderzoeker; dr. C.H. Geurts van Kessel, arts-microbioloog en onderzoeker; dr. R.S. Sikkema, dierenarts en onderzoeker; prof. M.P.G. Koopmans, afdelingshoofd Viroscience. Correspondentieadres: drs. L.M.R. Kasbergen (l.kasbergen@erasmusmc.nl).

Figuur 1. Transmissiecycli van arbovirussen.



A) Urbane cyclus tussen mug en mens, mens is hier een amplificerende gastheer. B) Sylvatische cyclus tussen gewervelde gastheren (reservoirs) en muggen of teken, waarbij dieren de amplificerende gastheer zijn. C) Epizoötische cyclus tussen gehouden dieren (amplificerende gastheer) en muggen. D) Transmissie via direct contact vanuit dieren naar mensen. Arbovirussen kunnen soms overgaan op een andere transmissie cyclus, in dit geval is de nieuwe gastheer vaak een eind-gastheer.

ZIKV = zikavirus, DENV = denguevirus, CHIKV = chikungunyavirus, YFV = gelekoortsvirus, WNV = westnijlvirus, JEV = Japanse encefalitisvirus, USUV = usutu virus, SINV = sindbisvirus, TBEV = tekenencefalitisvirus, EEV = paardenencefalitisvirussen.

mede bepaald door de epidemiologie wereldwijd. Zo is het aantal diagnoses van dengue-, gelekoorts-, chikungunya- en zikavirus bij reizigers duidelijk toegenomen tijdens uitbraken buiten Europa. De toename werd tijdelijk onderbroken doordat er tijdens de wereldwijde COVID-19-pandemie minder buitenlandse reizen werden gemaakt. Door klimaatverandering en daarmee gepaard gaande verdere verspreiding van vectoren, zijn arbovirale infecties echter niet langer voorbehouden aan tropische gebieden. Een voorbeeld hiervan is de introductie van het westnijlvirus en usutuvirus in Nederland [4,5]. Deze worden overgedragen door de veel voorkomende Europese huismug (*Cx. Pipiens*) [4,5]. Daarnaast wordt, door *Ixodes ricinus*-teken in bosrijke gebieden, ook het tekenencefalitisvirus sinds 2016 overgedragen in Nederland [6]. Tot op heden komen arbovirusinfecties in Nederland (nog) slechts voor in kleine aantallen, met een lage ziektelast tot gevolg. Als gevolg van de verwachte veranderingen in de verspreiding

van arbovirussen, zullen zij echter een steeds belangrijker onderdeel worden van de differentiaal-diagnose bij patiënten voor wie diagnostiek wordt verricht in Nederland.

Momenteel wordt de differentiële arbovirusdiagnose gesteld op basis van ziekteverschijnselen in combinatie met een (reis)anamnese en laboratoriumdiagnostiek. De belangrijkste knelpunten bij het stellen van de diagnose zijn de sterk overlappende ziekteverschijnselen, cocirculatie van verschillende (verwante) arbovirussen in endemische (reis)gebieden, en kruisreactie tussen antistoffen tegen verwante arbovirussen.

Arbovirale diagnostiek in Nederland

Moleculaire laboratoriumdiagnostiek

Arbovirale laboratoriumdiagnostiek is onder te verdelen in het aantonen van viraal genoom of virale eiwitten, en het aantonen van antistoffen. De keuze

voor de detectiemethode is afhankelijk van de periode die is verstreken tussen blootstelling aan het virus en het tijdstip van de diagnostiek. Arbovirussen veroorzaken meestal zelflimiterende infecties met een kortdurende viremie (figuur 2). Alleen tijdens deze periode kan het virus in bloed aangetoond worden. Een veelgebruikte laboratoriumtest hiervoor is een nucleïnezuuramplificatietest (NAAT), zoals RT-qPCR, waarbij genetisch materiaal van het virus niet alleen wordt aangetoond maar ook gekwantificeerd [7]. Arbovirus-RT-qPCR's zijn meestal hoogspecifiek. De tijdperiode waarin het virus kan worden aangetoond in serum met deze techniek is echter beperkt [7,8]. Dit komt doordat de piek van de virale load in serum slechts enkele dagen na infectie ligt. Hierdoor is het virus in veel gevallen niet meer detecteerbaar wanneer ziektesymptomen zich presenteren (figuur 2) [7,8]. In urine, sperma of volbloed kan het virus langer aantoonbaar blijven [8]. Bij neurologische symptomen kan onderzoek van de cerebrospinale vloeistof (CSF) zinvol zijn, ook al is in CSF de virale load vaak laag of kortdurend detecteerbaar [9]. Proefdierstudies hebben aangetoond dat, bijvoorbeeld voor westnijl-virus, viraal genetisch materiaal langer aantoonbaar

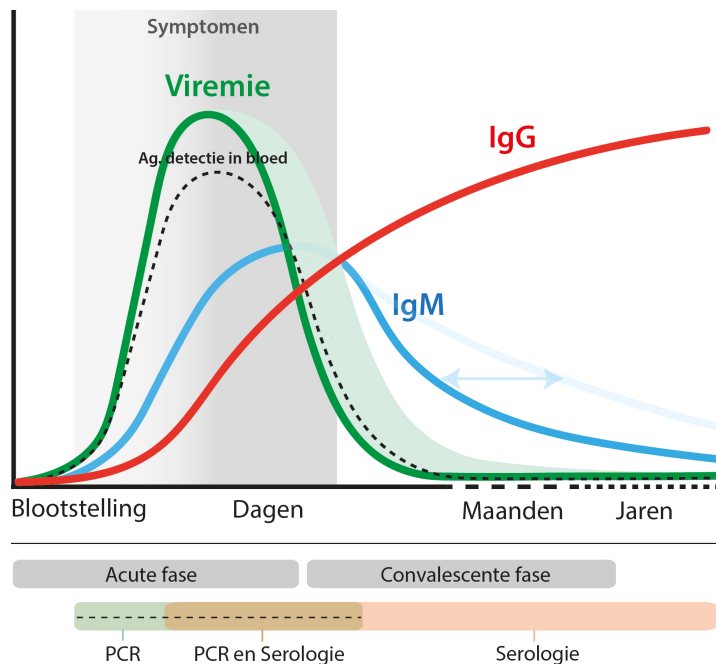
kan zijn in organen als de milt en lymfeklierweefsel, maar voor diagnostische doeleinden worden deze doorgaans niet bemonsterd [10]. Naast de NAAT, wordt in diagnostische laboratoria vaak gebruikgemaakt van antigeendetectie, zoals niet-structurele eiwit 1 (NS1), met name bij denguevirus [11]. Denguevirus-NS1-testen hebben een hoge specificiteit, zijn snel en minder kostbaar [11]. Daarnaast is NS1-antigeen veelal een aantal dagen langer aantoonbaar in bloed dan het RNA (figuur 2, 4) [11].

Serologische laboratoriumdiagnostiek

Bindende antistoffen

Na de acute fase van de infectie is men aangewezen op de detectie van antilichamen in serum of CSF [9,12]. Bij de detectie van bindende antistoffen wordt onderscheid gemaakt tussen IgM- en IgG-antistoffen. IgM-antistoffen zijn vroeg detecteerbaar, vanaf enkele dagen na infectie, en kunnen langdurig aanwezig blijven na een primo-infectie [12]. IgG-antistoffen komen na ongeveer 10 dagen op en zijn vaak jaren aantoonbaar (figuur 2) [12]. Voor antistofdetectie zijn

Figuur 2. Kinetiek van arbovirusviremie en antistofrespons na infectie.



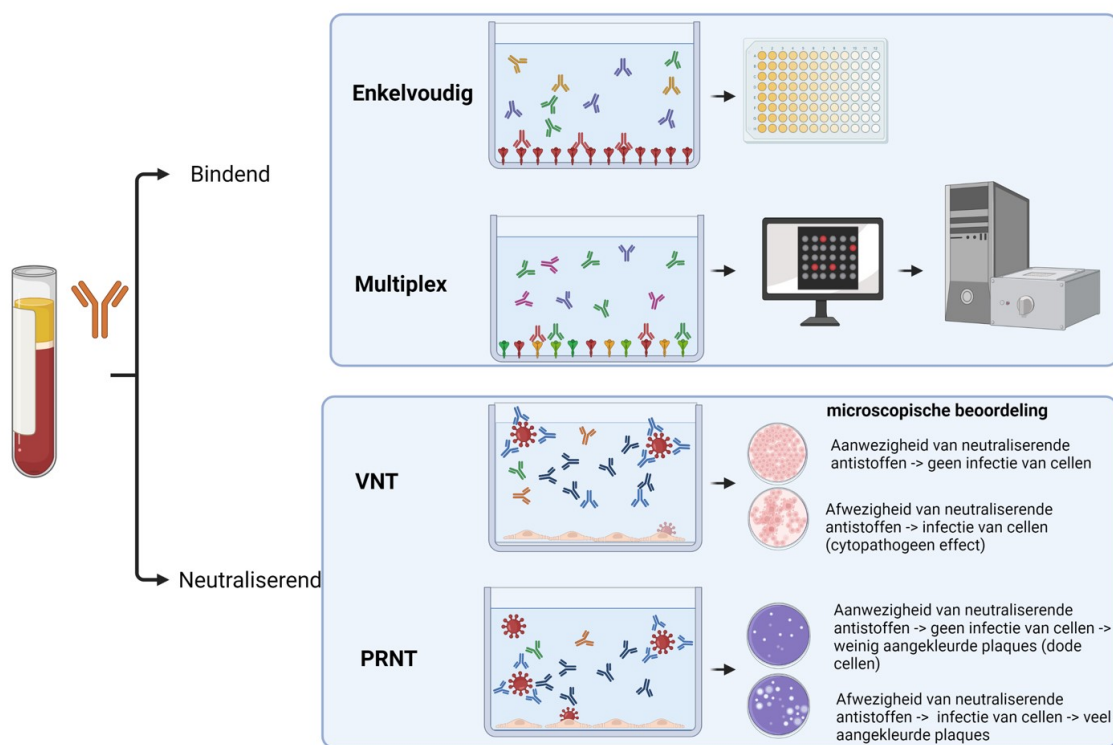
Globale weergave van de kinetiek van arbovirusdetectie in serum (donker-groen) en in urine of volbloed (lichtgroen), antigeendetectie in bloed (antigenemie) (zwart gestippeld), IgM (donkerblauw en lichtblauw) en IgG (rood) en symptomatische periode na een arbovirusinfectie. Tijdens de (vroeg) acute fase zijn arbovirussen aan te tonen met behulp van moleculaire en antigene detectietechnieken, maar door het uitblijven van ernstige klinische verschijnselen verloopt deze fase doorgaans onopgemerkt. De convalescente fase kenmerkt zich door de inductie van antistoffen. De geïnduceerde antistoffen vertonen echter vaak veel kruisreactiviteit met verwante arbovirussen, wat de differentiaaldiagnose op basis van serologie bemoeilijkt.

diverse platformen beschikbaar zoals 'enzyme linked immunosorbent'-assay (ELISA), indirect fluorescent antibody (IFA) testen, protein microarrays [13] en western blot (figuur 3). Veel diagnostische laboratoria gebruiken geautomatiseerde systemen gebaseerd op het ELISA-principe. Serologische testen maken gebruik van de fysische bindingscapaciteit van immuuglobulinen aan een virusantigeen, dat vervolgens zichtbaar gemaakt wordt door een enzymatische reactie of met behulp van fluorescentie (figuur 3). Voor detectie van antistoffen tegen arbovirussen met ELISA en/of een western blot wordt veelal gebruikgemaakt van de structurele eiwitten

premembraan (prM) en envelop (E) en het eerdergenoemde niet-structurele eiwit NS1 als antigeen (figuur 4). Antilichamen gedetecteerd door IFA zijn echter niet gericht tegen één eiwit van het virus, maar tegen een breed scala aan virale eiwitten.

In Nederland kunnen deze serologische testen worden aangevraagd bij diverse diagnostische laboratoria die gebruikmaken van commercieel verkrijgbare kits, waarbij de producent en het laboratorium beide geacht worden zorg te dragen voor de gewaarborgde kwaliteitscontrole en validaties. Bij ongevaccineerde patiënten met primo-infecties is deze vorm van serologische diagnostiek goed bruikbaar. Bij het

Figuur 3. Principe van arbovirale serologische testen.



Bovenste panel: bindende antistoffen. Enkelvoudige testen detecteren antilichamen tegen één targeteiwit of virus. Multiplextesten detecteren antilichamen tegen verschillende eiwitten of virussen tegelijkertijd. De interpretatie is echter complex en vereist steeds vaker aanvullende analyses of rekenkundige modellen.

Onderste panel: neutralisatietesten waarbij serieel verdund serum gemengd wordt met een vaste hoeveelheid gekweekt virus. Bij virusneutralisatietesten (VNT) wordt de mate van neutralisatie bepaald door kwantificering van ongebonden antilichamen, kijkend naar het cytopathogeen effect met gebruik van een lichtmicroscop. Bij plaquereductie-neutralisatietesten (PRNT) gebeurt dit door kwantificering van niet-geneutraliseerd virus dat in staat is kweekcellen te infecteren wat zich uit in het vormen van plaques. Deze plaques kunnen vervolgens worden aangekleurd en gekwantificeerd. Dit figuur is gemaakt in BioRender.

merendeel van de patiënten wordt de klinische relevantie van de testuitslag echter belemmerd door de complexiteit van de interpretatie van de resultaten. Dit komt met name door kruisreactie van de antistoffen met antigenen van verwante virussen, zeker bij personen die vaker zijn blootgesteld door eerdere vaccinaties en/of infecties.

Voor reizigers terugkerend uit bijvoorbeeld Zuid-Amerika, Azië, Afrika of andere endemische regio's zijn enkelvoudige testen gericht op het aantonen van bindende antistoffen vaak niet afdoende om de ziekteverwekker te identificeren. De antistof-kruis-activiteit, in combinatie met zowel beperkte informatie over de lokale epidemiologische situatie van verwante cocirculerende virussen in het reisgebied, als de potentiële aanwezigheid van antistoffen opgewekt door (reizigers)vaccinaties, beïnvloeden namelijk de serologische interpretatie. Daarnaast is na een langdurig verblijf in een endemische of epidemische regio mogelijk sprake van meer opeenvolgende blootstellingen aan verwante virussen. Hierdoor kan de interpretatie nog verder beïnvloed worden door een fenomeen genoemd 'original antigenic sin' [14]. Hierbij heeft het immuunsysteem de neiging om kruis-reactieve antistoffen, die zijn aangemaakt na een primo-infectie, te stimuleren bij een tweede infectie met een verwant virus [14]. Een vervolgs serum na minimaal twee weken kan de interpretatie ondersteunen en is daarom van groot belang bij het aanvragen van arbovirusserologie.

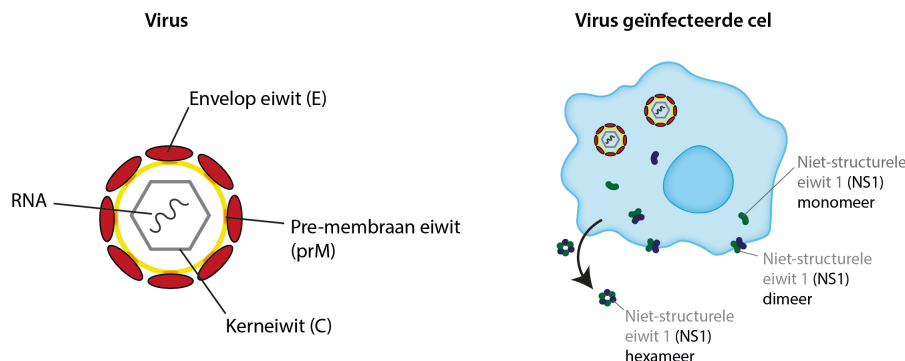
Voor veel laboratoria is het een uitdaging om arbovirus-

serologie goed te valideren vanwege schaarste aan benodigde materialen, waaronder sera van bewezen arbovirusinfecties. Samenwerking met de referentielaboratoria voor arbovirale infecties in Nederland (RIVM en Erasmus MC) kan hierbij richting geven. Het is naar onze mening wenselijk om bij nieuwe arbovirusintroducties in Nederland validaties gezamenlijk op te zetten en uit te voeren.

Neutraliserende antistoffen

De specificiteit van serologie kan worden verhoogd door het meten van neutraliserende antistoffen, waarbij naar de functionaliteit van antistoffen wordt gekeken. Virusneutralisatietesten (VNT) en plaquereductie-neutralisatietesten (PRNT) worden daarom gezien als de gouden standaard in arbovirusserologie en worden veelal uitgevoerd door gespecialiseerde (referentie) laboratoria [15]. De testen worden vaak ingezet om assayvalidatie mogelijk te maken en om data van eerdere serologische bepalingen te bevestigen, hoewel ook neutralisatietesten niet altijd volledig uitsluitend kunnen geven door de antistofkruis-activiteit. Om de neutraliserende capaciteit van antistoffen tegen een specifiek virus aan te tonen in een patiëntens serum, worden verschillende verdunningen van het serum blootgesteld aan een gestandaardiseerde hoeveelheid infectieus virus (*figuur 3*). Vervolgens wordt de mix toegevoegd aan gekweekte cellen. De mate waarin deze cellen worden beschermd tegen infectie, is een maat voor de neutraliserende capaciteit van het patiëntens serum (*figuur 3*). Neutrali-

Figuur 4. Schematische weergave van flavivirusdeeltjes en virusgeïnfecteerde cellen.



Flavivirusdeeltjes bevatten RNA en drie structurele eiwitten (envelopeiwit (E), pre-membraaneiwit (prM) en kerneiwit (C)). Infectie van cellen leidt tot de productie van onder andere het niet-structurele eiwit 1 (NS1), dimeren in het celmembraan en secretie van NS1-hexameren in het bloed.

satietesten zijn over het algemeen in-house ontwikkelde testen waarbij de keuze van het gebruikte virusisolaat, validatie, standaardisatie en kwaliteitscontrole de nodige aandacht, expertise en tijd vragen. Neutralisatietesten zijn daarom minder geschikt als routinematig diagnostisch hulpmiddel ten tijde van acuut hoog aanbod. Ze zijn echter onontbeerlijk bij een uitbraak met 'nieuwe' virussen.

Betere differentiële diagnose door multiplextesten, uitgebreidere anamnese en verschillende bloedafnames

Een uitgebreidere anamnese, zoals gedetailleerde vaccinatie- en reishistorie, in combinatie met het ziektebeeld en serologische analyse, helpt bij het maken van een differentiële diagnose (figuur 5). Gegevens over de vaccinatie- of reishistorie ontbreken echter vaak in het patiëntendossier [16]. Daarnaast kan simultaan testen op antistoffen tegen verschillende cocirculerende virussen en/of vaccins enige mate van zekerheid bieden door eiwitbindende of virus-neutraliserende antistofprofielen te interpreteren. Zo zijn er multiplexplatformen ontwikkeld waaronder luminextesten [17] en proteïn microarrays [13], waarmee het mogelijk is om tegelijkertijd bindende antistoffen te kunnen kwantificeren tegen verschillende (verwante) virussen in één gevalideerde test (figuur 3). Deze testen gebruiken vaak de virale NS1-eiwitten omdat deze minder geconserveerde eiwitdelen bevatten dan bijvoorbeeld de E-eiwitten, wat zorgt voor meer specificiteit [13]. Een ander voordeel van NS1 als detectieantigeen is dat er geen problemen zijn met kruisreactie vanuit niet-replicerende vaccins (zonder NS1), zoals volledig geïnactiveerde vaccins of eiwitvaccins. NS1 wordt namelijk geproduceerd in geïnfecteerde cellen waarna antistoffen tegen viraal NS1 worden aangemaakt (figuur 4). Tot slot kan er, door multiplextesten te combineren met longitudinale bloedafnames, gekeken worden naar opkomende of een kwantitatieve toename van specifieke antistoffen. Veelal zal bij het inzetten van multiplexserologie de kinetiek namelijk het duidelijkste zijn bij het virus van de actuele infectie. Helaas ontbreken in de praktijk vaak gepaarde sera (vroeg en laat na infectie).

Virusintroductions en uitbreiding in Europa

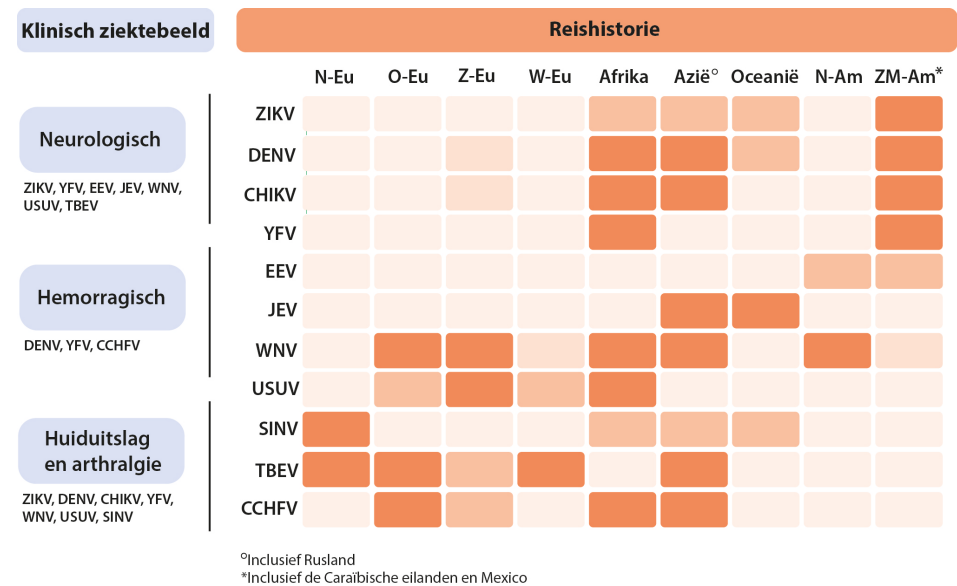
Onder invloed van onder andere klimaatverandering, internationale handel en reizen, kunnen vectoren - en daarmee de bijbehorende virussen - zich steeds verder

verspreiden. De afgelopen decennia werden de eerste tekenen hiervan aantoonbaar in Europa. De introductie van geïmporteerde arbovirussen in lokaal gevestigde populaties van de Aziatische tijgermug (*Ae. Albopictus*) leidde tot transmissie van chikungunyavirus in Italië (2007, 2017) en Frankrijk (2010, 2014, 2017) [18], denguevirus in Kroatië (2010), Frankrijk (2013-2015, 2018-2022), Spanje (2018, 2019) en Italië (2020) [19], en zikavirus in Frankrijk in 2019 [20]. Bovendien verspreiden door teken overgedragen arbo-virussen in Europa zich steeds verder zoals teken-encefalitis [6], en trekken Hyalommateken steeds verder Europa in, waar ze zorgen voor sporadische humane gevallen van het krim-congovirus in Spanje en de Balkanlanden [21]. Daarnaast hebben klimaat-effecten ook invloed op de ecologie van inheemse vectoren zoals de Europese huismug (*Cx. pipiens*), wat leidt tot een toenemende kans op uitbraken met onder andere westnijlvirus en usutuvirus. Sinds 2011 ruikt het westnijlvirus steeds verder op vanuit Zuid-Europa, met lokale uitbraken en een verhoogd aantal ernstig zieke patiënten met neurologische verschijnselen als gevolg [22].

Risico voor Nederland

Het risico op de introductie van (nieuwe) nog niet circulerende arbovirussen kan worden ingeschat door te kijken naar de verspreiding en aanwezigheid van vectoren. In Nederland werden de eerste humane westnijlvirus gevallen gedetecteerd in 2020, en sinds 2016 worden zowel het usutuvirus als het teken-encefalitisvirus sporadisch gevonden [4-6]. Een ander arbovirus, het sindbisvirus, is endemisch in Noord-Europa, waar het sporadisch leidt tot grote uitbraken. Omdat sindbisvirus wordt overgedragen door *Culex*-soorten die ook in Nederland voorkomen, is de kans op toekomstige circulatie van dit virus in Nederland aannemelijk [23], net als het Japanse encefalitisvirus en riftvalleyfevervirus dat door dezelfde muggen wordt overgedragen [23,24]. Verder worden vectoren die van belang zijn voor enkele andere arbovirussen zoals *Ae. albopictus* en Hyalomma-teken (2018-2020) sporadisch aangetroffen in Nederland [25,26]. Hoewel deze vectoren tot nu toe alleen geïmporteerd voorkwamen, bestaat de kans op vestiging met het risico op transmissie van de arbovirussen die daarbij horen [25,26].

Figuur 5. Aanvullende anamnese in arbovirusdiagnostiek bij Nederlandse reizigers.



Het klinisch ziektebeeld laat drie overlappende categorieën zien. De reishistorie kan helpen voor de verdere diagnose, door het risico van blootstelling voor ieder arbovirus per regio te bekijken (informatie is gebaseerd op WHO, ECDC, CDC). De verdeling van regio's is gebaseerd op het United Nations geoscheme, op een paar uitzonderingen na aangegeven met ° en *. N-Eu = Noord-Europa, O-Eu = Oost-Europa, Z-Eu = Zuid-Europa, W-Eu = West-Europa, N-Am = Noord-Amerika, ZM-Am = Zuid- en Midden-Amerika.

Nieuwe wereld vereist nieuwe test-mogelijkheden

Om de huidige en toekomstige uitdagingen op het gebied van arbovirale diagnostiek het hoofd te bieden, werken verschillende onderzoeksvelden samen aan innovatieve projecten. Een bekende methode om serologische testen specifiek te maken is het aanpassen van de antigenen zodat alleen virusspecifieke antistoffen binden. Zo kan flavivirusdiagnostiek geoptimaliseerd worden door gebruik te maken van envelopeiwitten met mutaties waardoor kruisreactieve antistoffen niet meer binden [27]. Een nadeel hiervan kan zijn dat de testsensitiviteit omlaaggaat. Multiplex microarray-testen, met een combinatie van zowel specifieke (gemuteerde) antigenen als meer geconserveerde eiwitten van veel verschillende (verwante) arbovirussen, zullen daarom een steeds belangrijkere rol spelen in de toekomst [13]. Het gebruik van dergelijke complexere read-outs vraagt echter om een nieuwe aanpak van het analyseproces. Zo is het zaak om de complexe anti-

stofeiwitpatronen van elkaar te onderscheiden en te verbinden aan blootstellingen aan specifieke virussen, bijvoorbeeld door middel van clustering-technieken of zelfs machinelearningmodellen. Ook bij de ontwikkeling van innovatieve serologische testen blijft het validatieproces een bottleneck. Ondanks het belang ervan, zijn er wereldwijd slechts beperkt validatiecohorten van voldoende kwaliteit beschikbaar. Essentiële gegevens in de anamnese zijn vaak niet verzameld of vereisen medisch-ethische toetsing voor gebruik. Met name in acute situaties bemoeilijkt dit snelle actie. Het opstellen van breedgedragen medisch-ethische toestemming voor geanonimiseerd gebruik van materialen voor assay-validatie kan hierbij een verschil maken. Tot slot is er vaak een gebrek aan longitudinale afnames voor de validatie van assays in verschillende fases van infectie. Dit toont het belang aan van serum-bankstudies, waarin sera worden afgenomen en opgeslagen voor toekomstige vraagstellingen en het verbeteren van diagnostiek.

Vorbereiden op toekomstige uitbraken: waar verschillende disciplines samen komen

De huidige focus binnen de diagnostiek ligt vooral op bekende arbovirussen. Echter, nieuwe (zoönotische) introducties zijn echter niet uit te sluiten. Een goed voorbeeld was de introductie van het zikavirus in Zuid-Amerika, waar het een golf van aangeboren afwijkingen veroorzaakte door infectie tijdens de zwangerschap [28]. Dit geeft het belang aan van zowel een goede samenwerking tussen laboratoria voor een snelle en efficiënte respons, als van vroegtijdige detectie van nieuwe introducties door monitoring van arbovirussen in lokale vectorpopulaties en (wilde) dieren die mogelijk kunnen functioneren als gastheer. Trekvogels zijn amplificerende gastheren voor arbovirussen zoals westnijlvirus en usutu virus, en spelen een grote rol in de verspreiding door introductie in naïeve ecosystemen die geschikt zijn voor verdere transmissie. In Nederland werkt het referentielaboratorium van het Erasmus Medisch Centrum hierin samen met het One Health PACT consortium [29], met grootschalige screening-programma's voor nieuwe en bekende arbovirussen in migrerende vogels, muggen en teken die kunnen bijdragen aan een uitbraak-waarschuwingssysteem [30]. Data en eventuele signalen van nieuwe introducties worden vervolgens gedeeld met de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) en het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) voor waarschuwing en bestrijding.

Conclusie en toekomst

Momenteel is de differentiële diagnose in arbovirale casuïstiek gebaseerd op het klinische beeld in combinatie met de epidemiologische anamnese (reishistorie, vaccinatiehistorie en eventueel eerder doorgemaakte infecties met arbovirussen) en virologische en serologische laboratoriumdiagnostiek. Door overeenkomende klinische ziektebeelden en antistofkruisreactiviteit zijn infecties met verwante, soms cocirculerende arbovirussen echter moeilijk van elkaar

te onderscheiden, waardoor het lastig kan zijn om een exacte diagnose te stellen. Met een toekomst van steeds meer circulerende arbovirussen in Europa, inclusief Nederland, zal bijbehorende serologische laboratoriumdiagnostiek steeds ingewikkelder worden. De ontwikkeling van meer geavanceerde serologische testen is daarom een prioriteit voor onderzoek, met naast de nadruk op bekende circulerende virussen ook een focus op (nog) opkomende virussen ter voorbereiding op mogelijke uitbraken. Internationale samenwerkingen en netwerken zijn hierbij cruciaal voor een snelle en efficiënte respons wanneer nieuwe virussen en/of virusuitbraken worden gedetecteerd.

Referenties

1. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *SJ Clin Virol*. 2012 Nov 1;55(3):191-203.
2. Figueiredo LTM. Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:259.
3. Franklins LHV, Jones KE, Redding DW, Abubakar I. The effect of global change on mosquito-borne disease. *Lancet Infect Dis*. 2019;19(9):e302-12.
4. Rijks JM, Kik M, Slaterus R, et al. Widespread Usutu virus outbreak in birds in The Netherlands, 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(45):30391.
5. Vlaskamp DRM, Thijsen SFT, Reimerink J, et al. First autochthonous human west nile virus infections in the Netherlands, July to August 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(46):1-4.
6. RIVM. Spread of tick-borne encephalitis virus in the Netherlands | RIVM [Internet]. Available from: <https://www.rivm.nl/en/news/spread-of-tick-borne-encephalitis-virus-in-netherlands>
7. Santiago GA, Vázquez J, Courtney S, et al. Performance of the Trioplex real-time RT-PCR assay for detection of Zika, dengue, and chikungunya viruses. *Nat Commun*. 2018;9(1):1-10.
8. Voermans JJC, Pas SD, Linden A van der, et al. Whole-Blood Testing for Diagnosis of Acute Zika Virus Infections in Routine Diagnostic Setting. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2019;25(7):1394. Available from: <https://pmc/articles/PMC6590769/>
9. Mello C da S, Cabral-Castro MJ, de Faria LCS, Peralta JM, Puccioni-Sohler M. Use of Cerebrospinal Fluid for the Diagnosis of Neuroinvasive Dengue, Zika, and Chikungunya: A 19-year systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2021;54:2021.
10. Verstrepen BE, Fagrouch Z, van Heteren M, et al. Experimental Infection of Rhesus Macaques and Common Marmosets with a European Strain of West Nile Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(4):e2797.
11. Erra EO, Korhonen EM, Voutilainen L, Huhtamo E, Vapalahti O, Kantele A. Dengue in Travelers: Kinetics of Viremia and NS1 Antigenemia and Their Associations with Clinical Parameters. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(6):e65900. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0065900>
12. Nascimento EJM, Huleatt JW, Cordeiro MT, et al. Development of antibody biomarkers of long term and recent dengue virus infections. *J Virol Methods* [Internet]. 2018;257:62-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29684416/>

13. Cleton NB, Godeke GJ, Reimerink J, et al. Spot the Difference—Development of a Syndrome Based Protein Microarray for Specific Serological Detection of Multiple Flavivirus Infections in Travelers. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3).
14. Rothman AL. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(8):532-43.
15. Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol*. 2008;21(2):123-32.
16. Cleton N, Reusken C, Murk JL, et al. Using routine diagnostic data as a method of surveillance of arboviral infection in travellers: A comparative analysis with a focus on dengue. *Travel Med Infect Dis*. 2014;12(2):159-66.
17. Raulino R, Thaurignac G, Butel C, et al. Multiplex detection of antibodies to Chikungunya, O'nyong-nyong, Zika, Dengue, West Nile and Usutu viruses in diverse non-human primate species from Cameroon and the Democratic Republic of Congo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021;15(1):1-20.
18. ECDC. Autochthonous transmission of chikungunya virus in mainland EU/EEA, 2007–present [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/chikungunya-virus-disease/surveillance-threats-and-outbreaks/autochthonous>
19. ECDC. Autochthonous transmission of dengue virus in mainland EU/EEA, 2010-present [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/dengue/surveillance-and-disease-data/autochthonous-transmission-dengue-virus-eueea>.
20. ECDC. Zika virus disease in Var department, France. 2019.
21. ECDC. Factsheet about Crimean-Congo haemorrhagic fever [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/crimean-congo-haemorrhagic-fever/facts/factsheet>.
22. ECDC. Weekly updates: 2022 West Nile virus transmission season [Internet]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>.
23. Hesson JC, Rettich F, Merdić E, et al. The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Med Vet Entomol*. 2014;28(2):179-86.
24. Esser HJ, Liefing Y, Ibáñez-Justicia A, et al. Spatial risk analysis for the introduction and circulation of six arboviruses in the Netherlands. *Parasit Vectors*. 2020;13(1):1-20.
25. Uiterwijk M, Ibáñez A, van den Vossenberg B, et al. Imported Hyalomma Ticks in The Netherlands 2018-2020. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):244.
26. Ibáñez-Justicia A, Alcaraz-Hernández JD, van Lammeren R, et al. Habitat suitability modelling to assess the introductions of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the Netherlands. *Parasit Vectors* [Internet]. 2020;13(1):1-13. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-020-04077-3>.
27. Berneck BS, Rockstroh A, Barzon L, et al. Serological differentiation of West Nile virus- and Usutu virus-induced antibodies by envelope proteins with modified cross-reactive epitopes. *Transbound Emerg Dis*. 2022;69(5):2779-87.
28. Kleber De Oliveira W, Vinícius G, De França A, et al. Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. *The Lancet*. 2017;390:861-70.
29. Home - One Health PACT [Internet]. Available from: <https://www.onehealthpact.org/>.
30. Sikkema RS, Schrama M, Van Den Berg T, et al. Detection of West Nile virus in a common whitethroat (*Curruca communis*) and *Culex* mosquitoes in the Netherlands, 2020. *Eurosurveillance*. 2020;25(40):1-6