



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

A photograph of a laboratory setting. In the foreground, a black rack holds several clear glass vials with blue caps. The background is blurred, showing a person in a white lab coat.

CIb-IDS rapportage 2014

Cib-IDS rapportage 2014

Colofon

Eindredactie:

Nico Meessen, Centrumhoofd Clb-IDS, nico.meessen@rivm.nl; 030-2742867

Ellen Stobberingh, Topexpert bacteriologie *ad interim*, ellen.stobberingh@rivm.nl; 030-2742265

Ingrid van de Pol, communicatieadviseur, ingrid.van.de.pol@rivm.nl; 030-2747588

Coverfoto:

RIVM-beeldbank

© RIVM 2015

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

Inhoudsopgave

Colofon	2
Voorwoord	7
2 Surveillance Humaan papillomavirus: de eerste effecten van vaccinatie	10
3 Genotypering hepatitis B-virussen	13
4 Bof, mazelen, rodehond (BMR) en vijfde ziekte: diagnostiek, surveillance en onderzoek	16
5 Enterovirus D68-epidemie in 2014	24
6 Poliovirusexclusie en Enterovirus surveillance in 2014	29
7 Laboratoriumrespons na melding van lozing van virulent poliovirus in België	33
8 VIRO-TypeNed 2013-2014; Enterovirus- en humaan parechovirus surveillance	36
9 Surveillance gastro-enteritisvirus	40
10 Genotypering rotavirus	44
11 Antivirale middelen tegen enterovirussen: de impact van antivirale resistentie voor volksgezondheid	47
12 Kweek van influenzavirussen, een uitdaging	50
13 Influenzasurveillance en genetische karakterisering van influenzavirussen in seizoen 2013-2014, begin seizoen 2014-2015 en van bijzondere aanvragen	54
14 Genotypering hepatitis A-virus	59
15 Hepatitis E-virus: diagnostiek en typering	63
16 Bijzondere virologische diagnostiek: zoönosen en zeldzame infecties	68
17 Emerging infecties en bijzondere diagnostiek: Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus	74
18 Surveillance van gastro-enteritis isolaten	78
19 MRSA-surveillance	81
20 Surveillance van carbapenemresistente micro-organismen	85
21 Pneumokokken: niet alleen serotype, maar ook genotype kan van invloed zijn op de ernst van de ziekte	89

22	De opkomst van vaccin-antigeendeficiënte <i>Bordetella pertussis</i> -stammen in Nederland: tijd voor maternale vaccinatie?	91
23	Identificeren van hoogpathogene Gramnegatieve bacteriën met behulp van MALDI-TOF MS	98
24	Parasieten: diagnostiek, trendanalyse en emerging infecties	101
25	Mycobacteriën	106
26	Tuberculose; samenwerking met WHO	110
27	Bacteriële serologie	114
28	Screening op het Syndroom van Down voor de noordoostelijke provincies	120
29	Digitale efficiency bij het aanvragen van een combinatietest	122
30	Hieprikscreening bij Clb-IDS: nieuws in 2014	123
	Bijlage 1 Publicatielijst Clb-IDS 2014	128
	Bijlage 2 Opleidingen verzorgd door Clb-IDS in 2014	129
	Bijlage 3 Referentielaboratoria binnen Clb-IDS	130
	Bijlage 4 Organisatie RIVM en Managementteam IDS	131
	Bijlage 5 Afkortingen en acroniemen	132

Jaarrapportage IDS 2014

Veel (ziekenhuis)laboratoria sturen het te onderzoeken materiaal van patiënten naar het Centrum Infectieonderzoek, diagnostiek en screening (IDS) van het RIVM. Het gaat dan vooral om bijzondere diagnostiek waarvoor de laboratoria zelf geen test in huis hebben. Ook komen patiëntmaterialen binnen om te monitoren in welke mate bepaalde ziekteverwekkende micro-organismen voorkomen. Met de verkregen resultaten houdt het RIVM een vinger aan de pols hoe vaak en waar deze micro-organismen voorkomen. Op die manier kan snel worden gereageerd op (plotselinge) ontwikkelingen op het gebied van infectieziekten.

De resultaten worden jaarlijks beschreven om inzenders van patiëntmaterialen inzicht te geven in wat er is gedaan aan diagnostiek, screening en onderzoek naar infectieziekten. In de jaarrapportage 2014 zijn onder andere de eerste monitoringsresultaten van de vaccinatie tegen het baarmoederhalskankervirus (HPV) te zien: het lijkt erop dat er minder HPV onder de doelgroep voorkomt en dat de opkomst voor de vaccinatie is gestegen. Verder is onderzocht waarom het huidige vaccin tegen kinkhoest minder goed werkt. Ook ondersteunt IDS Bonaire, Sint Eustatius en Saba in de Caribische Zee (de BES-eilanden) bij de diagnostiek van Chikungunya, een virus dat wordt overgedragen door muggen. Deze eilanden vallen sinds 2010 onder Nederlands bestuur.

Het onderzoek bij IDS bestaat er vooral uit om innovatieve laboratoriumtesten te ontwikkelen en te verbeteren, in het belang van de openbare gezondheidszorg.

IDS Annual Report 2014

Many (hospital) laboratories send their patient materials to RIVM's Centre for Infectious Diseases Research, Diagnostics and Screening (IDS) for testing, particularly if special diagnostic procedures are required for which these laboratories lack the necessary testing facilities. Patient materials are also sent to IDS in order to monitor the incidence of specific pathogenic micro-organisms. The results obtained enable RIVM to keep track of where and how frequently these micro-organisms occur, facilitating a rapid response to any (sudden) development in the incidence of infectious diseases.

The results of these activities are summarized in an Annual Report to provide stakeholders with insight into infectious diseases research, diagnostics and screening. The IDS Annual Report 2014 includes the initial monitoring results for the vaccination campaign to prevent Human Papillomavirus (HPV): the incidence of HPV in the target group appears to have decreased, and the participation rate has risen. The Centre also investigated the lack of efficacy of the currently used whooping cough vaccine. IDS supports the health authorities on the Caribbean islands of Bonaire, Sint Eustatius and Saba in diagnosing infections caused by the Chikungunya virus, which is transmitted by mosquitoes. Since the dissolution of the Netherlands Antilles in October 2010, these islands have enjoyed the status of 'special municipality' or 'public body' within the Kingdom of the Netherlands.

Research at IDS is mainly focused on the development and optimization of innovative laboratory tests that can help to improve public health.

Voorwoord

Voor u ligt de jaarrapportage over 2014, van het Centrum Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS), onderdeel van het Centrum Infectieziektebestrijding (CIb) van het RIVM. In deze versie van de CIb-IDS-jaarrapportage wordt een beeld gegeven van de verrichtingen en ontwikkelingen in 2014 en schetst daarmee ook de ambitie van CIb-IDS in het kader van de taken voor de openbare gezondheidszorg (OGZ), relevante wetenschappelijke ontwikkelingen en microbiologische diagnostiek. De rapportage laat zien waaraan CIb-IDS in de periode januari 2014 tot en met december 2014 heeft gewerkt, welke resultaten er zijn behaald en welke kansen er nog liggen. De opsomming is niet uitputtend.

CIb-IDS verricht microbiologische taken behorend bij de OGZ-functie van het centrum. Deze bestaan uit onder andere de diagnostiek van bijzondere micro-organismen en de (moleculaire) typering in het kader van transmissie-onderzoek.

Daarnaast levert CIb-IDS via strategische samenwerkingsverbanden met de veldpartijen een belangrijke bijdrage aan de invulling van de taken ten behoeve van de OGZ. Ook op het terrein van wetenschappelijke ontwikkeling heeft IDS de ambitie om samenwerking te zoeken met de veldpartijen.

De ontwikkelingen binnen CIb-IDS bevinden zich in een veranderingsproces dat ruim twee jaar geleden is ingezet. In 2014 zijn de taken en verantwoordelijkheden van de medewerkers binnen CIb-IDS verder uitgekristalliseerd. Door enkele personele mutaties in het managementteam van CIb-IDS is de continuïteit van deze functies geborgd. In augustus is dr. Nico Meessen, arts-microbioloog, aangesteld als centrumhoofd IDS. Hij volgt daarmee dr. Berry Overbeek op die de positie vanaf 2013 ad interim heeft bekleed. Georget van den Burg is benoemd als hoofd van de afdeling Pre- en Neonatale Screening en bacteriële serologie en dr. Barry Rockx als hoofd van de afdeling Virale zeldzame en emerging infecties en respons.

Het jaar 2014 heeft vooral in het teken gestaan van het onderhouden en verbeteren van het kwaliteitssysteem. In december 2014 heeft de Raad voor Accreditatie voor de duur van vijf jaar de CCKL-accreditatie verleend aan het Centrum Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS), Medische Microbiologie, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu te Bilthoven (registratienummer R364, accreditatienummer 310). Speerpunten in 2015 zijn de borging van het kwaliteitssysteem en de herijking van de CIb-IDS-bedrijfsvoering. Er is en wordt fors ingezet op het kwaliteitsbewustzijn in de CIb-IDS-organisatie.

Om de leesbaarheid van deze rapportage te vergroten, zijn enkele bijlagen toegevoegd. In Bijlage 1 treft u de link naar de volledige publicatielijst. Bijlage 2 geeft u een overzicht van onze bijdrage aan opleidingen in 2014. De lijst met referentielaboratoria binnen CIb-IDS staat vermeld in Bijlage 3. De samenstelling van het managementteam van IDS vindt u in Bijlage 4 en een lijst met afkortingen en acroniemen staat in Bijlage 5.

Meer informatie over de diagnostiek die binnen Clb-IDS wordt uitgevoerd is te lezen op onze website; scan de QR-code of gebruik de link: [www.rivm.nl/diagnostisch vademecum](http://www.rivm.nl/diagnostisch_vademecum).

Dr. Nico Meessen, Centrumhoofd Clb-IDS



RVP en virologie

2 Surveillance Humaan papillomavirus: de eerste effecten van vaccinatie

Auteur: Elske van Logchem

Betrokkenen: Audrey King, Elske van Logchem, Naomi van Marm-Wattimena, Robine Donken, Madelief Mollers, Pascal Rog, Fiona van der Klis en Hester de Melker

Contactpersoon: Audrey King (audrey.king@rivm.nl)



Een infectie met humaan papillomavirus (HPV) is seksueel overdraagbaar en kan leiden tot baarmoederhalskanker. De meeste seksueel actieve personen lopen wel eens een HPV-infectie op. Deze blijft vaak onopgemerkt en wordt meestal door het lichaam weer opgeruimd. Soms blijft het virus aanwezig en kan er een voorstadium van baarmoederhalskanker ontstaan. HPV16- en HPV18-virussen zijn verantwoordelijk voor 70% van alle gevallen van baarmoederhalskanker. Sinds 2009 is in Nederland de vaccinatie tegen humaan papillomavirus (HPV type 16 en 18) onderdeel van het Rijksvaccinatieprogramma (RVP). Meisjes van 12 jaar ontvingen toen het Cervarix® vaccin volgens een schema van 0, 1 en 6 maanden. Ook is in 2009 een inhaalcampagne gehouden voor 13-16-jarige meisjes.

Het RIVM-Cib is verantwoordelijk voor de monitoring van de effecten van de HPV-vaccinatie in Nederland. Het verwachte effect van de HPV16/18-vaccinatie op het aantal gevallen van baarmoederhalskanker, veroorzaakt door HPV16/18-virus, is pas meetbaar over een aantal jaren. Tot die tijd meten we de vroege effecten van HPV-vaccinatie aan de hand van het voorkomen van (persisterende) HPV-infecties in de doelgroep van de vaccinatie: adolescenten en jongvolwassenen. Uit de 'normale diagnostiek' zijn geen monsters voorhanden en daarom zijn studies opgezet door het Cib-RIVM in samenwerking met VUmc Amsterdam, GGD's en MML's om anogenitale monsters in deze groepen te verzamelen:

1. Jonge meisjes (14-16 jaar bij start van de studie) die wel of niet gekozen hebben voor HPV-vaccinatie;
2. Vrouwen die zich hebben aangemeld voor een Chlamydiascreening (16-29 jaar);
3. Bezoekers van de SOA-poli's (m/v, 16-24 jaar);
4. Mannen die seks hebben met mannen (> 18 jaar); dit is een samenwerking met de GGD Amsterdam.

Cib-IDS is betrokken bij de coördinatie van deze studies. Daarnaast is zij verantwoordelijk voor de HPV-detectie en -genotypering (SPF10 PCR-amplificatie en LiPA-genotypering) binnen deze studies. Deze wordt in sommige studies deels uitbesteed aan verschillende Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's), die de HPV-detectie en -genotypering volgens een vaststaand protocol uitvoeren. De reproduceerbaarheid van HPV-detectie en -genotypering die de MML's uitvoeren, meet het Cib-IDS door een hertest op 5% van alle positieve en negatieve monsters.

2.1 Uitgelicht: HAVANA-studie (HPV Amongst Vaccinated And Non-vaccinated Adolescents)

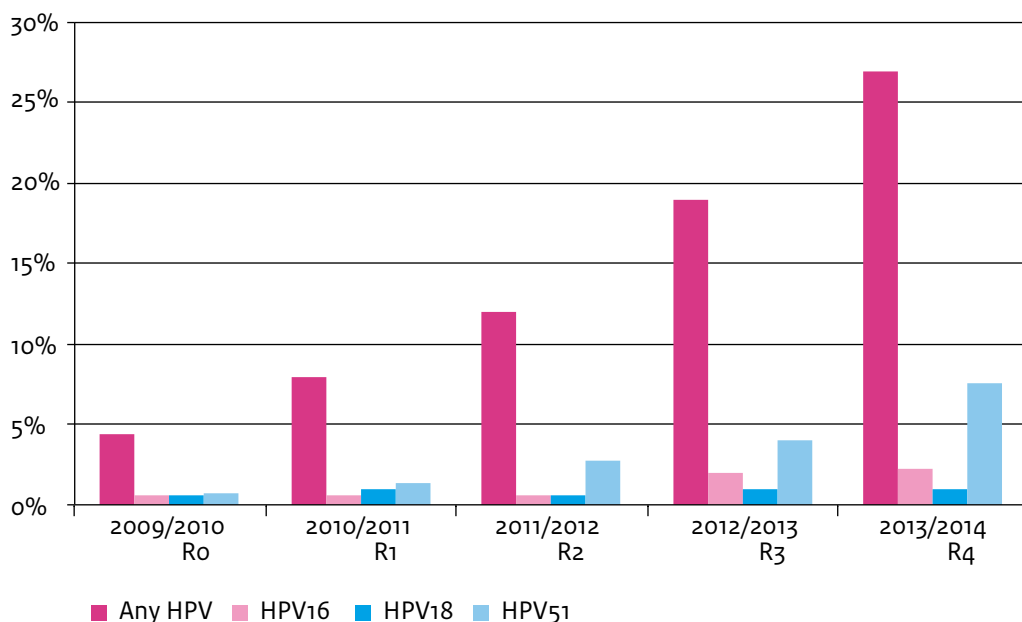
De HAVANA-studie startte in 2009/2010, en in 2014 wordt de vierde ronde afgerond. Hierin monitoren we het voorkomen van HPV-infecties in een groep jonge meisjes. Voor deze studie zijn 1800 meisjes van 14-16 jaar uitgenodigd. Hiervan was 55% gevaccineerd en 45% niet gevaccineerd. Zij vulden een vragenlijst in en namen een vaginale zelf-swab af. In deze zelf-swabs is de HPV-DNA-status door Clb-IDS bepaald. Sinds de start van de studie worden deze meisjes jaarlijks gevolgd.

In 2014 is voor het vijfde jaar op rij de HPV-prevalentie in deze groep bepaald; 1244 meisjes namen deel aan ronde 4. Bij 339 van deze meisjes is typespecifiek HPV-DNA gedetecteerd. Bij 19% van deze meisjes ging het om een hoog-risico HPV-type (hrHPV). De drie meest voorkomende types waren hrHPV type 16 (2.2%), 18 (1.0%) en 51 (7.6%) (Tabel 1, Figuur 1). Tabel 1 toont ook de HPV-prevalentie in deze groep meisjes in de voorgaande jaren. In Figuur 1 zien we een stijging in het voorkomen van alle types HPV-virus. Waarschijnlijk komt dit door de toegenomen seksuele activiteit van de meisjes. Daarnaast blijkt dat de stijging in het voorkomen van de vaccintypes HPV 16 en 18 minder is dan die van het niet-vaccintype HPV 51.

Tabel 1. Prevalentie van HPV (percentages)

Test Jaar	Ronde	Any HPV	HPV16	HPV18	HPV51
2009/2010	R0	4.4%	0.6%	0.6%	0.7%
2010/2011	R1	8.0%	0.6%	1.0%	1.4%
2011/2012	R2	12.0%	0.6%	0.6%	2.7%
2012/2013	R3	19.0%	2.0%	1.0%	4.0%
2013/2014	R4	27.0%	2.2%	1.0%	7.6%

Figuur 1. Prevalentie van type-specifiek HPV-DNA (any HPV), HPV16, HPV18 en HPV51



2.2 Vaccineffectiviteit (VE)

In de HAVANA-studie is de vaccineffectiviteit (VE) berekend door het aantal HPV-infecties in de groep gevaccineerde en de groep ongevaccineerde deelnemers te vergelijken. Deze berekeningen zijn uitgevoerd tot drie jaar na vaccinatie (ronde 3). De VE tegen incidentie HPV16- en HPV18-infecties onder meisjes bij wie in de eerste ronde geen hrHPV-infectie was aangetoond, was 73% (47%-86%). De VE tegen persisterende HPV16- en HPV18-infecties (een meisje is twee jaar of langer positief voor HPV16 en/of HPV18) was 100%. Wanneer de meisjes, bij wie een hrHPV-infectie was aangetoond in ronde 0 (voor vaccinatie), ook worden meegenomen in de berekening, is de VE aanzienlijk lager (27%). Dit bevestigt het belang van vaccinatie vóór seksueel debuut. Ook in het komend jaar nodigen we de meisjes in de HAVANA-studie uit om een vragenlijst in te vullen en een vaginale zelf-swab af te nemen.

2.2.1 Publicaties en referenties

Mollers M, King AJ, Knol MJ, Scherpenisse M, Meijer CJLM, van der Klis FRM, *et.al.* "Human papillomavirus vaccine effectiveness against incident and persistent infections among young girls: results from a longitudinal Dutch cohort study." Hoofdstuk 9. Proefschrift Madelief Mollers, 2014. ISBN 978-90-5335-8252

3 Genotypering hepatitis B-virussen

Auteur: Jeroen Cremer

Betrokkenen: Kim Benschop, Audrey King, Susan Hahné, Françoise van Heiningen en Sanne Hofstraat

Contactpersoon laboratorium: Kim Benschop (kim.benschop@rivm.nl)

Met de genotypering van hepatitis B-virus (HBV) verkrijgen we meer kennis over de diversiteit van de hepatitis B-viruspopulatie in Nederland. Het Clb-IDS voert deze uit ten behoeve van infectieziektebestrijding. Kennis van genotypes is relevant bij:

- Monitoring van het ontstaan van eventuele immuun-escape mutanten;
- Bron- en contactopsporing;
- Effectiviteitsbepaling van de huidige vaccinatiecampagnes;
- Antivirale resistentie.

Het aantal OSIRIS-meldingen voor acute HBV blijft ook in 2014 dalen. Bij het schrijven van dit hoofdstuk zijn echter nog niet alle gevallen voor 2014 geregistreerd en getypeerd. Het aantal kan dus nog veranderen, maar ten opzichte van hetzelfde tijdspad van vorig jaar is ook een daling te zien. In 2014 zijn er 117 OSIRIS-meldingen voor acute HBV. Hiervan zijn 69 serum-monsters (64%) ontvangen vóór 31 december 2014 en hiervan is 90% getypeerd (Tabel 1). Het percentage ingezonden monsters van chronische HBV-dragers is ook een stuk lager (39%) (ten opzichte van voorgaande jaren, Tabel 2). Voor chronische gevallen gemeld in de MSM (Male Seks Male)-risicogroep zijn achttien meldingen binnengekomen bij OSIRIS. Hiervan zijn er zeven ingezonden (Tabel 2) en 3 getypeerd.

Tabel 1. Aantal OSIRIS-meldingen en ingezonden voor acute HBV

Acute	2010	2011	2012	2013	2014
Meldingen OSIRIS	196	163	167	148	117
Ingezonden monsters	111	99	85	98	69
Genotype resultaat	106	93	82	93	62

Tabel 2. Aantal meldingen OSIRIS en ingezonden voor chronische HBV

Chronisch*	2010	2011	2012	2013	2014
Meldingen OSIRIS	33	28	25	35	18
Ingezonden monsters	23	13	6	22	7

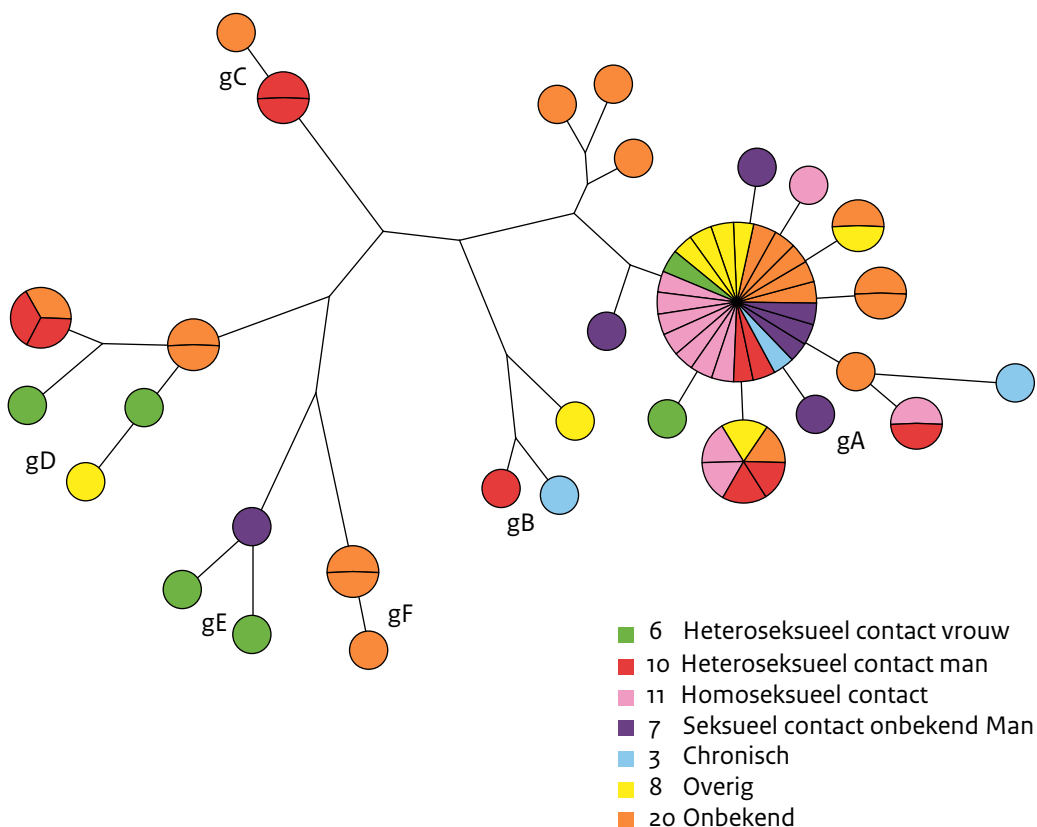
*Chronische hepatitis B in de MSM-*risicogroep*

De serummonsters van zowel chronische als acute gevallen worden getypeerd. Met deze genotypering worden de S-regio (656 nt) en de C-regio (655 nt) van het genoom gekarakteriseerd. In Figuur 1 zijn resultaten van de S-regio weergegeven.

Er zijn zes verschillende genotypes gevonden in 2014: genotype A (n=45), B (n=3), C (n=3), D (n=8), E (n=3) en F (n=3). In totaal zijn er dertig verschillende sequenties gevonden, weergegeven als clusters (bollen) in Figuur 1. Negen van deze dertig clusters bestaan uit meer dan twee monsters. Een derde van de getypeerde monsters is een genotype A. De helft van de genotype A-stammen heeft dezelfde sequentie en komt voor bij alle transmissieroutegroepen. De grootste groep in dit cluster is homoseksueel contact (MSM, n=11) (roze). De MSM is alleen vertegenwoordigd in genotype A. Van de drie getypeerde chronische stammen zijn er twee met genotype A en een met genotype B.

We kunnen concluderen dat de verdeling tussen de verschillende genotypes redelijk gelijk blijft aan voorgaande jaren. De meeste gevonden sequenties behoren tot genotype A, waarbij een groot deel een identieke sequentie heeft. Na genotype A wordt genotype D het meest gevonden. De overige genotypes komen dit jaar allemaal even veel voor. Op dit moment werken we aan de uitvoering van VIRO-TypeNed om moleculaire surveillance van HBV, HAV en HCV te ondersteunen (zie ook hoofdstuk 10 “VIRO-TypeNed 2013-2014; Enterovirus- en humaan-parechovirus-surveillance”). Het platform combineert moleculaire data met epidemiologische data, zodat een meer diepgaande surveillance van HBV mogelijk is. Ook het monitoren van bronnen, het detecteren van antivirale resistentie en van ‘immune escape’-varianten behoort tot de mogelijkheden.

Figuur 1. Basic maximum parsimony tree, gebaseerd op de S-regio van 65 HBV-monsters uit 2014. In de legenda is het aantal geteste monsters en de meest waarschijnlijke transmissie-route weergegeven



3.1.1 Publicaties en referenties

Niesters HG, Rossen JW, van der Avoort H, Baas D, Benschop K, Claas EC, *et.al.* "Laboratory-based surveillance in the molecular era: the TypeNed model, a joint data-sharing platform for clinical and public health laboratories." *Euro surveillance: bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin.* 2013;18(4):20387

Soetens LC, van Benthem BHB, Urbanus A, Cremer J, Benschop KSM, Rietveld A, *et.al.*

"Molecular Epidemiology suggests Ongoing Transmission of Hepatitis B Virus in Rural Parts of the Netherlands." 2009-2013. Accepted for publication in PLOS One

4 Bof, mazelen, rodehond (BMR) en vijfde ziekte: diagnostiek, surveillance en onderzoek

Auteurs: Daphne Gijselaar

Betrokkenen: Sigrid Gouma, Jeroen Kerkhof, Jeroen Cremer, Susan Hahné, Rob van Binnendijk

Contactpersoon: Rob van Binnendijk (rob.van.binnendijk@rivm.nl)

Het Clb-IDS voert voor het Rijksvaccinatieprogramma diagnostiek, moleculaire typering en uitbraakgerelateerd onderzoek uit van bof, mazelen en rodehond. De aanvragen zijn afkomstig van de GGD'en en van perifere laboratoria. Bij uitbraken van exantheem voeren we ook differentiatie uit naar de verwekker van vijfde ziekte (B19V), naast mazelen en rodehond.

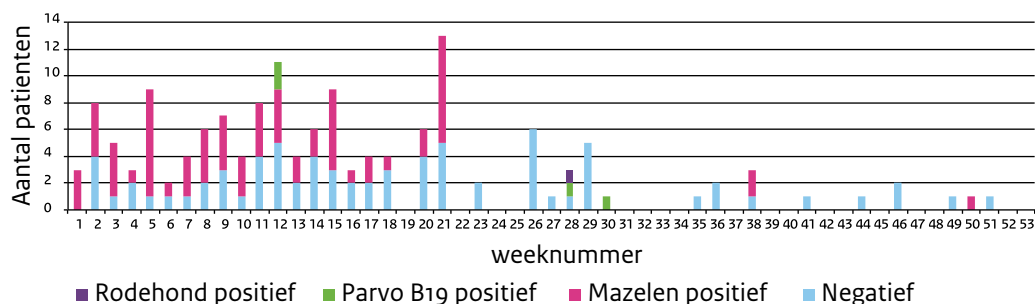
4.1 Diagnostiek mazelen, rodehond en vijfde ziekte

In 2014 zijn bij Clb-IDS 226 klinische monsters onderzocht op mazelen, rubella of B19V. Deze monsters zijn afkomstig van in totaal 151 personen met exantheem. GGD'en stuurden 142 monsters in en de perifere laboratoria 84 (Tabel 1). Afnamesets voor speeksel en vingerprikbloed zijn specifiek samengesteld voor de GGD'en en aan hen verzonden. Speeksel is hierbij het uitgangsmateriaal voor de mazelen/rubella-diagnose. Deze wordt gesteld met behulp van realtime-PCR. Vingerprikbloed wordt gebruikt voor detectie van B19V-IgM (ELISA). Met behulp van de *protein micro array* is het mogelijk om gelijktijdig IgM te detecteren tegen mazelen en rubella en B19V (Figuur 1). Perifere laboratoria sturen over het algemeen keel/neus/mond-uitsmeren en urines in voor virale detectie (PCR, Tabel 1). Bij een positieve laboratoriumdiagnose voor mazelen of rodehond wordt aansluitend een genotypering verricht. Deze typering is voor mazelen op basis van het N-gen (450bp) en voor rubellavirus op basis van het E1-gen (739bp). Dit wordt gedaan voor bron- en contactopsporing. De typeringsdata worden op een gestandaardiseerde manier in een moleculaire database geplaatst. Deze database wordt door de WHO gecoördineerd.

Tabel 1. Overzicht van diagnostieaanvragen voor exantheemziekten bij Clb-IDS in 2014

Monstertype		Laboratorium- inzendingen	Positief (%)	GGD- inzendingen	Positief (%)
Serum / Vinger- prikbloed	Mazelen IgM	16	5 (31%)	26	6 (23%)
	Rodehond IgM	0	0		1 (4%)
	B19V IgM	0	0		4 (15%)
Speeksel	Mazelen PCR	0	0	85	32 (38 %)
	Rodehond PCR		0		1 (3 %)
Keel/Neus/ Mond-uitstrijk	Mazelen PCR	45	29 (64 %)	7	5 (71 %)
	Rodehond PCR		1 (2 %)		1 (14 %)
Urine	Mazelen PCR	17	8 (47 %)	23	7 (30 %)
	Rodehond PCR		0		1 (4 %)
Overig	Mazelen PCR	6	1 (17 %)	1	1 (100 %)
	Rodehond PCR		0		0
Totaal		84		142	

Figuur 1. Aanvragen voor exantheemdiagnostiek in 2014 per week



4.2 Mazelen

Vanaf mei 2013 is er in Nederland sprake van een mazelenepidemie, vooral in de gebieden waar de vaccinatiegraad lager is dan het landelijk gemiddelde. Het mazelenvirusgenotype D8, subtype "Taunton", is hierbij vastgesteld. Dit genotype is op dat moment ook wijdverspreid binnen Europa. De epidemie is begin 2014 nog niet ten einde. Het laatste geval dat epidemiologisch en moleculair gerelateerd is aan de epidemie wordt in week 10 gemeld (Tabel 2, cluster 1). Vanaf week 7 worden echter mazelengevallen en -clusters gemeld waarbij de genotypering wijst op andere bronnen en transmissies.

Tabel 2. Mazelenclusters in Nederland in 2014 op basis van moleculaire epidemiologie

Cluster	periode	genotype	aantal cases	locatie	bron/import
1	week 1-10	D8 "Taunton"	56*	landelijk	NL epidemie 2013/2014
2	week 11-14	D8 "India"	4*	Limburg	India
3	week 20	D8 "India"	2	Zuid-Holland	India
4	week 7-12	B3 "Harare"	7	Schiphol	onbekend
5	week 7-15	B3 "Tonbridge"	6	Schiphol	Filippijnen
6	week 10-17	B3 "Tonbridge"	34*	Den Haag e.o.	onbekend
7	week 11-17	B3 "Tonbridge (C339T)"	12	Den Haag e.o.	onbekend
8	week 35-38	H1	3*	Zuid-Holland/ Utrecht	Thailand

* inclusief niet-getypeerde cases (epidemiologisch gelinkt)

Tussen maart en mei is mazelen vastgesteld bij zes niet-gevaccineerde personen in de regio's Limburg en Zuid-Holland. Het gaat hierbij opnieuw om een genotype D8, maar met een andere genetische variatie dan "Taunton" en gerelateerd aan import uit India (clusters 2 en 3).

Vanaf februari 2014 signaleren we relatief grote clusters van mazelen in de omgeving van Schiphol en aansluitend in Den Haag en omgeving. Hierbij vinden we drie genetische varianten van het genotype B3-mazelenvirus, namelijk "Harare", "Tonbridge" en een mutant van deze "Tonbridge" (Tabel 2, clusters 4-7). Genotype B3 is oorspronkelijk een mazelenvirus dat endemisch circuleert in Afrika. Vooral sinds het wereldkampioenschap voetbal in Zuid-Afrika in 2010 is B3 wereldwijd meer verspreid. Na een grote mazelenepidemie op de Filipijnen en de daaropvolgende tyfoon is het B3-mazelenvirus via veel Filipijnse scheepslieden verder de wereld over gegaan. De "Harare"-variant van B3 wordt begin februari vastgesteld bij een Schipholmedewerker. Hetzelfde subtype mazelenvirus is vervolgens vastgesteld bij zes patiënten die we epidemiologisch kunnen linken aan dit voorval (cluster 4). In alle gevallen ging het om volwassenen die vanwege leeftijd of om andere redenen niet, of gedeeltelijk (1x), waren ingeënt tegen mazelen. De bron van infectie is niet duidelijk, maar vermoedelijk is dit een besmette passagier geweest tijdens een transfer op Schiphol. In dezelfde periode wordt ook bij twee andere Schipholmedewerkers mazelen vastgesteld. Bij hen blijkt het te gaan om de zogenaamde "Tonbridge"-variant van B3 (cluster 5). Deze variant verschilt twee nucleotiden van "Harare" op basis van N-gen-analyse, en is tot dan toe alleen gesignaleerd in het Verenigd Koninkrijk en op een cruiseschip op de Middellandse Zee. Dit blijkt een passagier te zijn van een vlucht tussen Londen en Amsterdam. Deze persoon liep op de Filipijnen mazelen op. Naast enkele besmettingen onder medepassagiers zijn in de weken erna nog eens vier secundaire "Tonbridge"-gevallen opgespoord in de regio Schiphol. Ook deze personen bleken niet, of gedeeltelijk (1x), te zijn ingeënt tegen mazelen.

Vanuit Den Haag en omgeving worden in maart en april 46 gevallen van mazelen gesignaleerd. De uitbraak begint rond een kinderdagverblijf en een kindermatinee. Hierbij zijn veel jonge kinderen aanwezig die om kritische redenen van de ouders niet zijn ingeënt tegen mazelen. Daarnaast is hier een ziekenhuis bij betrokken, vanwege de opname van twee mazelenpatiënten. Daardoor lopen acht gezondheidsmedewerkers mazelen op. Zes van deze personen bleken volledig (2x) te zijn gevaccineerd tegen mazelen. De mogelijke oorzaken van dit vaccinfalen worden op dit moment onderzocht. In deze uitbraak is opnieuw sprake van een infectie met B3 "Tonbridge" (cluster 6), maar daarnaast wordt een variant gevonden (Tonbridge C339T, cluster 7). De bron van deze uitbraak is niet duidelijk en ook het ontstaan van de variant is niet duidelijk. Het is mogelijk dat deze wel binnen dit mazelencluster is ontstaan. Er is ook geen direct epidemiologisch verband gevonden tussen dit cluster en het hierboven beschreven "Tonbridge"-cluster rondom Schiphol.

In september worden opnieuw drie gevallen van mazelen gesignaleerd onder volwassenen die om kritische redenen niet zijn ingeënt. Het gaat hierbij om een genotype H1 dat gerelateerd is aan import uit Thailand (Tabel 2, cluster 8).

Verder zijn over 2014 door de GGD'en nog negen andere gevallen gemeld (RIVM/OSIRIS). Dit gebeurde op grond van elders uitgevoerde mazelendiagnostiek in Nederland (meestal serologie). Van deze gevallen is helaas geen klinisch materiaal beschikbaar voor verder bron- en contactonderzoek.

Ten slotte zijn er in 2014 drie andere kinderen gemeld met een klinische verdenking op mazelen. Bij hen is het vaccintype mazelenvirus (genotype A) vastgesteld in het klinisch afgenomen materiaal. Het bleek dat de kinderen allemaal hun eerste BMR-vaccinatie kregen in de week/ weken voorafgaand aan de symptomen. De klinische symptomen werden in dit geval veroorzaakt door de vaccinatie en zijn niet het gevolg van een wildtype mazeleninfectie.

4.3 Rode hond

In juli 2014 wordt bij één persoon met een klinische verdenking op rodehond een rubellavirus-infectie vastgesteld. Hiervoor is serologie en PCR ingezet (Tabel 1). Het gaat om een ongevaccineerde volwassene, die de infectie opliep in Indonesië. Op basis van virustypering op het E-gen is een genotype 1E-rubellavirus aangetoond. De sequentie komt overeen met uitbraken van rodehond in Zuidoost-Azië.

4.4 Vijfde ziekte

In 2014 zijn 26 exantheemaanvragen aangeboden voor differentiële diagnostiek op mazelen, rodehond en vijfde ziekte. Hiervoor is vingerprikbloed afgenomen. Het bleek dat vier personen (kinderen) positief waren voor vijfde ziekte (B19V positieve IgM, Tabel 1). Twee positieve kinderen zijn afkomstig uit hetzelfde exantheemcluster, de overige twee zijn afzonderlijke gevallen. De testen zijn met de *protein micro array* uitgevoerd op een microhoeveelheid serum, die is verkregen uit vingerprikbloed.

Dit multiplex platform is bij Clb-IDS ontwikkeld voor de serologische differentiatie van mazelen, rubella en vijfde ziekte bij uitbraken van exantheem.

4.5 Bof

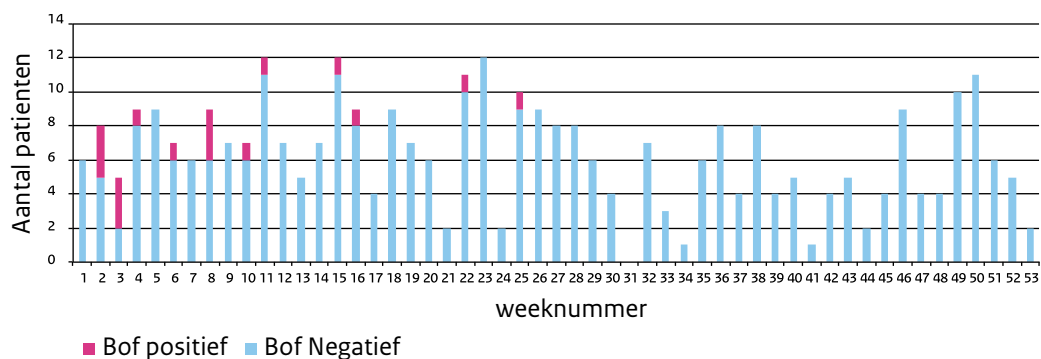
Sinds 2009 zijn verschillende bofuitbraken gerapporteerd in Nederland. Tijdens deze bofuitbraken zijn de meeste bofpatiënten 18-25 jaar oud en volledig (2x) BMR-gevaccineerd. In 2014 zijn 478 klinische materialen ingestuurd, die afkomstig zijn van 336 verschillende personen met een klinische verdenking op bof. Van deze materialen zijn er 226 ingestuurd door de GGD'en en deze zijn afkomstig van 119 personen. Het ingezonden materiaal is een combinatie van speeksel en urine, waarbij in ongeveer 88% van de gevallen beide klinische monsters zijn afgenomen. Deze zijn bedoeld voor detectie van viraal RNA met realtime-PCR (Tabel 3). Door de perifere laboratoria zijn 252 verschillende materialen ingezonden, afkomstig van 217 verschillende personen. Dit zijn vooral keel/neus/mond-uitstrijken of urine, en meestal geen combinatie van beide. Daarnaast is een beperkt aantal sera ingestuurd voor een antistofbepaling (Tabel 3).

Tabel 3. Overzicht van de bofdiagnostiekaanvragen bij Clb-IDS in 2014

Monstertype	Test	Laboratorium- inzendingen	Positief (%)	GGD- inzendingen	Positief (%)
Serum	IgM	16	0	0	0
Speeksel	PCR	9	0	118	10 (8 %)
Keel/Neus/Mond-uitstrijk	PCR	169	5 (3 %)	4	1 (25 %)
Urine	PCR	54	1 (2 %)	104	4 (4 %)
Overig	PCR	4	1 (25 %)	0	0
Totaal		252	7 (3 %)	226	6 (3 %)

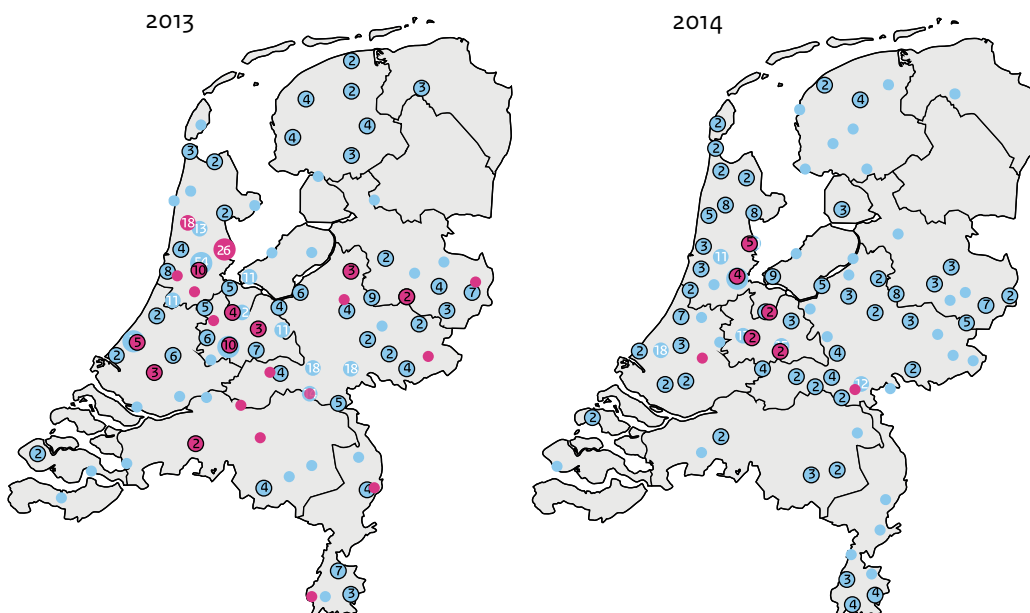
In totaal zijn zeventien van de 336 personen (5%) positief getest voor bof (Tabel 3 en Figuur 2). Dit aantal is lager dan in 2013, toen 94 van de 550 personen (17%) positief waren. In de tweede helft van het jaar bleken alle inzendingen negatief voor bof (Figuur 2). Net als in 2013 werd wel vaak diagnostiek aangevraagd vanwege een klinische verdenking op bof. Wat opvalt, is dat nog steeds aanvragen binnenkomen uit verschillende regio's in Nederland, terwijl de meeste positieve personen worden gevonden in het midden van Nederland (Figuur 3).

Figuur 2. Aanvragen voor bofdiagnostiek in 2014 per week



Voor de typering van bof wordt de sequentie van het small hydrophobic-gen (SH-gen, 316 nt) gebruikt. Bij zestien van de zeventien personen met een PCR-positief resultaat was het mogelijk het genotype te bepalen. In twee personen werd een genotype D vastgesteld en bij de overige veertien personen genotype G. Dit laatste is hetzelfde genotype dat in de meeste bofpatiënten werd gevonden tijdens de bofepidemie (2009-2012) en in 2013.

Figuur 3. Geografische verdeling van de aanvragen voor bofdiagnostiek bij Clb-IDS in 2013 en 2014



Cirkels geven de woonplaats weer van de personen van wie materiaal positief (rode cirkels) of negatief (blauwe cirkels) is getest voor bof. Clusters van personen zijn weergegeven met het aantal personen per cluster in cijfers in de betreffende cirkel.

De bofgenotypering is uitgebreid met het hemagglutinine-neuraminidase-gen (HN-gen, 1749 nt) en het fusiegen (F-gen, 1617 nt). Dit blijkt belangrijke extra moleculaire informatie op te leveren. Een eerste steekproef is uitgevoerd op de bofpositieve klinische monsters in de periode van 2010-2014. Hieruit blijkt dat de sequenties van het HN-gen en het F-gen uit 2014 bijna gelijk zijn aan de sequenties uit 2013. De HN- en F-gensequenties uit het begin van de bofepidemie (periode 2010-2011) zijn anders. Mogelijk zijn er meerdere introducties van het bofvirus geweest. Dit was niet zichtbaar met alleen de genetische informatie op het SH-gen. Het sequencen van extra genen, waaronder HN en F, vergroot de resolutie van fylogenetische data en maakt het mogelijk om kleinere subclusters te onderscheiden.

4.5.1 Publicaties en referenties

Gouma S, Sane J, Gijselaar D, Cremer J, Hahné S, Koopmans M, *et.al.* "Two major mumps genotype G variants dominated recent mumps outbreaks in the Netherlands (2009-2012)." (2014) J Gen Virol. 2014 Mar 6. doi: 10.1099/vir.0.062943-0

Gouma S, Schurink-van't Klooster TM, de Melker HE, Kerkhof J, Smits GP, Hahné SJM, *et.al.* "Mumps serum antibody levels before and after an outbreak to assess infection and immunity in vaccinated students." (2014) Open Forum Infectious Diseases 10.1093

Respiratoire en enterale virologie

5 Enterovirus D68-epidemie in 2014

Auteur: Adam Meijer

Betrokkenen: Pieter Overduin, Sharon van den Brink, Ton Marzec, Mariam Bagheri, Hans Krul, Gé Donker (NIVEL), Marit de Lange (RIVM/EPI), Anne Teirlinck (RIVM/EPI), Wim van der Hoek (RIVM/EPI), Jeroen Cremer, Annemarie van den Brandt, Bas van der Veer, Edin Jusic, Kim Benschop, Harrie van der Avoort

Contactpersoon: Adam Meijer (adam.meijer@rivm.nl)

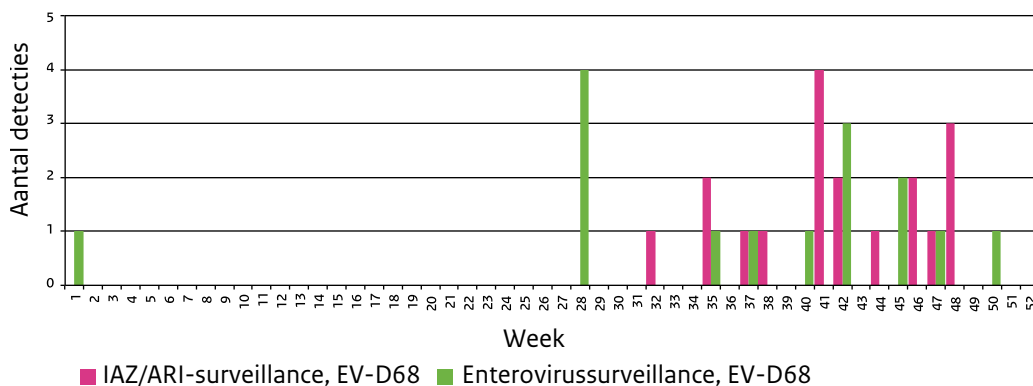
5.1 Surveillance

Enterovirus D68 (EV-D68)-infecties veroorzaken een breed spectrum aan respiratoire klachten, van asymptomatische tot ernstige pneumonie. Soms ontstaan neurologische klachten, zoals acute slappe verlamming van armen en benen. In de zomer van 2014 veroorzaakte dit virus bij kinderen in de Verenigde Staten van Amerika (VS) een enorme uitbraak van acute respiratoire infecties met kortademigheid. De uitbraak maakte massale ziekenhuisopname noodzakelijk. Een aantal kinderen overleed en bij een aantal trad acute slappe verlamming op. In 2010 is door het RIVM een uitbraak van EV-D68-infecties gedetecteerd in de huisartsenpeilstations-surveillance voor acute respiratoire infecties in Nederland (Meijer *et.al.*, *Virology*. 2012;423:49-57). Sinds die tijd monitort het RIVM dit virus in twee programma's: de huisartsenpeilstations-surveillance van acute respiratoire infecties en de enterovirussurveillance in het kader van de polio-eradicatie.

5.2 Uitbraak in 2014, epidemiologisch en klinische aspecten

Na de uitbraak in 2010 bleef EV-D68 in Nederland circuleren in een seizoensafhankelijk patroon. Net als in de VS startte detectie van EV-D68 in de late zomer van 2014 en dit liep door tot in de vroege winter (Figuur 1). Zowel in de huisartsenpeilstations-surveillance (n=18), als in de enterovirussurveillance (n=15) is EV-D68 gedetecteerd. De woonplaatsen van de patiënten waren verspreid over het hele land. Twaalf (36%) van de EV-D68-patiënten waren jonger dan 10 jaar. Voor de leeftijdsgroepen 50-59 jaar en 60-69 jaar was dit respectievelijk 18% en 12%. Voor de overige tienjarige leeftijdsgroepen tussen 10 en 90 jaar lag dit percentage tussen de 3,0% en 9,1%. Van de EV-D68-patiënten was 55% van het mannelijk geslacht. De meest prominente symptomen bij EV-D68-patiënten uit de huisartsenpeilstations-surveillance: hoesten (n=15; 89%), acuut (n=13; 72%) en loopneus (n=12; 67%). Zes (33%) patiënten vertoonden kortademigheid, wat een indicatie is voor een ernstiger, lagereluchtweginfectie. Een van deze zes patiënten en drie andere patiënten zijn gediagnosticeerd met bronchitis. Uit de enterovirussurveillance zijn van zeven van de vijftien EV-D68-patiënten klinische gegevens bekend. Kortademigheid kwam voor bij vijf van hen, waarvan een met pneumonie, een met pneumonie en bronchitis en een met bronchitis.

Figuur 1. Aantal EV-D68-detecties in de huisartsenpeilstations-surveillance voor influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) en andere acute respiratoire infecties (ARI), en de enterovirussurveillance, in Nederland, in 2014



5.3 Moleculaire karakterisering EV-D68-virussen uit 2014

Van gedeeltelijke sequenties van de VP1-genomische regio van EV-D68 is een fylogenetische analyse gemaakt (Figuur 2). De Nederlandse sequenties uit 2014 zijn direct verkregen uit klinische monsters die positief zijn voor enterovirus. De fylogenetische analyse laat zien dat de sequenties in hoofdgroepen 1 en 3 clusteren, terwijl de Amerikaanse EV-D68-sequenties uit 2014 hoofdzakelijk clusteren in hoofdgroep 1. Binnen hoofdgroep 1 zijn twee fylogenetische groepen te herkennen. Nederlandse 2014-sequenties in die twee groepen zijn op aminozuur-niveau niet van elkaar te onderscheiden (Tabel 1). In hoofdgroep 3 zijn twee fylogenetische groepen te herkennen, waarvan de Nederlandse 2014-sequenties ook op aminozuurniveau grote verschillen vertonen (Tabel 1). Het merendeel van de Nederlandse 2014-sequenties clustert echter in de groep met aminozuurprofiel 3.1. Slechts twee sequenties clusteren in de groep met aminozuurprofiel 3.2.1.



Figuur 2. Fylogenetische analyse van partiële VP1-genomische sequenties van EV-D68. Sequenties zijn gecodeerd met GenBankaccessionnummer, land van detectie en de laatste twee cijfers van het jaar van monsterverzameling. Getoonde sequenties zijn: uit Nederland (NL) van de huisartsenpeilstationssurveillance en de enterovirussurveillance historische sequenties sinds 1996 en van de 2014-uitbraak (groene dot), uit Amerika (US) historische sequenties en van de 2014-uitbraak (roze dot en roze letters), uit Turkije (TR) van 2014 en van de ‘outgroup’ stam ‘Fermon’. De getallen bij de knooppunten geven de robuustheid van de afsplitsing aan in een percentage na 1000 ‘bootstrapped’ herhalingen van de berekening van de topologie van de fylogenetische boom. De aminozuurprofielindicatie is voor Nederlandse sequenties uit 2014 (NL 2014 az profiel) (zie Tabel 1)

Zoals in Tabel 1 is aangegeven, bevinden de meeste aminozuursubstituties zich in de BC- en DE-loop van het VP1-eiwit. Deze loops zijn betrokken bij receptorbinding, en tegen deze loops zijn virusneutraliserende antistoffen gericht. Waarschijnlijk kan het virus ontsnappen aan de populatie-immuniteit door variatie in de loops en zo een nieuwe epidemie veroorzaken. Bij de 2010-uitbraak hebben we laten zien dat toenemende variatie inderdaad geassocieerd was met die uitbraak. Het tegelijkertijd circuleren van diverse fylogenetische lijnen, die ook nog eens variabel zijn in de BC- en DE-loops van VP1, suggereert dat er mogelijk weinig kruisbeschermende immuniteit is. Die variatie kan invloed hebben op de binding van EV-D68 aan receptoren om de cel te infecteren en op antivirale gevoeligheid. Hoe dit werkt, onderzoeken we in samenwerking met de afdeling virologie van de faculteit Diergeneeskunde van Universiteit Utrecht en het Rega Institute for Medical Research, Leuven, België.

Tabel 1. Profielen van aminozuursubstituties in het partiële VP1-eiwit, afgeleid van de partiële sequenties van de genomische VP1-regio van Nederlandse EV-D68 uit 2014, relatief ten opzichte van de ‘Fermon’-referentiestam van EV-D68. Aangegeven is welke aminozuurposities zich in de BC- en DE-loops bevinden. Δ geeft een deletie van een codon in de genomische VP1-regio aan. Na een ‘/’-teken is in kleinere lettergrootte een minder voorkomende aminozuurvariatie op die positie weergegeven. In paars benadrukt zijn de aminozuursubstituties die onderscheid maken tussen de profielen binnen één fylogenetische hoofdgroep (zie Figuur 2)

Aminozuur-profiel	Positie in VP1-eiwit en aminozuur-samenstelling																
	BC-loop										DE-loop						
	46	76	84	90	92	95	97	98	99	103	110	131	140	141	142	143	144
Fermon	T	G	K	N	A	S	G	T	H	F	K	I	N	G	N	N	D
1	T	S	R	D	T	A _v	Q	A	D	F	R	I	N	G _d	S	S	N
3,1	S	S	R	N	T	E	R	T _i	D	Y	K	V	Δ	G	S	N	N
3.2.1	S	S	R	N	T	E	Q	T	D	F	K	I	Δ	S	S	S	N

5.4 Dankbetuiging

We danken alle deelnemende huisartsen en hun patiënten en laboratoria in Nederland voor klinische monsters en virusisolaten. Zonder hun medewerking is deze surveillance niet mogelijk.

5.4.1 Publicaties en referenties

Meijer A, Benschop KS, Donker GA, van der Avoort HG. Continued seasonal circulation of enterovirus D68 in the Netherlands, 2011-2014. Euro Surveill. 2014 Oct 23;19(42). pii: 20935

6 Poliovirusexclusie en Enterovirussurveillance in 2014

Auteur: Edin Jusic

Betrokkenen: Kim Benschop, Bas van der Veer, Dani Atto, Ron Altena, Jeroen Cremer, Annemarie van de Brandt, Harry Vennema

Contactpersoon: Harrie van der Avoort (harrie.van.der.avooort@rivm.nl) en Erwin Duizer (erwin.duizer@rivm.nl).

Ondanks een hoge vaccinatiegraad onder de Nederlandse bevolking heeft Nederland een verhoogd risico voor verspreiding van poliovirus ten opzichte van andere landen in Europa. Dit komt door een lage vaccinatiegraad onder de gereformeerde bevolking die geconcentreerd is in de zogenaamde bijbelgordel, of “Bible Belt”. Om aanwezigheid en circulatie van poliovirus uit te sluiten worden in Nederland de klinische enterovirussurveillance en rioolwatersurveillance uitgevoerd (zie ook hoofdstuk 9 “Laboratoriumrespons na melding van lozing van virulent poliovirus in België”).

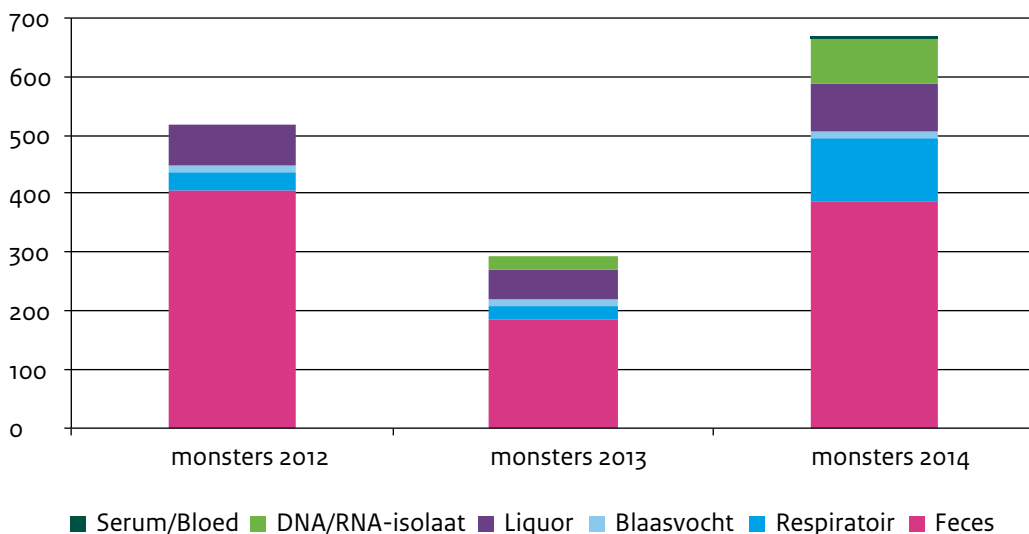
6.1 Klinische enterovirussurveillance

De klinische enterovirussurveillance (EV-surveillance) is een samenwerkingsverband tussen het Clb-IDS en de Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie (NWKV). Deze EV-surveillance wordt gebruikt om poliovirus uit te sluiten en daarnaast geeft typering inzicht in de circulatie van enterovirussen (EV) in Nederland. Poliovirus wordt uitgesloten door het virus te kweken op L20B-cellen (L-cellen van muizen, met humaanpoliovirusreceptor die specifiek is voor groei van poliovirus). EV-typering wordt gedaan via sequentieanalyse van een deel van het gen dat codeert voor het VP1/capside-eiwit.

Op basis van de gevonden sequentie en met behulp van het programma BioNumerics wordt in de EV-Genotyping Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool#/>) het EV-genotype bepaald. Voor de EV-surveillance rapporteert het Clb-IDS de bevindingen aan VIRO-TypeNed-Enterovirus (zie hoofdstuk 10 “VIRO-TypeNed 2013-2014; Enterovirus en humaanparechovirus-surveillance”).

In 2014 zijn er in Nederland 666 aanvragen binnengekomen voor de uitsluiting van poliovirus en/of typering van EV. Dat is een toename van 125,8% ten opzichte van 2013 (295 aanvragen) en van 28,3% ten opzichte van 2012 (519 aanvragen, Figuur 1). Het meest ingestuurde materiaal was feces met 58,3 % (388 aanvragen, Figuur 1). In 2014 zagen we ook een duidelijke toename in het aantal RNA/DNA-isolaten en respiratoire monsters. Dit laatste is veroorzaakt door aanvragen voor EV/68 (zie hoofdstuk 7 “Enterovirus D68/epidemie in 2014”).

Figuur 1. Naar het Clb-IDS ingestuurde monsters voor de klinische EV-surveillance 2012-2014



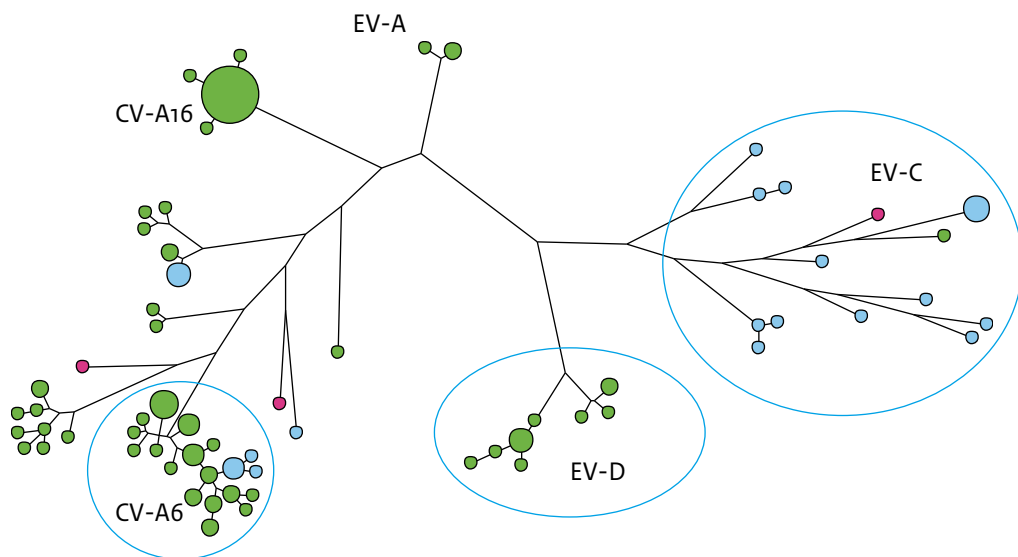
Van de 666 ingezonden monsters zijn er 515 (77.3 %) positief bevonden voor EV en daarvan zijn er 492 (95.5%) met succes getypeerd. De 23 niet-typeerbare monsters zijn naar de inzender gerapporteerd als NPEV (Non Polio Enterovirus). Bij deze monsters is poliovirus uitgesloten, doordat het ingezonden materiaal niet groeide op L2oB/cellen. Van de 151 door Clb-IDS EV-negatief bevonden monsters (22.7 %) bleken er 28 positief voor Rhinovirus en 15 voor Humaan Parechovirus (HPeV). De resterende 108 monsters zijn als negatief gerapporteerd aan de inzender. De typerings-PCR is minder gevoelig dan de detectie-PCR die in de perifere laboratoria wordt gebruikt. Deze detectie-PCR heeft de niet-coderende 5'-regio als target.

6.2 Rioolwatersurveillance

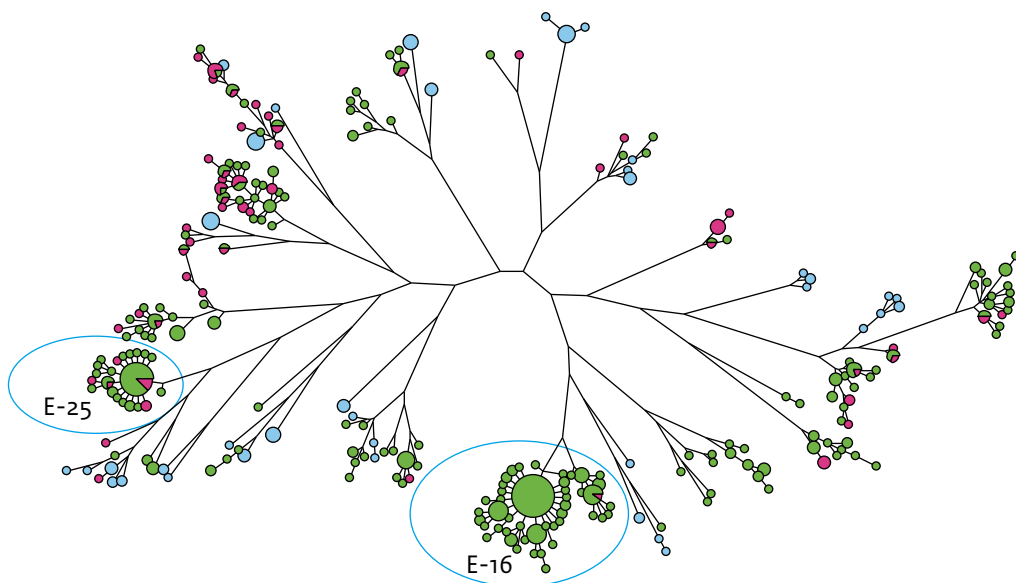
Naast de klinische EV-surveillance wordt in Nederland ook EV-surveillance in rioolwater uitgevoerd. Gedurende 2014 zijn in totaal honderd rioolmonsters verzameld in de bijbelgordel, op vijftien verschillende locaties. Daarnaast zijn op het terrein van het Centraal Orgaan Opvang Asielzoekers (COA) Ter Apel 145 rioolmonsters verzameld in verband met de verhoogde kans op import van poliovirus via Syrische vluchtelingen. Alle verkregen sequenties uit beide vormen van surveillance zijn weergegeven in Figuur 2.

Figuur 2. Maximum parsimony tree van de EV-A-, EV-C-, EV-D-sequenties (a) en EV-B-sequenties (b) gevonden in Nederland in 2014

Maximum parsimony tree van de EV-A, EV-C en EV-D-sequenties gevonden in 2014.



Maximum parsimony tree van de EV-B-sequenties gevonden in 2014.



- Klinische EV-surveillance
- Rioolwatersurveillance Bible belt
- Rioolwatersurveillance Ter Apel

Figuur 2 laat zien dat Humaan ECHOvirus-16 (enteric cytopathic human orphan) met 149 positieve monsters (30.3%) prevaleerde in 2014. ECHOvirus-16-stammen zijn vanuit het hele land ingestuurd door de klinische laboratoria. Opmerkelijk is dat ECHOvirus-16 maar één keer bij de rioolwatersurveillance is gevonden. Voor ECHOvirus-25 is dit anders. Van dit type zien we regelmatig stammen in beide vormen van surveillance. Deze Figuur laat verder de grote variatie in gevonden EV-B-stammen zien.

Tussen de stammen uit de klinische surveillance en de stammen uit het riool in de bijbelgordel vinden we 100% identieke stammen. We vinden geen 100% identiteit in het COA Ter Apel en de reguliere EV-surveillance of de rioolwatersurveillance in de bijbelgordel. In de rioolwater-surveillance van het COA Ter Apel zijn opmerkelijk veel EV-C-stammen gevonden. De verdeling in Figuur 2 toont aan dat met de rioolwatersurveillance in Ter Apel inderdaad de vluchtelingen worden bemonsterd. In 2014 zijn er in beide vormen van surveillance geen poliovirussen gevonden.

7 Laboratoriumrespons na melding van lozing van virulent poliovirus in België

Auteur: Erwin Duizer

Betrokkenen: Edin Jusic, Ron Altena, Dani Atto, Annemarie van den Brandt, Jeroen Cremer, Harrie van der Avoort (Clb-IDS, WHO Specialized Reference Laboratory for Polio), Saskia Rutjes, Froukje Lodder, Willemijn Lodder, Ana Maria de Roda Husman (Clb-Z&O), Jack Schijven (RIO), Helma Ruijs (Clb-LCI)

Contactpersoon: Erwin Duizer (erwin.duizer@rivm.nl)

Op 6 september 2014 meldden de Belgische autoriteiten dat op 2 september per vergissing 45 liter geconcentreerd virulent poliovirus was geloosd door de vaccinproductiefaciliteit van GSK in Rixensart. Het ging om een lozing naar het riool van in totaal 1013 niet-geïnactiveerde poliovirussen, type 3 van de Saukett-stam. Dit is de poliovirus 3-stam, die gebruikt wordt voor de productie van het geïnactiveerde poliovaccin. Het riool van deze GSK-fabriek loost op de rioolwaterzuivering in Rosières. Deze rioolwaterzuivering loost vervolgens op het riviertje de Laan, dat uitmondt in de Dijle. De Dijle stroomt door Leuven en Mechelen en mondt uiteindelijk uit in de Schelde, gevolgd door de Westerschelde.

In een poliovrij Europa is een lozing van wildtype poliovirus van deze omvang een reële bedreiging. Contact met of consumptie van besmet water of voedsel kan leiden tot infectie. Vervolgens kan stille circulatie ontstaan onder niet- of IPV-gevaccineerde personen in Nederland en België (net als de stille circulatie van wild poliovirus in Israël 2013/14). Het kan zelfs leiden tot gevallen van polio onder de om religieuze redenen niet-gevaccineerde populatie, bijvoorbeeld in sommige Zeeuwse dorpen. Het oesterseizoen startte bovendien bijna, namelijk in de eerste week van oktober. Daarom is besloten om in relevante omgevingsmonsters de actuele concentratie van poliovirussen te bepalen. België heeft geen laboratorium dat WHO-geaccrediteerd is voor analyse van omgevingsmonsters voor poliovirus. Daarom zijn deze analyses uitgevoerd door het RIVM, Clb-IDS, afdeling Respiratoire en Enterale Virussen.

Dit laboratorium is een 'WHO Specialized Reference Laboratory for Polio'. De omgevingsmonsters zijn verzameld tussen 2 en 18 september door personeel van GSK en de KU Leuven. De beschikbare monsters waren

- Influent en effluent van de rioolwaterzuiveringsinstallatie (RWZI) te Rosières, waarop geloosd is;
- Sediment uit de bezinkingsbak van deze RWZI;
- Slibmonsters uit riviertje de Laan.

In geen van deze monsters is poliovirus aangetoond. Uit berekeningen bleek dat de geloosde viruspartikels vanaf 20 september de Westerschelde konden bereiken. Omdat schelpdieren zich voeden door water te filteren, kunnen ze aanwezige verontreinigingen, zoals poliovirussen, concentreren in hun maag-darmkanaal. Op 24 september en 3 en 28 oktober zijn mosselen verzameld in het oostelijke deel van de Westerschelde. De maag-darmkanalen van deze mosselen zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van poliovirus. Ook in deze monsters is geen poliovirus aangetoond.

In gemeenten met lage vaccinatiegraad (Bible Belt) is gecontroleerd of er introductie en stille circulatie zijn geweest. In Krabbendijke (gemeente Reimerswaal) en Stavenisse (gemeente Tholen) zijn tussen 30 september en 7 november rioolwatermonsters verzameld. Ook in deze monsters is geen poliovirus aangetoond. In de onderzoeksperiode zijn ook geen klinische verdenkingen van poliovirusbesmetting gemeld.

7.1 Conclusie

Er is geen infectieus poliovirus en geen poliovirus-RNA aangetoond in de beschikbare monsters. We concluderen dat de gemelde lozing van 1013 infectieuze poliovirussen niet heeft geleid tot aantoonbare besmetting van deze monsters en dat er geen (stille) circulatie van poliovirus in de onderzochte gemeenschappen heeft plaatsgevonden.

7.1.1 Publicaties en referenties

RIVM report: Laboratory analysis of environmental samples taken following the reported release of live poliovirus

8 VIRO-TypeNed 2013-2014; Enterovirus- en humaanparechovirussurveillance

Auteur: Kim Benschop

Betrokkenen: Harry Vennema, Annelies Kroneman, Erwin Duizer, Harrie van der Avoort, Edin Jusic, Kim Benschop

Contactpersoon: Kim Benschop (kim.benschop@rivm.nl)

TypeNed is een initiatief van een aantal Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's) en het Clb-IDS. Het is een systeem om in één gezamenlijke database de decentrale moleculaire typeringsdata en basale beschikbare epidemiologische en klinische informatie te verzamelen. Met de gegevens van verschillende laboratoria is het mogelijk om zowel vraagstellingen op ziekenhuis- of patiëntniveau als op (inter)nationaal niveau te beantwoorden.

VIRO-TypeNed bestaat uit zes MML's: Academisch Medisch Centrum (AMC), Erasmus Medisch Centrum (EMC), Universitair Medisch centrum Groningen (UMCG), Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC), Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU), GGD Amsterdam, Elisabeth Ziekenhuis Tilburg en het RIVM. De enterovirus (EV)/parechovirus (PEV) database is ingericht ten behoeve van de nationale poliosurveillance (zie ook hoofdstuk 8 "Poliovirusexclusie en Enterovirussurveillance in 2014" en hoofdstuk 9 "Laboratoriumrespons na melding van lozing van virulent poliovirus in België").

In 2013 en 2014 zijn in totaal 390 EV- en 490 PEV-typeringen gerapporteerd (tot november 2014) (Tabel 1). Net als voorgaande jaren worden virussen van de groep EV-B het meest frequent gerapporteerd, gevolgd door EV-A-virussen (Tabel 1). Het aantal virussen van de EV-D-groep steeg in 2014 (Tabel 1). Deze stijging is gerelateerd aan de wereldwijde piek in EV-D68-detectie (zie ook hoofdstuk 7 "Enterovirus D68-epidemie in 2014"). Het aantal EV-D-virussen was in 2010 hoog en ook toen was er sprake van een uitbraak. Verder onderzoek naar EV-D68 in Europa loopt. Het aantal gerapporteerde PEV-infecties was in 2014 zeer laag (n=26). PEV1-infecties zijn tot nu toe elk jaar gerapporteerd als de dominante PEV-infectie. In de even jaren 2010 en 2012 werd het aantal PEV1-infecties op de tweede plaats gevolgd door het aantal PEV3-infecties. Interessant is dat dit patroon niet doorzet in 2014. PEV5-infecties staan nu op de tweede plaats.

Tabel 1. 2010-2014 entries in VIRO-Typed

	2010	2011	2012*	2013	2014#
EV-A	86	73	67	97	102
EV-B	193	271	170	228	324
EV-C	3	2	3	11	6
EV-D	26	1	4	1	30
PEV	88	66	64	46	26
Rhinovirus	1	4	1	7	1
Totaal	397	417	309	390	490

* Data 2012 zijn geüpdatet sinds Clb-IDS-rapportage 2013.

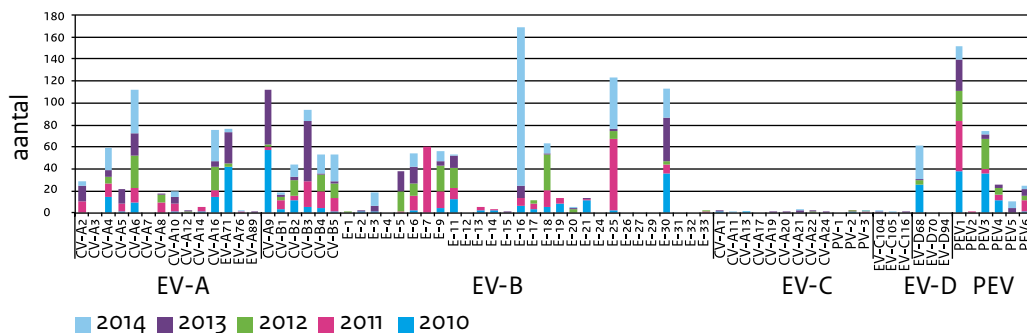
Data zijn geanalyseerd tot november 2014

Ieder jaar lijken er andere EV-types het meest frequent voor te komen (Tabel 2, Figuur 1) opmerkelijk is dat in 2010 en 2013 drie van de top vijf van EV-types gelijk zijn. ECHO16 kwam in 2014 het meest voor. De prevalentie hiervan (29.4% van de getypeerde monsters) is extreem hoog (Figuur 1). Verder onderzoek naar ECHO16 loopt.

Tabel 2. Top vijf van meest voorkomende EV-types 2010-2014

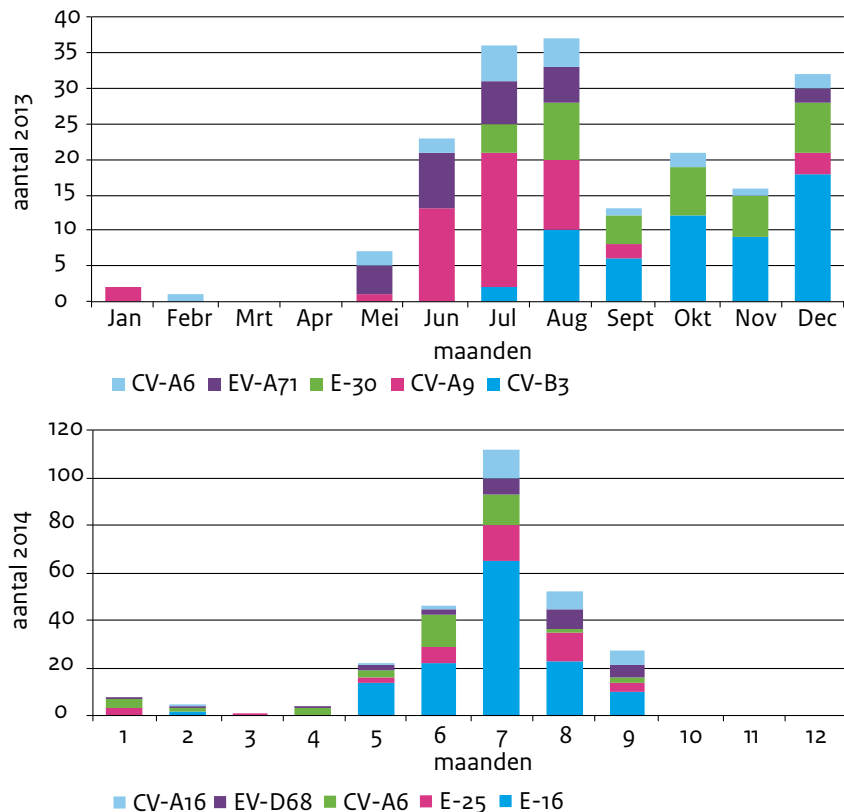
	2010	2011	2012	2013	2014
1	CV-A9	ECHO25	ECHO18	CV-A9	ECHO16
2	EV-A71, C2	ECHO7	CV-A6	CV-B3	ECHO25
3	ECHO30	CV-B3	ECHO9	ECHO30	CV-A6
4	EV-D68	CV-B4	CV-A16	EV-A71, C2	EV-D68
5	CV-A4	ECHO9	ECHO5	CV-A6	ECHO30

Figuur 1. Aantal types EV- en PEV-infecties 2010-2014



Van de meest voorkomende types is een seizoenanalyse uitgevoerd. In de maanden voorafgaand aan piekdetecties van deze types zien we al een langzame stijging (Figuur 2). Dit geeft aan dat EV-piekdetecties mogelijk voorspelbaar zijn.

Figuur 2. Maandelijkse prevalentie van de top vijf van EV-infecties 2013-2014



VIRO-TypeNed maakt surveillance naar specifieke types mogelijk. Dit is vooral van belang bij typespecifieke uitbraken met eventueel ernstige pathogeniciteit (zoals EV-D68). Ook hierop is het mogelijk te anticiperen met seizoenanalyses. Hiervoor moeten de data prospectief gerapporteerd en geanalyseerd worden.

Laboratoria die belangstelling hebben voor deelname aan TypeNed enterovirus/parechovirus of norovirus kunnen contact opnemen via noronet@rivm.nl

8.1.1 Publicaties en referenties

Rahamat-Langendoen JC, Benschop KSM, van der Avoort H., Claas EC, Kroneman A, Wolthers KC, *et.al.* on behalf VIRO-TypeNed. "VIRO-TypeNed: advanced molecular surveillance of enteroviruses in the Netherlands." Submitted to *eurosurveillance*

Koopmans M, Niesters HG, Benschop K, Wolthers K, Schuurman R, Pas SD, *et.al.* 2013. Authors reply: "Application of bayesian methods to the inference of phylogeny for enterovirus surveillance." *Euro Surveill.* 18(9)

Niesters H, Rossen J, van der Avoort H, Baas D, Benschop K, Claas E, *et.al.* "Laboratory-based surveillance in the molecular era: the TypeNed model, a joint data-sharing platform for clinical and public health laboratories." *Euro Surveill.* 18(4)

9 Surveillance gastro-enteritisvirus

Auteur: Annemarie van den Brandt

Betrokkenen: Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Bas van der Veer, Jeroen Cremer, Janko van Beek, Wilfrid van Pelt (EPI)

Contactpersoon: Harry Vennema (harry.vennema@rivm.nl)

Sinds enkele jaren verricht Clb-IDS de referentiediagnostiek voor de zeldzamere pathogenen. Hiervoor wordt een multiplex PCR gebruikt voor norovirus (NoV, inclusief zeldzame types), sapovirus, adenovirus (met daarbij een PCR specifiek voor type Adenovirus 41) en astrovirus (gastro-enteritisvirus (GEV)-studie). De routinediagnostiek van virale gastro-enteritis wordt tegenwoordig vooral verricht door MML's. Zij testen in ieder geval voor norovirus (NoV) en rotavirus. Een aantal MML's melden in de Virologische Weekstaten naast norovirus en rotavirus ook astrovirus, adenovirus 40/41 en sapovirus.

9.1 Uitgelicht: Norovirus

Noroviruspositieve monsters kunnen MML's insturen naar het Clb-IDS voor norovirustypering. Dit is bedoeld voor bronopsporings- en transmissie-onderzoek. Daarnaast krijgen we hiermee vroegtijdig inzicht in bijvoorbeeld de opkomst van nieuwe epidemische NoV GII.4-stammen (NoroV-studie). De uitbraaksurveillance voor norovirus is gestopt. De huidige surveillance is gebaseerd op individueel ingestuurde monsters voor zowel gastro-enteritisvirusdetectie (GEV-studie) als typering van norovirussen (NoroV-studie). Norovirussequenties worden internationaal gedeeld via NoroNet.nl.

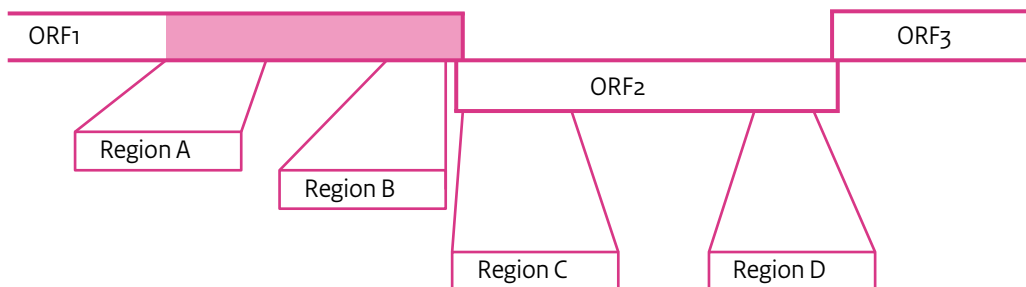
Tabel 1. Overzicht van aantal (%) gedetecteerde enterale virussen in 2014
(abs= gevonden aantal; % is percentage van het aantal positief geteste monsters)

TESTNAAM	PROJECT			
	GEV (n=74)		NoroV (n=523)	
	abs	%	abs	%
Norovirus Genotype I	1	1,4	36	6,9
Norovirus Genotype II	6	8,1	405	77,4
Rotavirus	2	2,7	niet getest	
Sapovirus	3	4,1	niet getest	
Adenovirus	3	4,1	niet getest	
Astrovirus	7	9,5	niet getest	
virus	22	29,7	441	84,3
Geen virus	52	70,3	82	15,7

Het aantal ingestuurde monsters voor de GEV-studie is de laatste jaren sterk teruggelopen (365 in 2011, 74 in 2014). Waarschijnlijk komt dit, doordat vrijwel alle MML's zelf de meest prevalentie verwekkers testen (norovirus en rotavirus). De noroviruspositieve monsters in de GEV-studie blijken na typering dan ook vaak minder voorkomende of genetisch afwijkende types te zijn (bijvoorbeeld NoV GI.5 en NoV GI.7).

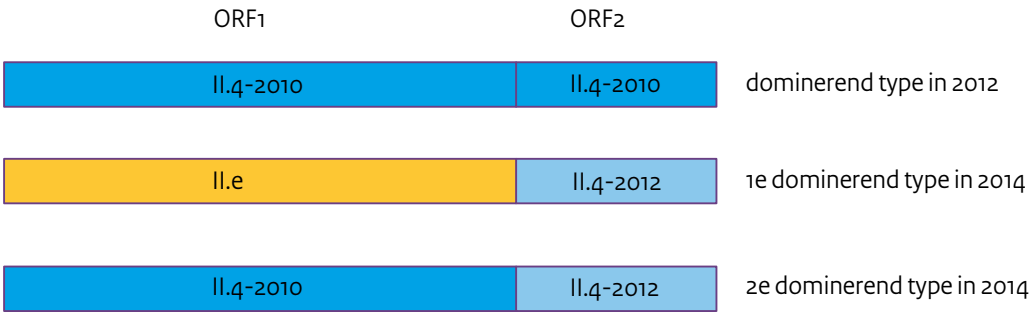
In 2013 werkte Clb-IDS aan een nieuwe opzet voor de norovirustyperings-PCR. Deze beslaat nu een groter deel van het norovirus. Voorheen werd alleen regio A geamplificeerd, maar nu wordt regio A t/m C (zie Figuur 1, ingekleurd deel) geamplificeerd. Hiervoor gebruiken we een nested PCR, met primers die zijn ontworpen volgens het CODEHOP-principe. Het risico is daardoor veel kleiner dat specifieke types met sequentieveranderingen in de primer-bindingsplaatsen worden gemist. Het 1000 bp lange fragment wordt vervolgens gesequencet en het type wordt bepaald met behulp van de online Norovirus Typing Tool (<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>). Met deze methode was het in 2014 mogelijk om 84,3% van de NoroV-studie monsters te typeren (ten opzichte van 76% in 2013). Het protocol is in 2014 verder geoptimaliseerd, waardoor het aantal niet-typeerbare NoV GI.4-virussen afnam (Figuur 3).

Figuur 1. Deel van het genoom van NoV, met drie open reading frames en de meest gebruikte PCR-targets

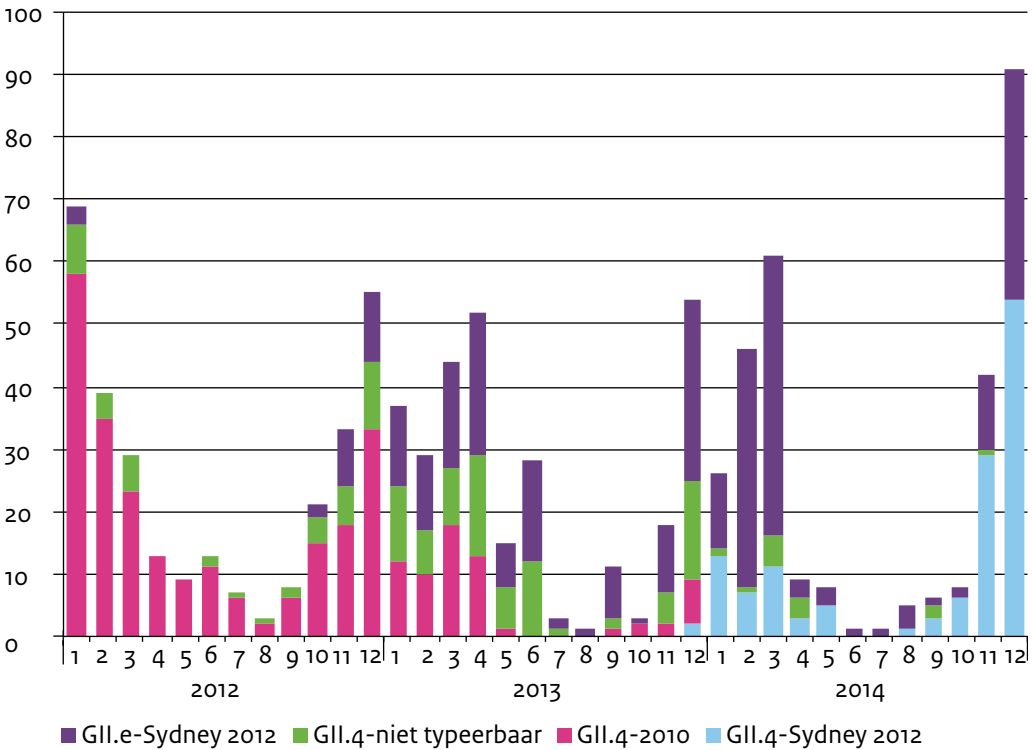


Gecombineerde analyse van ORF1 en ORF2 leverde 133 monsters op met het ORF1-type GI.4, gecombineerd met ORF2-type GI.4-Sydney2012 (schematische weergave in Figuur 2, paars in figuur 3). In 119 monsters bleek dat het ORF1-type GI.4-2010 gecombineerd is met de ORF2-sequentie van type GI.4-Sydney2012 (schematische weergave in Figuur 2, blauw in Figuur 3). Deze twee types domineerden in 2014. Het type GI.4-2010 (schematische weergave in Figuur 2, rood in Figuur 3) dat in 2012 nog domineerde, is in 2014 geheel verdwenen.

Figuur 2. De dominerende NoV-types van 2012 en 2014, met hun sequentie in het ORF1- en ORF2-deel van het norovirusgenoom



Figuur 3. Staafdiagram met het aantal ingestuurde monsters per maand en de verdeling hiervan in Norovirus type GII.e-Sydney 2012, de twee voornaamste varianten van GII.4 en de niet typeerbare GII.4



De noroviruslast was vrij laag in de winterseizoenen 2012/13 en 2013/14. De seizoenen werden respectievelijk gedomineerd door de NoV GII.4-2010 en de NoV GII.e-Sydney 2012-variant. De in 2013/2014 opkomende nieuwe NoV GII.4-Sydney 2012 variant lijkt het winterseizoen van 2014/15 te gaan domineren. De noroviruslast is dit seizoen ook hoger. De sequentie van dit type geeft geen aanwijzingen voor problemen met de detectie en typering met de huidige moleculaire technieken.

9.1.1 Publicaties en referenties

Teunis PF, Sukhrie FH, Vennema H, Bogerman J, Beersma MF, Koopmans MP. Shedding of norovirus in symptomatic and asymptomatic infections. *Epidemiol Infect.* 2014 Oct 22:1-8. PMID: 25336060

Enserink R, Scholts R, Bruijning-Verhagen P, Duizer E, Vennema H, de Boer R, Kortbeek T, Roelfsema J, Smit H, Kooistra-Smid M, van Pelt W. High detection rates of enteropathogens in asymptomatic children attending day care. *PLoS One.* 2014 Feb 24;9(2):e89496

10 Genotypering rotavirus

Auteur: Bas van der Veer

Betrokkenen: Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Annemarie van den Brandt, Jeroen Cremer, Sharon van den Brink, Naomi van Marm en Wilfrid van Pelt (EPI)

Contactpersoon: Harry Vennema (harry.vennema@rivm.nl)

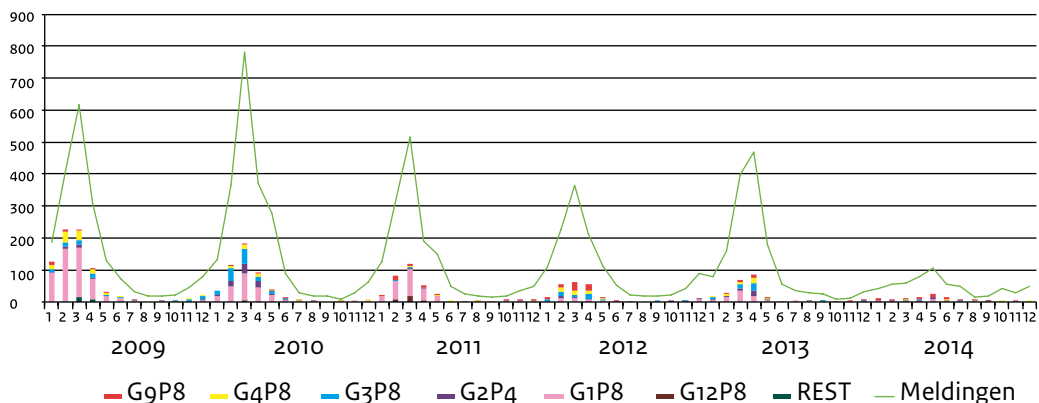
Het Nederlandse kiemsurveillanceproject voor rotavirus is opgestart in juni 2008. Binnen dit project kunnen ziekenhuizen en andere (medisch) microbiologische laboratoria rotaviruspositieve fecesmonsters opsturen naar het RIVM voor typering. De rotavirussen worden getypeerd met behulp van sequencing van een VP7 (G-type)- en een VP4 (P-type)-fragment. De resultaten uit deze studie worden gecombineerd met data van zeventien andere landen tot de Europese rotavirussurveillance (EuroRotanet). Deze data worden onder andere gebruikt om de *vaccine coverage* van de gebruikte vaccins te monitoren. Als de inzender dat wil, kan hij de typeringsuitslag ontvangen. Hieraan zijn voor de inzender geen kosten verbonden.

10.1 Minder meldingen

In 2014 zijn er volgens de Virologische Weekstaten slechts 607 rotavirusmeldingen binnen gekomen. Het jaar daarvoor waren dit 1487 meldingen. Toch blijft het aantal ingezonden fecesmonsters (137 in 2014, 299 in 2013) afgezet tegen het aantal meldingen relatief gelijk aan de laatste jaren (Figuur 1, Tabel 1). Van het aantal ingezonden fecesmonsters zijn er 130 (95%) getypeerd voor G en/of P. In de eerste drie jaren van de studie was G1P[8] het dominante genotype. Vanaf 2012 co-circuleerden verschillende genotypes en in 2014 bleek G9P[8] het dominante genotype (Figuur 2).

Deze vermindering van het aantal gevallen van Rotavirus gastro-enteritis (RVGE) en het aantal G1P[8]-infecties dat daarbinnen valt, is vorig jaar al gezien. Dit suggereerde toen al de mogelijke relatie met de vaccindruk vanuit de omringende landen. Het lijkt erop dat deze trend zich voortzet in 2014. Het aantal RVGE-gevallen is zelfs meer dan gehalveerd (Tabel 1) (Hahné *et.al.* 2014). Over het jaar bekeken lijkt de februari-maart-piek van het aantal RVGE-gevallen in 2014 geheel verdwenen. Vanaf mei tot december lijkt het patroon overeen te komen met voorgaande jaren. Vanuit Europa komen meerdere signalen binnen van eenzelfde extreme afname van het aantal RVGE-gevallen.

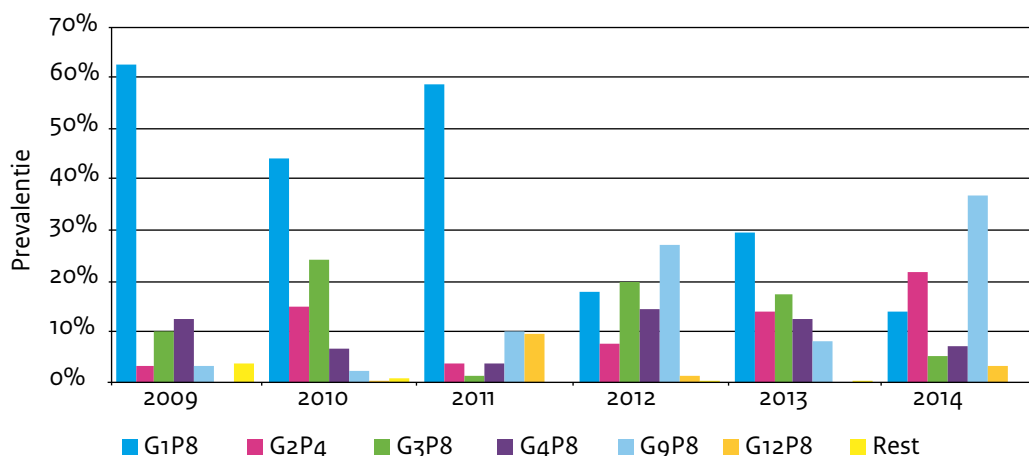
Figuur 1. Getypeerde en gemelde rotavirusmonsters naar afnamedatum voor de periode 2009-2014



Tabel 1. Aantal gemelde, ingestuurde en getypeerde rotavirussen voor de periode 2009-2014. Daarbij het aantal G1P[8]-infecties gevonden binnen alle getypeerde samples

RV	A	B		C		G1P[8] infecties	
	Aantal gemeld	Aantal Ingestuurd abs.	% t.o.v. A	Aantal Getypeerd abs.	% t.o.v. B	abs.	% t.o.v. C
2009	1935	869	44.9	830	95.5	519	62.5
2010	2180	578	26.5	547	94.6	242	44.2
2011	1504	414	27.5	400	96.6	235	58.8
2012	1287	276	21.4	265	96	47	17.7
2013	1487	299	20.1	280	93.6	83	29.6
2014	607	137	22.6	130	94.9	18	13.8

Figuur 2. Genotypeprevalentie per jaar in periode 2009-2014



10.2 Betrouwbare weergave

Om voor Nederland een betrouwbare weergave van de typespecifieke prevalenties te krijgen, moeten naar schatting vierhonderd monsters getypeerd worden. Om dit aantal te halen vragen wij om ook voor 2015 rotaviruspositieve monsters in te sturen. Omdat het geen diagnostiek is maar surveillance, is het mogelijk om de monsters op te sparen (bij -20°C of +4°C) en per batch in te sturen.

10.2.1 Publicaties en referenties

Hahné S, Hooiveld M, Vennema H, van Ginkel A, de Melker H, Wallinga J, *et.al.* “Exceptionally low rotavirus incidence in the Netherlands in 2013/14 in the absence of rotavirus vaccination.” *Euro Surveill.* 2014 Oct 30;19(43)

Enserink R, Scholts R, Bruijning-Verhagen P, Duizer E, Vennema H, de Boer R, *et.al.* “High detection rates of enteropathogens in asymptomatic children attending day care”. *PLoS One.* 2014 Feb 24;9(2):e89496

11 Antivirale middelen tegen enterovirussen: de impact van antivirale resistentie voor volksgezondheid

Auteur: Kim Benschop

Betrokkenen: Marion Koopmans, Marieke Hogerwerf, Harrie van der Avoort, Erwin Duizer

Contactpersoon: Kim Benschop (kim.benschop@rivm.nl)

De ontwikkeling van antivirale middelen tegen enterovirussen (EV's) en humaan rhinovirussen (HRV's) gaat vrij snel. Pleconaril was het eerste EV-middel dat klinisch geëvalueerd werd (fase III) voor de behandeling van HRV-infecties en ernstige EV-infecties bij kinderen en patiënten met een verminderde weerstand. Het middel wordt nu opnieuw geëvalueerd, maar nu voor de behandeling van neonatale sepsis en HRV-geïnduceerde complicaties bij patiënten met astma of COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease). Enkele andere EV-middelen in ontwikkeling zijn BTA-798, AG7404 en V-073 voor behandeling in verschillende doelgroepen. Het Clb-IDS is betrokken bij de klinische evaluatie van V-073 voor polioviruseradicatie.

Bij de ontwikkeling en het gebruik van deze middelen tegen deze RNA-virussen moeten we er rekening mee houden dat antivirale resistentie onontkoombaar is. Mogelijk komen resistente virussen in het milieu terecht en kunnen zij via deze weg de populatie van onbehandelde patiënten die een hoog risico lopen, besmetten. Zeker bij grootschalig of ongecontroleerd gebruik (off-label of over-the-counter) zal dit een rol spelen. Deze patiëntenpopulatie is dan niet te behandelen met de middelen die op dat moment beschikbaar zijn. In de antimicrobiële wereld is dit scenario maar al te bekend.

Een aantal publicaties suggereert dat enkele middelen die al op de markt zijn ook de replicatie (vermeerdering) van EV kunnen remmen. Dit zijn bijvoorbeeld fluoxetine/prozac (depressie), amantadine (Parkinson en voorheen influenza A-infecties) en ribavirine (RBV) (chronische HCV-infecties). Deze middelen worden voornamelijk bij volwassen patiënten gebruikt voor hun oorspronkelijke indicatie. Dat wil nog niet zeggen dat deze volwassenen geen EV-infectie (asymptotisch) doormaken. Doordat patiënten die deze middelen gebruiken asymptomatische infecties kunnen doormaken, bestaat de mogelijkheid dat er een selectie en circulatie van EV-resistente virussen is ontstaan. Deze middelen hebben dezelfde targets als enkele EV-middelen in ontwikkeling, en er kan dus kruisresistentie ontstaan. Dit kan negatieve gevolgen hebben voor de effectiviteit van de nieuwe EV-middelen. Het is daarom belangrijk om te bepalen of door deze middelen al resistentie is ontstaan en zo ja, hoever deze resistentie al is gevorderd.

Het Clb-IDS heeft een assay voor fenotypische resistentie ontwikkeld. Hiermee testen wij de non-EV-middelen ribavirine, fluoxetine en amantadine, gericht tegen enterovirus B-stammen uit verschillende jaren (Figuur 1). De assay is gebaseerd op de 50% remmende dosis (IC₅₀). De virussen zijn op HT-29-cellen getest met verschillende concentraties van de betreffende middelen, tot aan de concentratie die toxisch is voor de cellen (CC₅₀). Uitzondering hierop is ribavirine, dat niet hoger is getest dan 1000 µM. De toxische concentraties zijn: fluoxetine >60 µM, amantadine >250 µM, en ribavirine >10.000 µM.

11.1 Fluoxetine

Figuur 1 laat zien dat fluoxetine de replicatie van alle stammen remt met een gemiddelde IC₅₀ van 15.61 µM (range 10.76-31.89 µM). Dit is hoger dan in andere studies is beschreven. Mogelijk is het verschil te verklaren door het gebruik van andere cellijnen, aangezien de IC₅₀ per cellijn kan verschillen. Tot nu toe zien we bij klinische isolaten geen resistentie-ontwikkeling tegen dit middel, maar er zijn meer data nodig om dit te bevestigen.

11.2 Amantadine

Bij geen van de stammen is de replicatie geremd door amantadine (concentratie van <250 µM). De remmende werking van amantadine is aangetoond op drie ECHO5-stammen (IC₅₀ <10 µM) en drie ECHO18-stammen (IC₅₀ <40 µM). In deze studie is maar één ECHO18-stam getest en hierop is geen remming gevonden (IC₅₀ >250 µM). Om de remmende werking van amantadine te bevestigen moeten we nog meer ECHO18-stammen testen.

11.3 Ribavirine

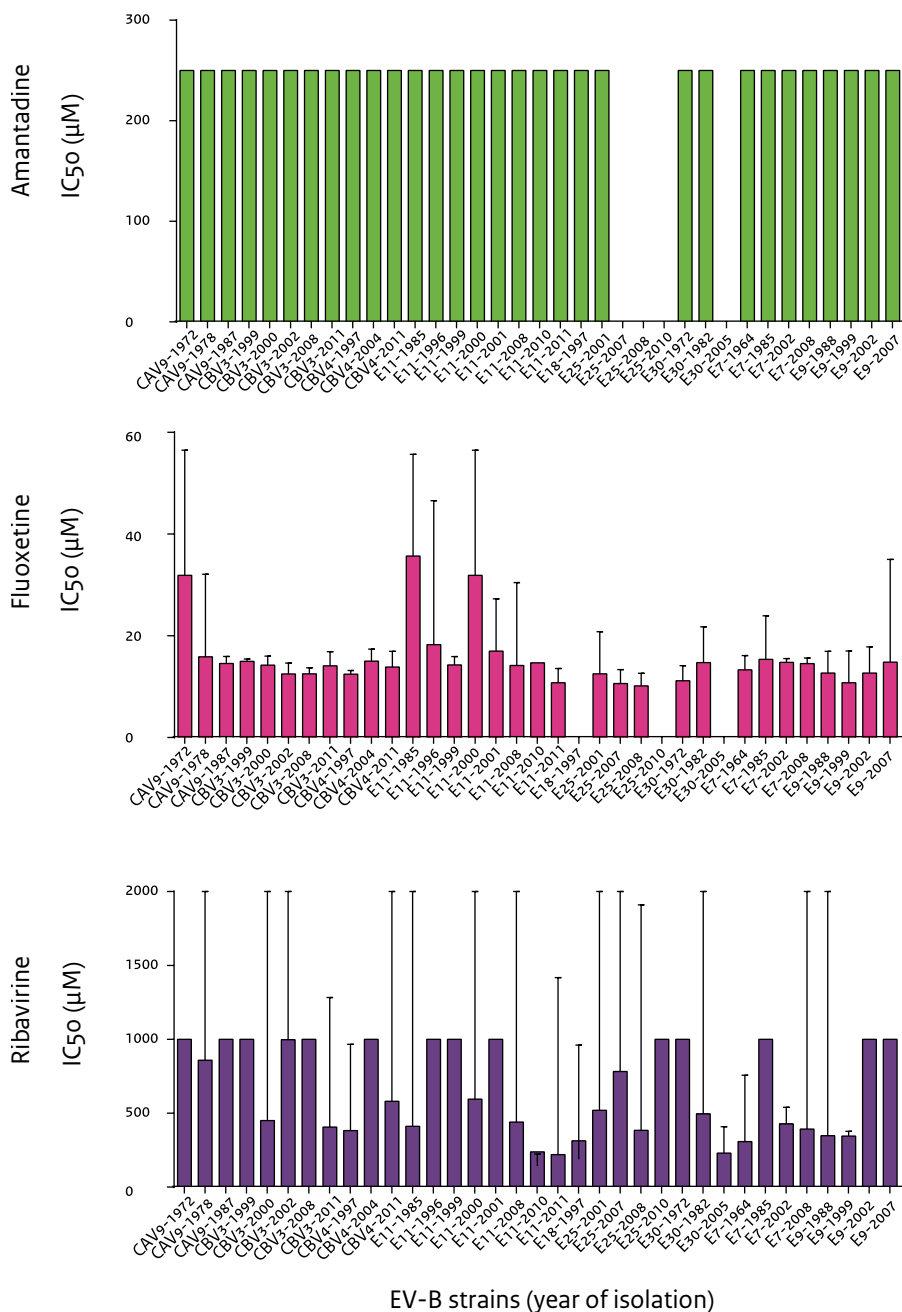
Bij ribavirine zagen we sterke remming van de replicatie van enkele stammen met een gemiddelde IC₅₀ van 322.53 µM (range 143-595 µM). Poliovirus (<400 µM) en EV71 (800 µM) liggen in dezelfde range. Voor de andere stammen zagen we geen inhibitie in de geteste concentratie-range van het middel. Ribavirine is pas cytotoxisch bij een concentratie >10.000 µM. Om resistentie dan wel verminderde susceptibiliteit te bepalen kunnen we nog hogere concentraties testen.

Deze studie op klinische isolaten toont aan dat het mogelijk is om fluoxetine en ribavirine in te zetten als antiviraal middel bij ernstige EV-infecties. Eerst moeten echter de gevolgen op de ontwikkeling van resistentie duidelijk zijn. Hiervoor zijn meer studies nodig naar hoe snel en hoe vaak resistentie zich ontwikkelt bij in-vitro-replicatie onder invloed van het middel. Daarnaast moeten we grote surveillance-screenings gaan uitvoeren, waarbij we zowel klinische isolaten als isolaten uit de environmental surveillance meenemen.

11.3.1 Publicaties en referenties

Benschop KSM, van der Avoort H, Duizer E, Koopmans K. "Antivirals against enteroviruses: a critical review from a public health perspective, based on lessons learned from the antimicrobial world." Antiviral therapy 2015

Figuur 1. Antivirale susceptibiliteit (IC₅₀, µM) van EV-B-virussen tegen fluoxetine, amantadine en ribavirine. Stammen met geen IC₅₀-waarden zijn niet getest tegen desbetreffende antiviraal



12 Kweek van influenzavirussen, een uitdaging

Auteur: Adam Meijer

Betrokkenen: Ton Marzec, Gabriel Goderski, Mariam Bagheri, Pieter Overduin, Sharon van den Brink, Hans Krul, Gé Donker (NIVEL), Marit de Lange (RIVM/EPI), Anne Teirlinck (RIVM/EPI), Wim van der Hoek (RIVM/EPI)

Contactpersoon: Adam Meijer (adam.meijer@rivm.nl)

12.1 Inbedding

Het Clb-IDS vormt samen met Viroscience in het Erasmus MC het Nationaal Influenza Centrum. Dit centrum is door de Wereld Gezondheids Organisatie (WHO) erkend en ingebed in het WHO 'Global Influenza Surveillance and Response System'. In dit kader vindt de kweek van influenzavirussen plaats. In de huisartsenpeilstations surveillance worden klinische monsters afgenomen van patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld of een andere acute respiratoire infectie. Deze worden met RT-PCR op onder andere influenzavirus getest. Het doel van de kweek is om uit influenzaviruspositieve monsters een representatief aantal virus-isolaten te verkrijgen voor verdere karakterisering. Deze bestaat uit antigene en moleculaire karakterisering en is vooral bedoeld om de gelijkenis met de huidige vaccinvirussen te bepalen. Daarnaast zijn virusisolaten noodzakelijk om de fenotypische gevoeligheid voor antivirale middelen te bepalen. De resultaten van de karakterisering worden gebruikt om duiding te geven aan de resultaten van vaccineffectiviteitsstudies door Clb-IDS en Clb-EPI. Ook gebruiken we de resultaten om relevante virussen te selecteren voor doorsturen naar het WHO-referentielaboratorium in Londen. Daar worden virussen uit de hele wereld verder gekarakteriseerd. Op basis daarvan geven zij samen met andere WHO-referentielaboratoria aanbevelingen voor de samenstelling van het influenzavaccin voor het komende seizoen.

12.2 Alternatieve cellen voor tertiaire apenniercellen

Tertiaire apenniercellen werden gebruikt voor de kweek van influenzavirus. Enkel voor het verkrijgen van deze cellen voor celkweek mogen apen niet meer geëuthanaseerd worden. Daarom is naar een alternatief voor deze cellen gezocht. De WHO beveelt Madin Darby Canine Kidney (MDCK)-cellen aan, vooral MDCK-NBL2. Er is echter een groot aantal types MDCK-cellen (Dukes *et.al.*, BMC Cell Biol. 2011;12:43), terwijl MDCK op zich al een mix is van verschillende soorten hondenniercellen. Bovendien is er een MDCK-lijn aangepast voor verhoogde expressie van de receptor voor humane influenzavirussen (alpha 2.6 sialic acid), de MDCK-SIAT-cel. In het seizoen 2013/2014 zijn MDCK-NBL2, MDCK-I en MDCK-SIAT getest en is de kweekprocedure van influenzavirus op een aantal andere punten geoptimaliseerd.

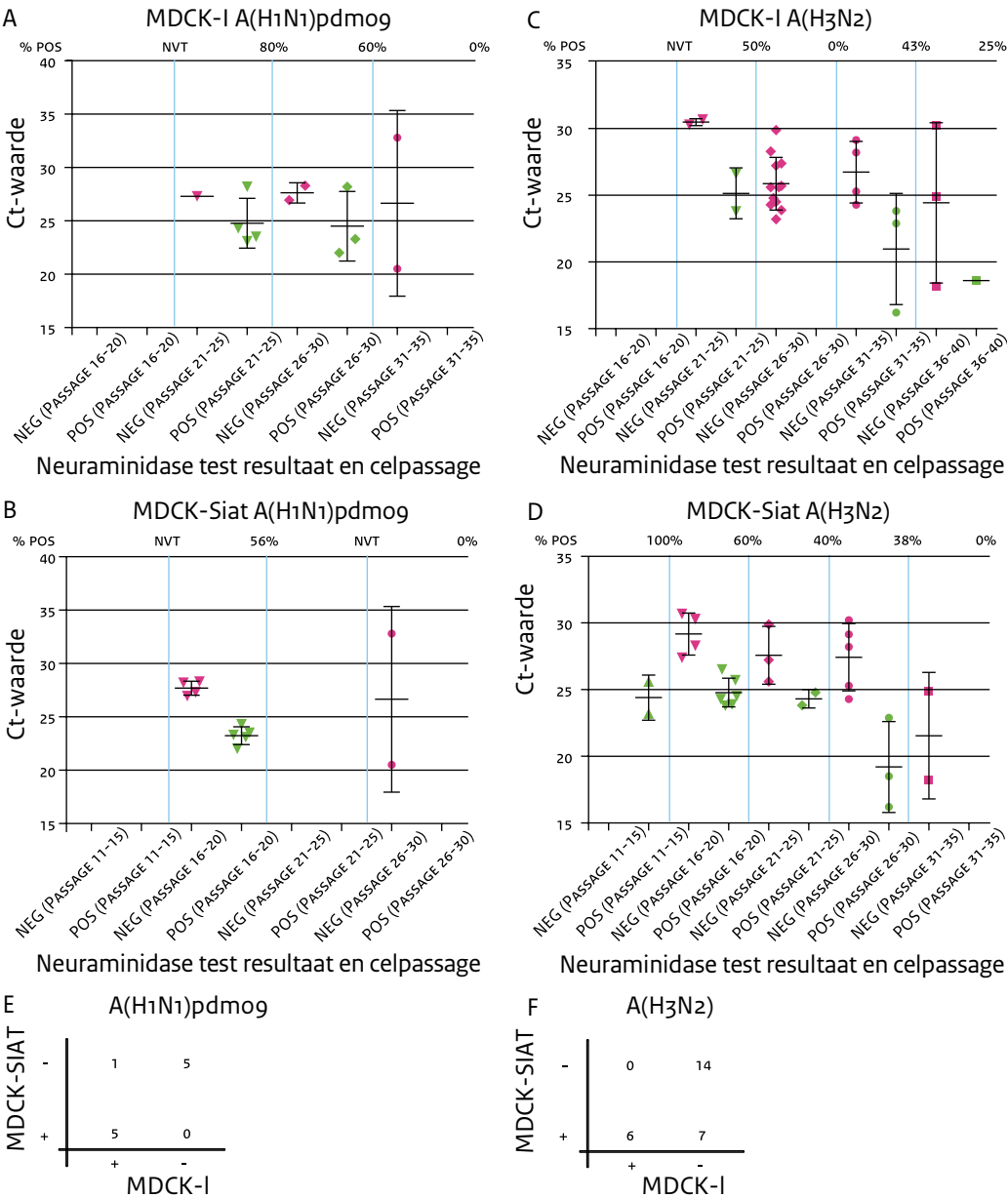
12.3 Optimale omstandigheden voor succes

Influenzavirus wordt geïsoleerd uit klinische monsters op een cel-monolaag, gegroeid in buizen. Om nakomelingen van de geënte influenzavirussen infectieus te maken moet dit in serumvrij medium gebeuren, in de aanwezigheid van trypsine. Het is gelukt om een virusisolaat te verkrijgen als het virus doorgezet kan worden in een volgende passage. Daarbij moet het virus een cytopathologisch effect (CPE) veroorzaken en/of een meetbare, kritische hoeveelheid neuraminidase-activiteit leveren in het kweeksupernatant. Voordat klinische luchtwegmonsters op cellen geënt worden, moeten ze bewerkt worden om bacteriën en schimmels zo veel mogelijk te verwijderen. Dat kan met filtratie en centrifugeren. Filtratie met een 0.2 µm-filter blijkt effectief schimmel uit een zwaar met schimmels gecontamineerd klinisch monster te verwijderen. De hoeveelheid virus in het monster wordt echter ook met 2 tot 3 log verminderd. Dat is niet wenselijk. Ook centrifugeren blijkt de hoeveelheid schimmels met circa 2 log sterker te verminderen. De hoeveelheid virus wordt echter slechts met circa 1 log verminderd. Dat is veel beter dan de 2 tot 3 log vermindering bij filtreren. Daarom worden klinische monsters nu standaard tien minuten bij 3200xg gecentrifugeerd, voor een optimale opbrengst van de viruskweek. Alle drie de cellijnen blijken gedurende twintig passages de groei van laboratoriumstammen van influenzavirus A(H3N2), A(H1N1)pdm09 en fylogenetische lijnen B/Yamagata en B/Victoria goed te ondersteunen. Na twintig celpassages wordt die ondersteuning minder. Dit wordt veroorzaakt door zichtbare uiselectie van bepaalde types cellen in het natuurlijke MDCK-celmengsel. Een licht hogere titer van influenzavirus is bereikt door HEPES-buffer toe te voegen aan het serumvrije virusgroeimedium. Dit leverde ook een verbeterde celoverleving gedurende de benodigde incubatie met klinisch monster (ruim 1 week), of blinde tweede passage van het klinisch monster.

12.4 Evaluatie met klinische monsters

Het bleek niet mogelijk om uit de eerste zeventien klinische monsters influenzavirus te isoleren met MDCK-NBL2 van leverancier Cell Line Services. In het seizoen 2012/2013 vonden we een vergelijkbaar resultaat met MDCK-NBL2 van leverancier ATCC. In het seizoen 2013/2014 was er weinig detectie van influenzavirus type B. Hierdoor was het niet mogelijk om te evalueren of de drie cellijnen geschikt zijn voor de isolatie van influenzavirus type B. Slechts van twee van de vier PCR-positieve monsters van influenzavirus type B, was het mogelijk virus te isoleren op MDCK-SIAT, terwijl op MDCK-I-cellen alle vier de monsters negatief waren. Figuur 1 vat de positiviteit op de diverse cellijnen samen van de PCR-positieve monsters van influenzavirus type A. Hieruit blijkt dat A(H1N1)pdm09 het vergelijkbaar goed doet op MDCK-I- en MDCK-SIAT-cellen, en dat A(H3N2) het veel beter doet op MDCK-SIAT-cellen. Dat lijkt echter het effect van één specifieke week en celpassage-blok te zijn (Figuur 1B) waarbij alle A(H3N2) niet gekweekt zijn op MDCK-I-cellen. Als we dit blok uitsluiten bij analyse, is kweekpositiviteit voor A(H3N2) op MDCK-I- en MDCK-SIAT-cellen vergelijkbaar goed. Uit Figuur 1 is duidelijk dat het succes van virusisolatie afneemt met toenemend passagenummer van de cellijn. Uit Figuur 1 blijkt ook dat dit samenhangt met de virale 'load' van het klinische monster. De aantallen zijn eigenlijk te klein, maar we kunnen grofweg zeggen dat bij een hoger passagenummer van de cellijn een hogere virale 'load' nodig is om een virusisolaat te verkrijgen. Ook voor virusisolatie uit klinische monsters is het dus een goede richtlijn om de cellijn maximaal twintig passages te gebruiken.

Figuur 1. Succes van influenzaviruisolatie is afhankelijk van de virale ‘load’ van het klinische monster (Ct-waarde; hoe lager deze waarde hoe meer virus in het monster) en het passage-nummer van de cellijn (A-D). In de kruistabellen E en F is het succes van influenzaviruisolatie op de cellijnen MDCK-I en MDCK-Siat tegen elkaar uitgezet. Passagenummer van de cellijnen geteld vanaf het passagenummer van de ingevroren voorraad. nvt = niet van toepassing



12.5 Conclusie en hoe verder

De kans op kweeksucces wordt verhoogd door centrifugeren van het klinisch monster, door cellijnen maximaal twintig passages na uitvriezen te gebruiken, en door toevoegen van HEPES-buffer aan het virusgroeimedium. Zowel MDCK-SIAT- als MDCK-I-cellen zijn geschikt voor isolatie van influenzavirus A(H1N1)pdm09 en A(H3N2) uit klinische monsters. Voor influenzavirus type B zijn er onvoldoende resultaten voor een evaluatie. In het seizoen 2014/2015 testen we speciaal voor influenzavirus type B nog twee MDCK-lijnen, namelijk MDCK-II en MDCK-T. MDCK-T is een lijn die het RIVM in 1976 verkreeg van Tobita, die deze cellijn aanraadde voor de isolatie van influenzavirus type B (Med Microbiol Immunol. 1975;162:23-27).

12.6 Dankbetuiging

We danken alle deelnemende huisartsen en hun patiënten voor klinische monsters. Zonder hun medewerking is dit onderzoek niet mogelijk.

12.6.1 Publicaties en referenties

Jong JC de, Meijer A, Donker GA, Hoek W van der, Lange MMA de, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Het influenzaseizoen 2013/2014 in Nederland: lage influenza-activiteit. Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie. 2014;22:153-161

Teirlinck AC, van Asten L, Brandsema PS, Dijkstra F, Donker GA, Euser SM, van Gageldonk-Lafeber AB, Hooiveld M, de Lange MMA, Meijer A, Slump E, van der Hoek W. Jaarrapportage Surveillance Respiratoire Infectieziekten 2013. RIVM Rapport 150002006. 2014

13 Influenzasurveillance en genetische karakterisering van influenza-virussen in seizoen 2013-2014, begin seizoen 2014-2015 en van bijzondere aanvragen

Auteur: Pieter Overduin

Betrokkenen: Adam Meijer, Sharon van den Brink, Tom Marzec, Mariam Bagheri, Hans Krul, Marcel Jonges, Gé Donker (NIVEL), Marit de Lange (RIVM/EPI), Anne Teirlinck (RIVM/EPI), Wim van der Hoek (RIVM/EPI), Anja Haenen (RIVM/EPI), Ruud van Beek (EMC), Guus Rimmelzwaan (EMC), Marion Koopmans (EMC)

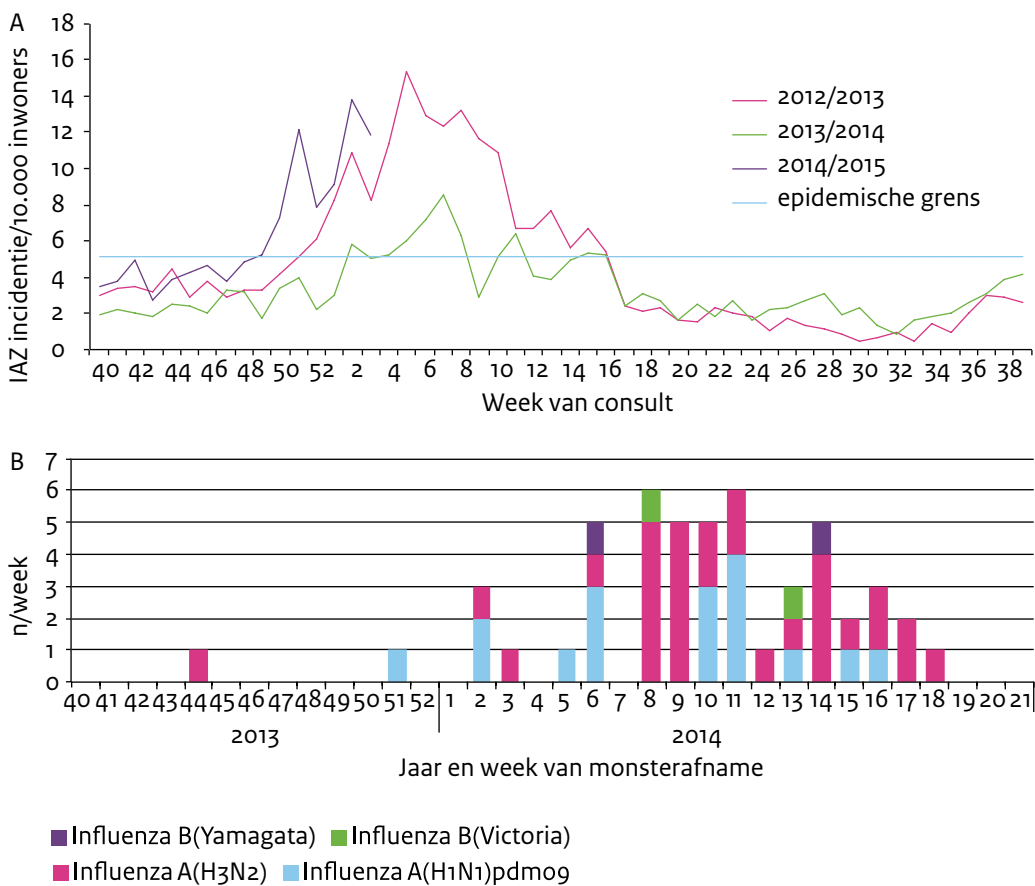
Contactpersoon: Adam Meijer (adam.meijer@rivm.nl)

13.1 Influenzasurveillance

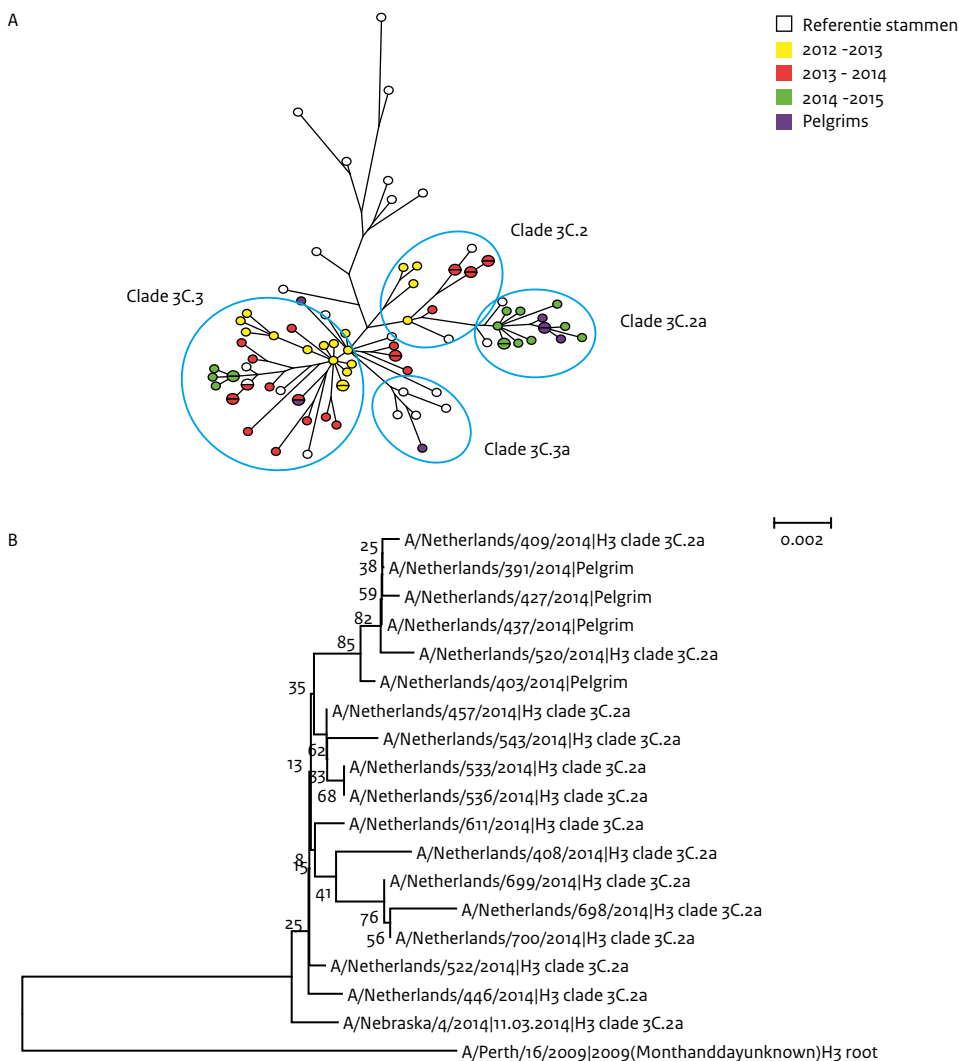
Het Influenza seizoen 2012-2013 was uitzonderlijk lang (zeventien weken) en het seizoen 2013-2014 was zeer kort (Figuur 1A). Slechts twee weken kwam de incidentie in seizoen 2013-2014 boven de epidemiologische grens van 5,1 zieken met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) per 10.000 inwoners (gemeten in de huisartsenpeilstationsurveillance). De griep kwam ook laat: pas in de tweede helft van januari 2014 begon het aantal griepgevallen te stijgen. In het huisartsenpeilstationnetwerk was het aantal gedetecteerde influenzavirussen A(H3N2) en A(H1N1)pdm09 ongeveer gelijk, terwijl influenzavirus type B bijna niet werd gevonden (Figuur 1B).

Het influenzaseizoen 2014-2015 begon vroeg. Eind oktober zijn in de huisartsenpeilstationsurveillance de eerste influenzaviruspositieve monsters gevonden, en vóór de kerst van 2014 werd de epidemische grens van 5,1 per 10.000 inwoners overschreden (Figuur 1A). Tot 16 januari 2015 zijn 138 influenzavirussen gevonden in de huisartsenpeilstationsurveillance. Het gaat om 118 A(H3N2)-virussen (85,5%), 7 A(H1N1)pdm09-virussen (5,1%) en 13 B/Yamagatalijnvirussen (9,4%). In één monster detecteerden we zowel A(H3N2)- als B/Yamagatalijnvirus. Twintig van de influenza A(H3N2)-virussen uit het 2014-2015 seizoen zijn gesequencet. Veertien vielen in clade 3C.2a en zes in clade 3C.3 (Figuur 2). De stammen in de 3C.2a-clade hebben in vergelijking met seizoen 2013-2014 een aantal extra aminozuurmutaties ten opzichte van de vaccinstam (A/Texas/50/2012). Deze mutaties gaan samen met een antigene verandering, waardoor de bescherming tegen deze influenzavirussen door bestaande, natuurlijke immuniteit en immuniteit door vaccinatie met het 2014/2015-vaccin niet optimaal is.

Figuur 1. A: incidentie van influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) per 10.000 inwoners per week, in seizoenen 2013-2014 tot en met 2014-2015. **B:** aantallen monsters van huisartsenpatiënten per week die positief zijn voor influenzavirus, verdeeld naar type en subtype of lineage, in seizoen 2013-2014



Figuur 2. A: maximum parsimony fylogenetische boom van het hemagglutininegenoomsegment van influenza A(H3N2)-virussen uit de huisartsenpeilstations surveillance en van MERS-CoV verdachte pelgrims die positief voor A(H3N2) influenzavirusinfectie bleken te zijn. Alleen de referentiestammen van Clade 3 en van de 'root' van de WHO/ECDC TESSy-referentiestamenset van oktober 2014 zijn weergegeven. De kleuren geven de verschillende influenza-seizoenen of patiëntengroep weer. De twee influenzavirusstammen van pelgrims in Clade 3C.3 zijn uit seizoen 2013-2014. De overige A(H3N2) van pelgrims zijn uit seizoen 2014-2015. **B:** detail fylogenetische boom van het hemagglutininegenoomsegment van influenza A(H3N2) clade 3C.2a-virussen van pelgrims en niet-pelgrims. Eén sequentie is niet in de boom opgenomen, omdat deze niet helemaal compleet was.



13.2 Bijzondere aanvragen

Naast de surveillance van circulerende influenzavirussen, rhino- en enterovirussen en RSV in de huisartsenpeilstations surveillance wordt op aanvraag ook respiratoire diagnostiek gedaan bij verdenking op andere respiratoire infecties. Denk hierbij aan aviaire influenza en MERS-CoV-infectie.

De jaarlijkse hadj naar Mekka vond in 2014 plaats van juli tot oktober. De grote, dicht op elkaar gepakte mensenmassa is een ideale situatie voor de 'uitwisseling' van allerlei infecties. Omdat in Saoedi-Arabië MERS-CoV voorkomt, worden pelgrims die terugkeren met ernstige respiratoire klachten al snel verdacht van een MERS-CoV-infectie en daarop getest. Van de mensen die in Saoedi-Arabië/Mekka zijn geweest, zijn er zesenvestig onderzocht op MERS-CoV-infectie. Retrospectief zijn al deze patiënten ook onderzocht op influenzavirusinfectie. Negen van hen bleken positief voor A(H3N2) en negen voor B/Yamagata-lineage. Zes van de A(H3N2)-virussen zijn gesequencet. Vijf vielen in clade 3C.2a en een viel in clade 3C.3a (Figuur 2).

13.3 Beschouwing

A(H3N2) clade 3C.2a is een nieuwe tak aan de fylogenetische boom. Deze is geëvolueerd uit clade 3.2 (Figuur 2A). Terugkerende pelgrims in Nederland introduceren deze influenzavirussen. Het is de vraag of zij hiermee de epidemie hebben gestart. Het kan namelijk ook zo zijn dat er meerdere introducties zijn die elk een aandeel hebben in het ontstaan van de epidemie. In het eerste geval verwacht je in het begin van de epidemie influenzavirussen die nauw verwant zijn aan de stammen die gevonden zijn in de pelgrims. In het tweede geval ontstaan er verschillende clusters binnen een clade die niet direct gekoppeld zijn aan de stammen van pelgrims. Ook kun je je afvragen of deze geïmporteerde influenzavirussen voorspellers zijn van de genetische clades in de komende griep epidemie in Nederland en West-Europa.

De genetische cladeverdeling van de eerste twintig gesequencete monsters uit de huisartsenpeilstations surveillance laat zien dat de meerderheid van de A(H3N2)-virussen van dezelfde clade is als de monsters van de pelgrims. De fylogenetische boom (Figuur 2A) laat zien dat de Nederlandse patiënten wel in dezelfde genetische clade 3C.2a vallen, maar dat er een duidelijk verschil is in de subclustering van 'pelgrimvirussen' en virussen in de algemene Nederlandse bevolking. Als we verder inzoomen op clade 3C.2a (Figuur 2B), zien we dat slechts twee van de A(H3N2) virussen uit de huisartsenpeilstations surveillance nauw verwant zijn aan de door pelgrims geïmporteerde influenzavirussen in clade 3C.2a. Dat duidt erop dat de virussen die door de pelgrims geïmporteerd zijn mogelijk hebben bijgedragen aan het ontstaan van de epidemie, maar dat er zeker ook nog andere introducties geweest moeten zijn. In Figuur 2A zijn ook twee influenzavirussen aangegeven van de pelgrims uit 2013 (paarse bolletjes). Deze vallen in clade 3C.3 en clusteren ook met de monsters uit de huisartsenpeilstations surveillance van seizoen 2013-2014, maar waarschijnlijk zijn dit geen indexgevallen geweest.

De fylogenetische boom (Figuur 2A) laat ook zien hoe A(H3N2)-influenzavirus de laatste drie seizoenen gedivergeerd is. De opvolgende seizoenen vanaf 2012-2013 liggen in ringen van binnen naar buiten. Tot nu toe zien we in seizoen 2014-2015 alleen A(H3N2) uit clades 3C.3 en 3C.2a. Het is afwachten of de clades 3C.2 en 3C.3a nog verder evolueren, of dat deze takken verdwijnen.

13.4 Dankbetuiging

We danken alle deelnemende huisartsen en hun patiënten voor klinische monsters. We danken ook de laboratoria die monsters voor MERS-CoV hebben ingezonden, en het landslaboratorium van Aruba voor het inzenden van influenzaviruspositieve monsters. Zonder hun medewerking is dit onderzoek niet mogelijk.

13.4.1 Publicaties en referenties

Jong JC de, Meijer A, Donker GA, Hoek W van der, Lange MMA de, Rimmelzwaan GF, Osterhaus ADME. Het influenzaseizoen 2013/2014 in Nederland: lage influenza-activiteit. Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie. 2014;22:153-161

Teirlinck AC, van Asten L, Brandsema PS, Dijkstra F, Donker GA, Euser SM, van Gageldonk-Lafeber AB, Hooiveld M, de Lange MMA, Meijer A, Slump E, van der Hoek W. Jaarrapportage Surveillance Respiratoire Infectieziekten 2013. RIVM Rapport 150002006. 2014

14 Genotypering hepatitis A-virus

Auteur: Jeroen Cremer

Betrokkenen: Harry Vennema, Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt

Contactpersoon laboratorium: Harry Vennema (harry.vennema@rivm.nl)

Contactpersonen epidemiologie: Wilfrid van Pelt (wilfrid.van.pelt@rivm.nl), Barbara Schimmer (barbara.schimmer@rivm.nl)

Deze hepatitis A-kiemsurveillance is een samenwerking van het RIVM/Cib en de GGD'en. Doel is om het GGD-beleid voor de bestrijding van hepatitis A te ondersteunen. Dit doen we door genotypering van hepatitis A-virus (HAV). Typering van het HAV in serologisch positieve monsters, of feces van een serologisch positieve patiënt, gebeurt voor Nederland bij het Cib-IDS. De typerings- en basale epidemiologische informatie wordt internationaal gedeeld via HAVNET.

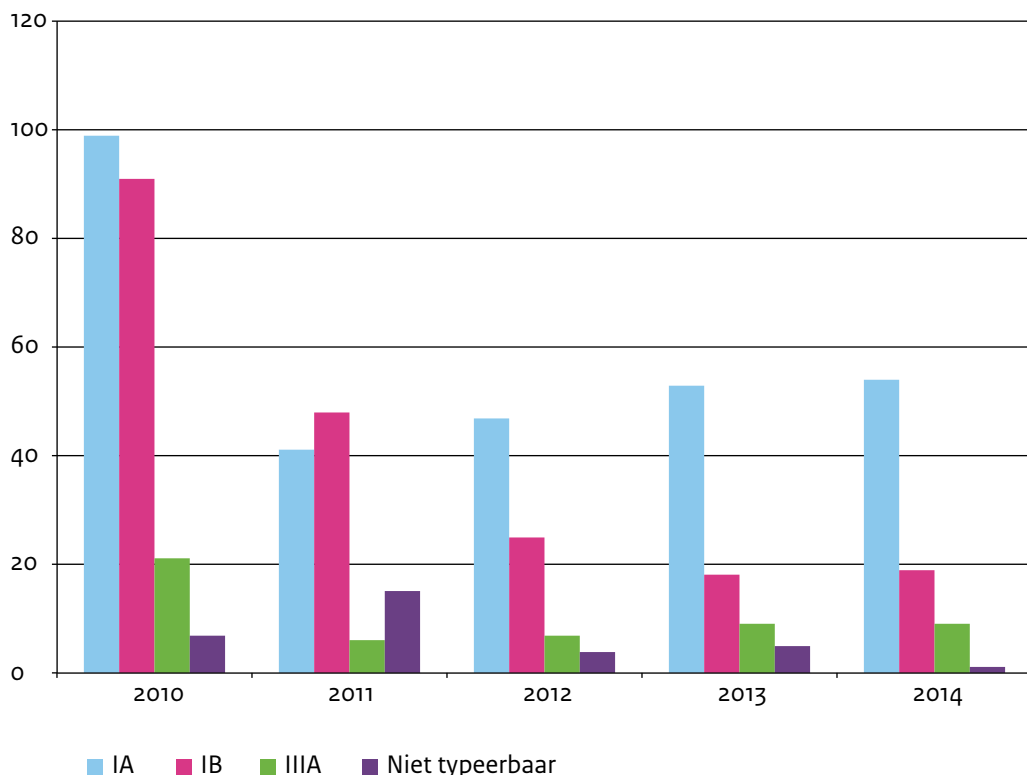
Tabel 1. Overzicht tabel van OSIRIS-meldingen en ingezonden monsters 2014-2010

	2014	2013	2012	2011
Meldingen OSIRIS	128	134	142	151
Ingezonden monsters	153	157	152	290
In OSIRIS gemelde ingezonden monsters	96	99	89	101
In OSIRIS gemelde positieve monsters	73	84	73	71
In OSIRIS gemelde getypeerde monsters	73	80	72	69

In 2014 zijn in OSIRIS 128 meldingen van hepatitis A gedaan, waarvan er achteraf 27 zijn verwijderd. Van alle meldingen zijn 96 monsters ingestuurd, afkomstig van 89 HAV-gevallen. Op deze monsters is PCR en typering uitgevoerd; 73 monsters bleken positief, afkomstig van 70 gevallen. Veel van de PCR-negatieve monsters zijn afkomstig van verwijderde meldingen. Het aantal positieve monsters is vergelijkbaar met voorgaande jaren.

Naast gemelde gevallen worden ook monsters ingestuurd van mogelijke gevallen. Denk hierbij aan asymptomatische contacten en ouderen zonder symptomen maar met licht verhoogde IgM. Contacten van bekende gevallen zijn vaak PCR-positief, terwijl monsters van ouderen meestal negatief zijn in de PCR. De 153 ingezonden monstermaterialen bestonden uit 23 (15%) fecesmonsters en 130 (85%) serummonsters. De detectie-PCR was positief voor 79 (52%) van deze monsters. Hiervan was het op één positief monster na (99%) mogelijk om het type te bepalen op basis van een sequentie van 460 nucleotiden in de VP1/2A-regio van het virus. Het enig overgebleven monster was niet typeerbaar vanwege te lage virale loads (dat wil zeggen $C_p > 34$ cycli). De resultaten van de typeringen van 2010-2014 staan weergegeven in Figuur 1.

Figuur 1. HAV-genotypeoverzicht voor 2010-2014

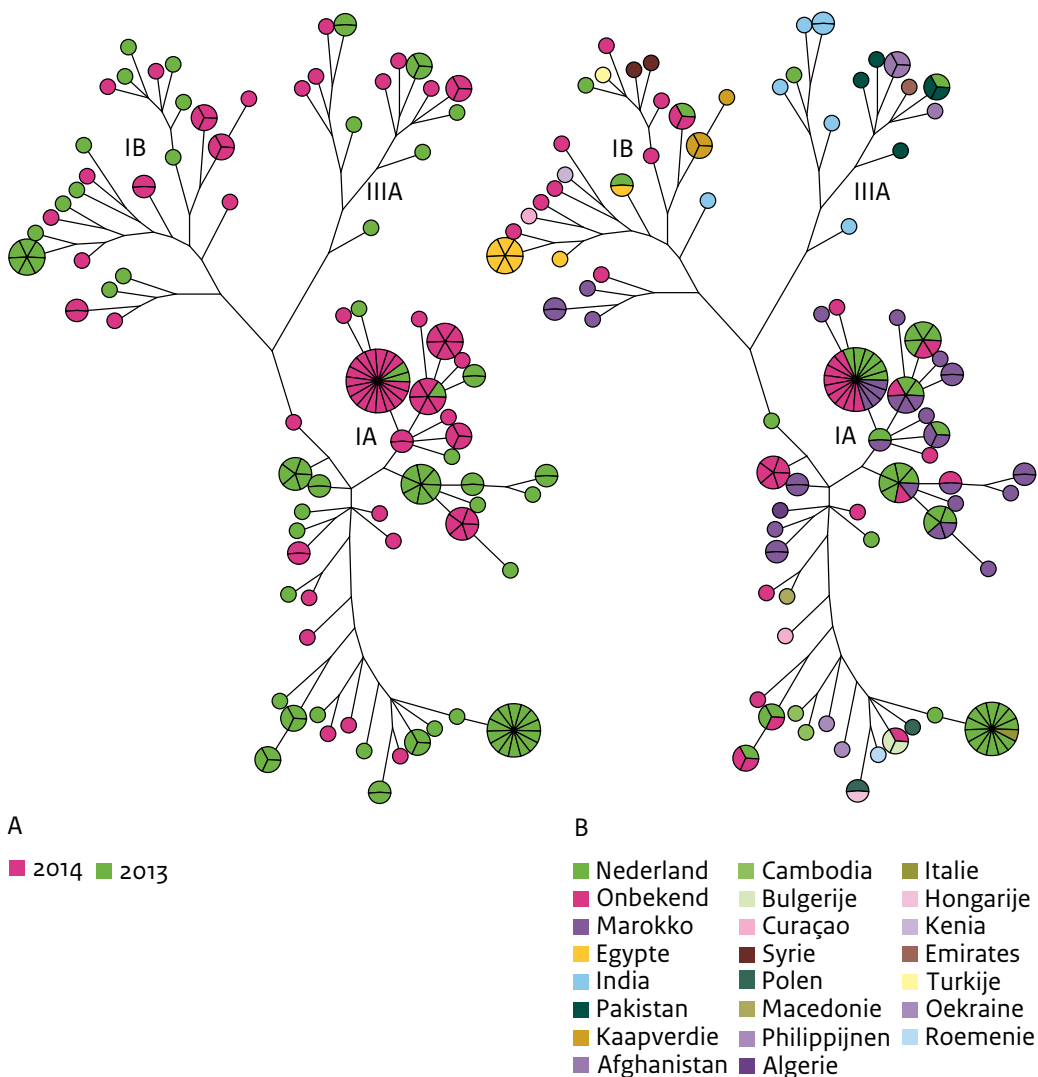


Sinds 2011 lijkt het aantal PCR-positieve HAV OSIRIS-meldingen in Nederland redelijk stabiel. Het aantal schommelt rond de 75 gevallen per jaar. Vanaf 2012 is HAV I.A het overheersende genotype (zie paragraaf 16.1).

Er zijn veerig unieke sequenties gevonden in 2014, waarvan er twaalf in clusters van twee tot veertien patiënten voorkomen (Figuur 2). In Figuur 2a is te zien dat bepaalde clusters in zowel 2013 als 2014 voorkomen (twee kleuren in één cirkel). Er zijn ook clusters die alleen in 2013 of 2014 voorkomen.

De gevonden sequenties zijn vergeleken met de beschikbare sequenties in de HAVNET-database. De achtergrondsequenties in de HAVNET-database zijn sequenties die gedeeld worden met meerdere laboratoria wereldwijd, en gepubliceerde sequenties uit GenBank. Deze database is ook gebruikt om een typingtool te ontwikkelen waarmee HAV-sequenties tot genotype worden ingedeeld. (<http://www.rivm.nl/mpf/hav/typingtool#/>). De door ons gevonden sequenties clusteren voor een groot deel in een regio of land van herkomst of een risicogroep (Figuur 2b).

Figuur 2. Basic maximum parsimony tree van het VP1/2A-gebied (460 nt) van in Nederland gevonden HAV-stammen in 2013 en 2014. In de legenda is het aantal stammen per jaar/land zichtbaar; A: De verdeling tussen 2013 en 2014, B: De verdeling van het meest waarschijnlijke land van besmetting



14.1 Toelichting van enkele grotere clusters uit 2014

Het grootste cluster in 2014 bestaat uit zeventien stammen uit de regio Rotterdam. Dit cluster is al een aantal jaren zichtbaar. De bron van deze HAV I.A-sequentie ligt in Marokko, waarbij familiebezoek hoogstwaarschijnlijk de bron van besmetting is. Na terugkeer zijn naasten geïnfecteerd. Eind september 2014 is het eerste geval van dit cluster gemeld, het laatste geval halverwege december. De zeventien stammen zijn afkomstig uit zeven gezinnen. In de meeste gevallen betreft het kinderen.

De overige clusters, groter dan drie stammen, zijn ook van het genotype HAV I.A. Ook deze hebben hun oorsprong waarschijnlijk in Marokko. Deze clusters zijn waargenomen in de regio's Utrecht, Amsterdam en Rotterdam.

14.2 Conclusie

Hepatitis A-typing helpt om inzicht te krijgen in de bronnen van HAV-infecties. Het aantal inzendingen en PCR-positieven is de laatste drie jaar redelijk stabiel. De verdeling tussen de genotypes is in 2014 ongeveer gelijk gebleven ten opzichte van 2013. In 2014 is er weer een redelijk percentage HAV-gevallen uit endemische landen geïmporteerd. Er was een groot cluster in de omgeving van Rotterdam, waarbij kinderen uit verschillende gezinnen zijn geïnfecteerd in een periode van ongeveer drie maanden. De eerste besmetting is waarschijnlijk in Marokko opgelopen.

14.2.1 Publicaties en referenties

Petrignani M, Verhoef L, Vennema H, van Hunen R, Baas D, van Steenberg JE, *et.al.* "Under-diagnosis of foodborne hepatitis A, The Netherlands, 2008-2010" (1.). Emerg Infect Dis. 2014 Apr;20(4):596-602

EFSA report: "Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe" (2014) <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3821.htm>

15 Hepatitis E-virus: diagnostiek en typering

Auteur: Harry Vennema

Betrokkenen: Erwin Duizer, Johan Reimerink, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt, Jeroen Cremer, Jacinta Bakker, Marjan Kuijer, Ngoc Hoa Chung, Najima Lamkaraf

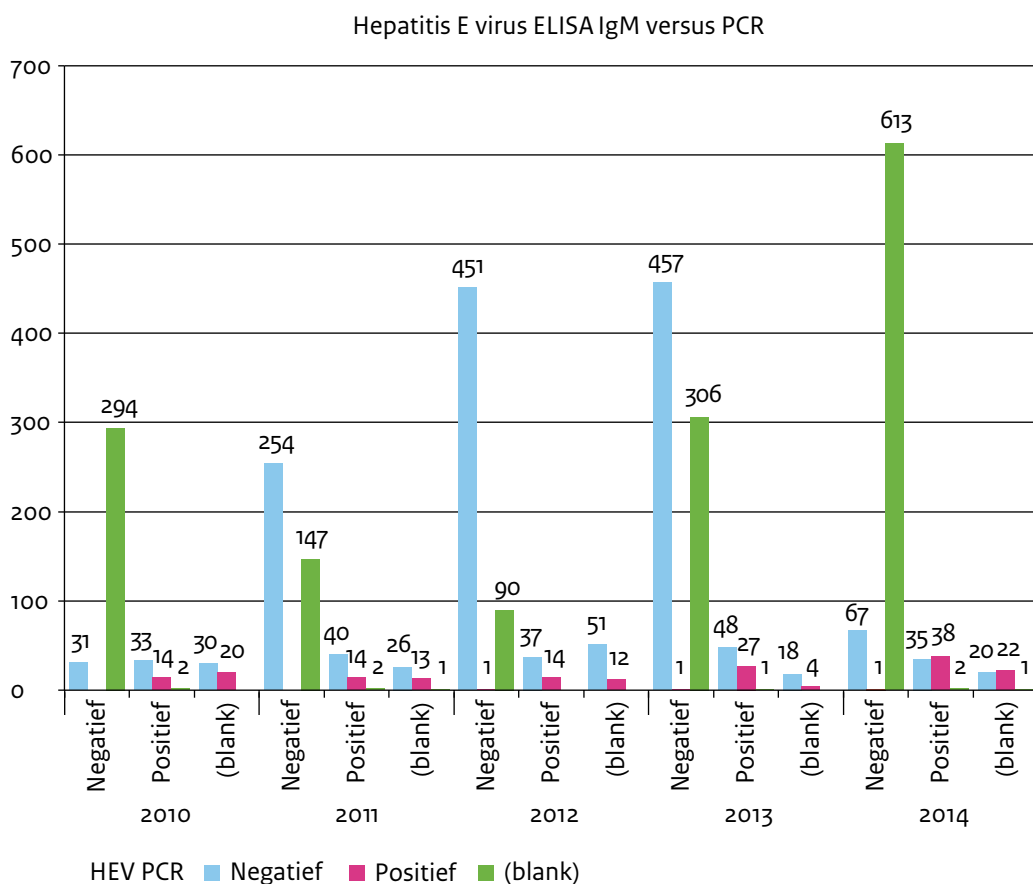
Contactpersoon laboratorium: Harry Vennema (harry.vennema@rivm.nl)

Contactpersoon epidemiologie: Barbara Schimmer (barbara.schimmer@rivm.nl)

15.1 Serologieaanvragen

Bij Clb-IDS is het aantal aanvragen voor hepatitis E-serologie duidelijk toegenomen tot eind 2012 en daarna gestabiliseerd. Het verloop in de tijd van het aantal aanvragen per ziekenhuis geeft een veel grilliger beeld. Sommige laboratoria zijn gestopt met inzenden naar Clb-IDS en doen de serologie nu zelf, terwijl andere (veel) meer zijn gaan insturen. De totale toename sinds eind 2012 is te verklaren door de extra inzendingen van één ziekenhuis. Deze compenseren tevens de afname in inzendingen van andere ziekenhuizen. De toename in het aantal PCR-positieven is voor dit ziekenhuis niet gecorreleerd aan het aantal serologieaanvragen. Een ander laboratorium heeft een redelijk constant aantal aanvragen gedurende de laatste jaren. Voor deze inzender is het percentage positieven in de tijd berekend. Ondanks het grillige verloop is sinds kort wel een stijgende lijn zichtbaar. Van mei 2011 tot augustus 2013 is elke serologieaanvraag ook met PCR geanalyseerd. In Figuur 1 is duidelijk te zien dat een monster dat IgM-negatief is met de huidige testen (HEV IgM ELISA, MP Diagnostics), zeer zelden wel PCR-positief is. IgM-positief in de ELISA is de beste indicator voor PCR-positief. Uiteindelijk is er in 2014 een groter aantal PCR-positieve monsters gevonden, bij een gelijkblijvend aantal aanvragen ten opzichte van 2013. Samen met een groot aantal extra positieve monsters uit de PCR-aanvragen waarvoor de serologie in de ziekenhuislaboratoria is gedaan, zijn er in 2014 aanzienlijk meer monsters beschikbaar voor typering. Voor typering waren 27 monsters beschikbaar in 2012, 32 monsters in 2013 en 61 monsters in 2014.

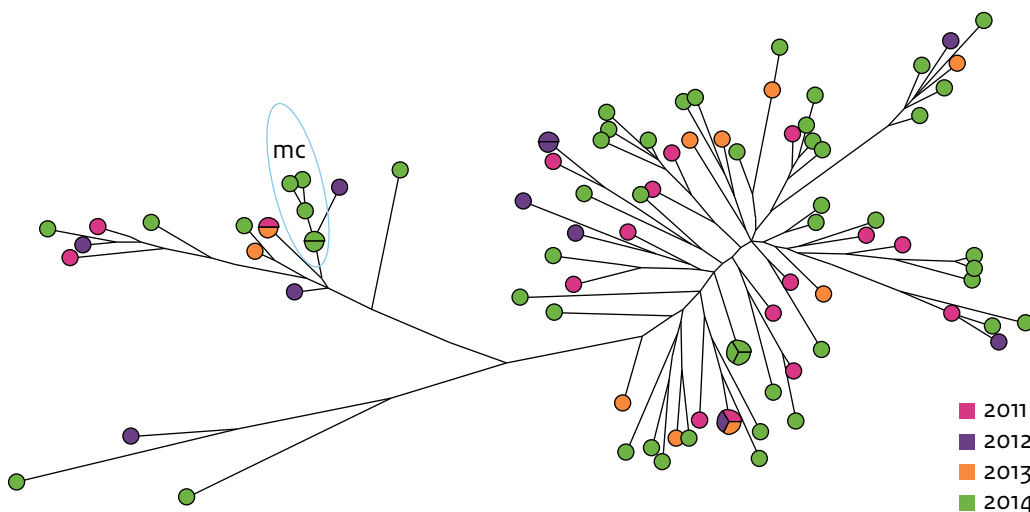
Figuur 1. Serologieaanvragen voor hepatitis E-virus. Aanvragen voor HEV-serologie bij Clb-IDS zijn gescreend met ELISA. De ELISA IgM-uitslag is vergeleken met de PCR-uitslag. ELISA IgM-negatieve monsters zijn zelden positief in de PCR, en in 2014 was ongeveer de helft van de ELISA IgM-positieve monsters ook positief in de PCR



15.2 Typering

Sinds 2011 wordt voor de typering een veel groter fragment als target dan voorheen (493 versus 148 nucleotiden). Dit nieuwe fragment overlapt met het oude ORF2f-fragment en ook met ORF2e. Dit laatste is een fragment dat in de rest van de wereld veel gebruikt wordt voor typering. Patiënten waarvan meer dan één monster beschikbaar is, laten zien dat de sequenties per patiënt identiek zijn. Dit is ook zo als de monsters verschillende jaren achter elkaar worden verzameld, zoals bij enkele chronische patiënten. Dit was ook met het korte fragment al het geval. Daarnaast worden sporadisch identieke sequenties gevonden, zonder bekende epidemiologische link. Naar analogie met hepatitis A-virus-typering zou dit kunnen duiden op een gezamenlijke bron. Op basis van typering van het korte 148 nt-fragment zagen we een duidelijke overlap tussen patiënten en varkensmonsters uit Nederland, vooral in het subtype 3c. Typering op basis van het lange 493 nt ORF2e+f-fragment, toont nog steeds vooral subtype 3c aan in patiëntenmonsters. Recente varkensmonsters zijn niet beschikbaar voor typering met dezelfde methode. Binnen het subtype 3c zien we een opvallende moleculaire clustering van nauw verwante hepatitis E-virusstammen (Figuur 2, mc). Een dergelijk nauw verwant cluster is nog niet eerder gevonden. Naast moleculaire clustering is er ook sprake van clustering in tijd. Alle afnamedata vallen namelijk binnen twee maanden. Het moleculaire cluster is niet plaatsgebonden, maar vijf van de zes patiënten wonen aan een van de grote rivieren. Hepatitis E-virus is wel aangetoond in oppervlaktewater. De verheffing van hepatitis E in 2014 en het moleculaire cluster zijn de aanleiding voor intensiever onderzoek naar mogelijke bronnen en transmissieroutes van HEV in Nederland. Dit is een samenwerking met verschillende betrokken GGD'en, Clb-EPI en Clb-LCI. Hiervoor zijn vanaf begin 2014 tot nu 38 vragenlijsten ingevuld en opgestuurd.

Figuur 2. Maximum parsimony analyse van HEV subtype 3c-sequenties van een 493bp-fragment van ORF2 van Nederlandse hepatitis E-patiënten. Kleurcodering staat voor jaar van afname



Virale zeldzame en emerging infecties en respons

16 Bijzondere virologische diagnostiek: zoönosen en zeldzame infecties

Auteur: Johan Reimerink

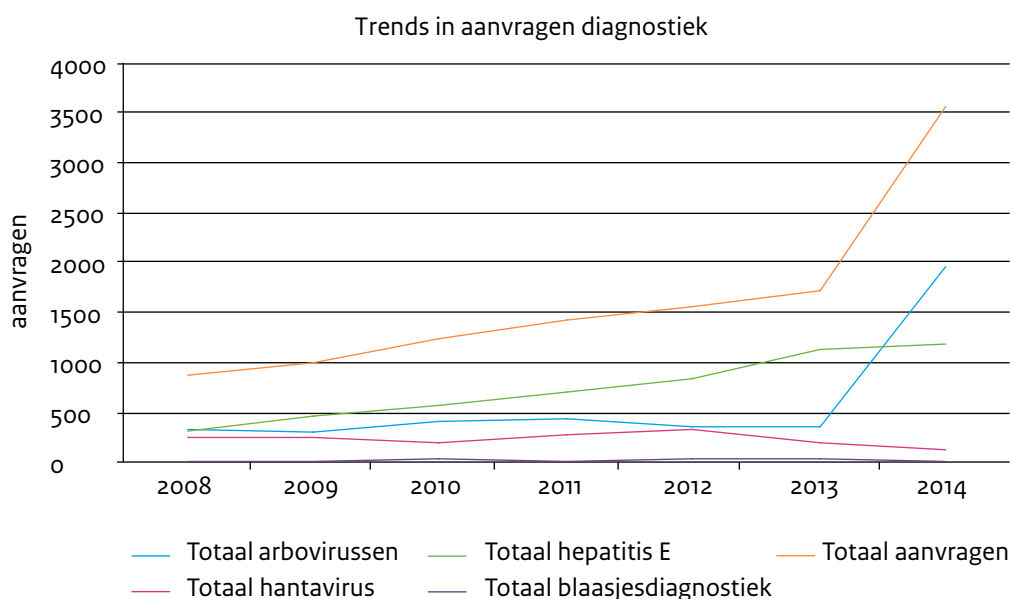
Betrokkenen: Marjan Kuijer, Ngoc Hoa Chung, Jacinta Bakker, Marieke Hoogerwerf, Najima Lamkaraf, Ilse Zutt, Gert-Jan Godeke, Ankje de Vries, Harry Vennema, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt, Jeroen Cremer, Sharon van den Brink, Daan Notermans, Titia Kortbeek, Barry Rockx

Contactpersoon: Johan Reimerink (johan.reimerink@rivm.nl)

IDS voert microbiologisch onderzoek uit voor zeldzame infectieziekten waarvoor in Nederlandse medisch microbiologische laboratoria geen of onvoldoende diagnostische bepalingen voorhanden zijn. Daarnaast is het belangrijk om een landelijk dekkend diagnostisch netwerk beschikbaar te houden voor pathogenen die van belang zijn voor de volksgezondheid in Nederland. Hiermee zijn we onder andere voorbereid op nieuwe bedreigingen. De virale diagnostiek die de afdeling Virale zeldzame en emerging infecties en respons (EID) van Clb-IDS uitvoert, is hiervan een voorbeeld. Het pakket is beschreven in het diagnostisch vademecum infectieziekten.

De stijgende trend in het aantal aanvragen voor EID zet zich voort in 2014. Het aantal aanvragen steeg van 1710 in 2013 naar 3549 aanvragen in 2014 (Figuur 1).

Figuur 1. Trends in aanvragen diagnostiek



16.1 Chikungunya

In 2010 lieten we zien dat er duidelijk een onderrapportage is van het aantal chikungunyavirus-infecties bij symptomatische patiënten die terugkomen uit gebieden rond de Indische oceaan (Reusken *et.al.*, 2013). Om dit probleem te ondervangen maken we sinds een jaar gebruik van een multiplex IFA. Hiermee tonen we antistoffen aan tegen drie verschillende mugoverdraagbare arbovirussen, namelijk denguevirus, chikungunyavirus en Japanse-encefalitisvirus. Deze aanpak leidde in het begin van 2014 tot de vondst van meer chikungunyaviruspositieve patiënten uit voornamelijk Zuidoost-Azië. Dit was nog, voordat de uitbraak in het Caribisch gebied losbarstte.

16.2 Hantavirus

Aanvragen voor hantavirusdiagnostiek zijn het afgelopen jaar sterk afgenomen. Dit aantal liep terug van 181 in 2013 naar 123 in 2014, ondanks een duidelijke toename in Twente van het aantal humane Puumalavirusinfecties (80% van alle gevallen). De meeste aanvragen voor hantavirusdiagnostiek bij Clb-IDS komen echter niet uit Twente.

Naar aanleiding van signalen dat het Seoulvirus aanwezig is in omliggende landen, heeft Clb-IDS het diagnostiek pakket voor hantavirussen uitgebreid. Het gaat om vier virussen (Seoulvirus, Dobrovavirus, Sin Nombrevirus en Saarema virus). Hantavirus en Puumalavirus zaten al in het pakket. Aanwijzingen dat er humane gevallen van Seoulvirus zijn in Nederland zijn er nog niet.

16.3 Hepatitis E

Hepatitis E-diagnostiekaanvragen blijven stabiel, ondanks het feit dat meerdere centra deze diagnostiek aanbieden (zie ook hoofdstuk 17 “Hepatitis E virus: diagnostiek en typering”).

Tabel 1. Trend in aangevraagde bijzondere virologische diagnostiek

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Denguevirus	263	246	346	337	264	276	
West Nilevirus	25	21	23	38	37	24	19
Tick-Born Encephalitis	26	18	24	26	36	32	22
Chikungunyavirus	nvt	6	25	24	19	26	
Arbovirus mosaïc (DENV; CHIKV; JEV)							545
Chikungunyavirus Caribisch gebied							1372
Totaal arbovirussen	314	292	418	425	355	358	1958
Hantaan virus	117	117	94	135	170	89	
Puumalavirus	129	119	96	137	168	92	
Hantavirus							123
Totaal hantavirus	246	236	190	272	338	181	123
Hepatitis E ELISA	224	291	379	482	618	859	810
Hepatitis E IB	33	62	78	79	75	113	161
Hepatitis E PCR	53	104	123	134	145	168	205
Totaal hepatitis E	310	457	580	695	838	1140	1176
Parapoxvirus PCR		5	23	11	18	20	8
Parapoxvirustypering		1	8	5	2	8	1
Herpesvirus-PCR			3	1	1	2	
Herpesvirustypering				1	1		
Varicellavirus-PCR			3		1		
Orthopoxvirus crmB gen-PCR		1					
Orthopoxvirus RDRP gen-PCR		5			4	1	
Orthopoxvirustypering		1					
Totaal Blaasjesdiagnostiek	nvt	13	37	18	27	31	9
Totaal MERS-CoV-serologie							283
Totaal aanvragen	870	998	1225	1410	1558	1710	3549

16.4 Uitgelicht: Chikungunyavirusuitbraak in het Caribisch gebied

In 2014 hebben we de Chikungunyavirusdiagnostiek uitgevoerd voor een aantal eilanden in het Caribisch gebied (Tabel 1 en Figuur 1). Het eerste geval van chikungunyavirus werd bevestigd op 5 december 2013 op St Martin. Sinds deze introductie van het virus in het Caribisch gebied heeft het virus zich snel verspreid. In een periode van negen maanden verspreidde het virus zich over het hele Caribisch gebied, Midden- en een deel van Zuid-Amerika en de Verenigde Staten (Figuur 2) (Van Bortel *et.al.*, 2014).

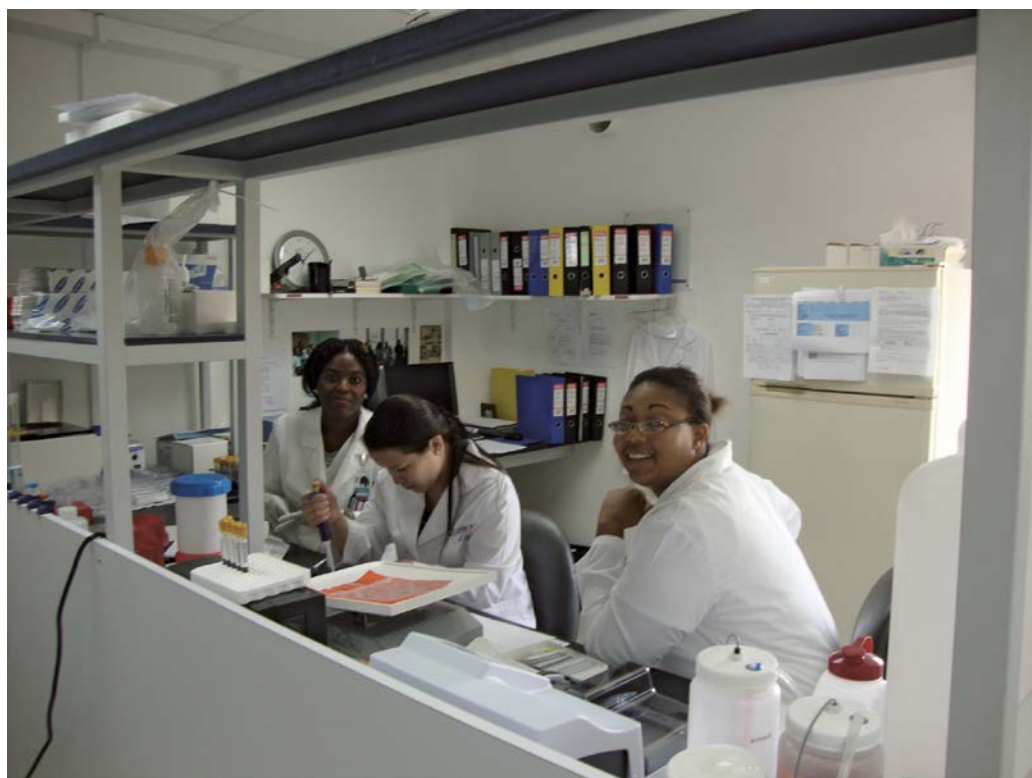
Figuur 2. Overzichtskaart van verspreiding van chikungunya



Uit de eerste sequentieanalyse blijkt dat het gaat om een virus dat behoort tot het Asian-cluster. Hoewel deze variant op dit moment niet het dominante type is in Zuidoost-Azië, wordt het wel efficiënt overgebracht door de *Aedes aegypti*-mug. Deze muggensoort komt in het Caribisch gebied het meest voor.

Bij de PAHO-WHO zijn 1.1 miljoen verdachte en 24.000 bevestigde gevallen van chikungunya-virusinfecties gemeld. Het probleem is dat er zeer beperkte diagnostische capaciteit is in de regio (Caribisch gebied). Het Clb-IDS ondersteunde het afgelopen jaar de Nederlandstalige eilanden in de regio met de diagnostiek. In 2014 heeft Clb-IDS 1372 sera getest op aanwezigheid van het chikungunyavirus. Daarnaast verzorgden wij op Sint Maarten en Curaçao een training over de implementatie van de chikungunyaserologie.

Figuur 3. Diagnostiektraining en -implementatie op Curaçao en Sint Maarten



Er gaan veel Nederlandse toeristen naar het Caribisch gebied, waardoor de kans toeneemt dat ze een infectie met het chikungunyavirus oplopen. Nederlandse medische microbiologische centra verstuurden 452 aanvragen voor arbovirusdiagnostiek in 2014. Hiervan kwam 60% binnen in de tweede helft van het jaar. Het percentage chikungunyaviruspositieve patiënten nam toe van 5% in het eerste naar 33% in het laatste kwartaal in 2014. Het percentage dengueviruspositieven schommelt in 2014 gedurende het hele jaar rond de 5%.

Op de meeste eilanden in het Caribisch gebied lijkt de chikungunya-epidemie over zijn hoogtepunt heen te zijn, behalve op Aruba. Hier neemt het aantal besmettingen nog steeds toe. Het lijkt erop dat Bonaire redelijk gespaard blijft van een epidemie met chikungunyavirus. Het virus is geïntroduceerd in de nieuwe wereld en zal mogelijk jaarlijks uitbraken veroorzaken, net als het denguevirus. Het verdient aanbeveling dat lokaal (Caribisch Nederland) en in Nederland chikungunyavirusinfectie onderdeel moet zijn van de differentiaaldiagnose van dengue-achtige ziektebeelden.

16.4.1 Publicaties en referenties

Van Bortel W, Dorleans F, Rosine J, Blateau A, Rousset D, Matheus S, *et.al.* “Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe.” *Euro Surveill.* 2014 Apr 3;19(13)

Reusken CB, Bakker J, Reimerink JH, Zelena H, Koopmans MG. “Underdiagnosis of chikungunya virus infections in symptomatic dutch travelers returning from the Indian ocean area.” *J Travel Med.* 2013 Jan-Feb;20(1):44-6

17 Emerging infecties en bijzondere diagnostiek: Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus

Auteur: Marcel Jonges

Betrokkenen: Gert-Jan Godeke, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt, Jeroen Cremer, Sharon van den Brink, Naomi van Marm, Harry Vennema, Adam Meijer, Suzan Pas (EMC), Chantal Reusken (EMC), Marion Koopmans (EMC)

Contactpersoon: Barry Rockx (barry.rockx@rivm.nl)

17.1 Emerging infecties

Bij Clb-IDS vindt op het gebied van Emerging Infections veel diagnostiek en aanvullend onderzoek plaats. Hiermee stellen we onder andere vast of mensen besmet zijn met een ziekteverwekker en hoe de transmissie plaatsvindt. Om het verloop van de besmetting te bepalen gebruiken we moleculair epidemiologisch of serologisch onderzoek. Ook in geval van een uitbraak zijn de Emerging Infections-werkzaamheden van belang.

17.2 Uitgelicht: MERS-CoV-diagnostiek

Het Middle-East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) veroorzaakt humane infecties. Dit virus komt vooral voor in het Midden-Oosten, maar is ook geconstateerd in reizigers die terugkeren uit het Midden-Oosten naar Europa, Amerika, Azië en Afrika. Wereldwijd zijn er tot eind 2014 in totaal 909 bevestigde humane gevallen van MERS-CoV gerapporteerd. Hiervan zijn 331 personen overleden.

In 2012 kwam snel een gezamenlijke, internationale laboratoriumrespons op gang. Het EID (Virale zeldzame en emerging infecties en respons) van het Clb-IDS heeft in samenwerking met het EMC (Erasmus Medisch Centrum) een moleculaire diagnostische methode ontwikkeld en geïmplementeerd om MERS-CoV te kunnen detecteren.

In 2013 is als essentiële aanvulling op de PCR-gebaseerde diagnostiek een MERS-CoV-specifieke serologische test ontwikkeld. Hiervoor werkten we samen met het EMC, het AMC (Amsterdam Medical Centre), de Universiteit Utrecht en de Universiteit van Bonn.

17.3 MERS-CoV in Nederland

In 2013 werd in Nederland bij 32 personen diagnostiek verricht naar MERS-CoV. Dit aantal nam in 2014 exponentieel toe tot 207. Van deze 207 personen zijn 685 materialen ontvangen voor MERS-CoV-diagnostiek. We hebben 402 respiratoire swabs getest op aanwezigheid van het virus met behulp van twee MERS-CoV-specifieke RT-PCR's. Daarnaast zijn 283 sera getest op aanwezigheid van MERS-CoV-antistoffen (Figuur 1). Van de 207 personen waren twee personen MERS-CoV-positief en 99% (n=205) bleek MERS-CoV-negatief.

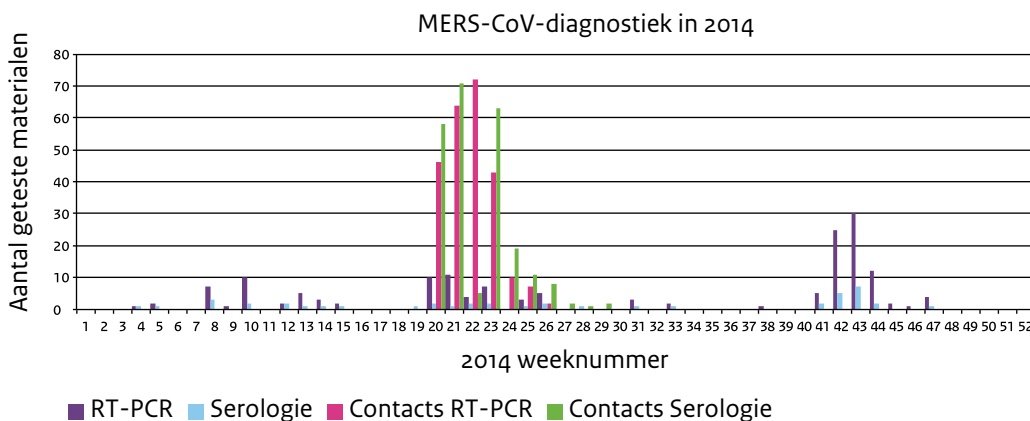
De twee met MERS-CoV besmette reizigers waren teruggekeerd uit Saoedi-Arabië in week 20. Vervolgens is contactonderzoek gestart om transmissie uit te sluiten of te bevestigen. Clb-IDS werkte hiervoor samen met de Landelijke Coördinatie Infectieziektebestrijding (LCI), het EMC, de betrokken GGD'en en de ziekenhuizen waar de patiënten opgenomen waren. Voor dit onderzoek zijn in totaal 131 geïdentificeerde contacten intensief gemonitord. Van het reisgezelschap, de vliegtuigcontacten, de beschermde en onbeschermde contacten in Nederland zijn 244 respiratoire swabs en 240 sera getest. Alle testresultaten waren negatief. De conclusie hieruit is dat de twee MERS-CoV-importgevallen niet geleid hebben tot verdere verspreiding in Nederland.

In oktober 2014 voldeden ongeveer dertig uit Mekka teruggekeerde pelgrims aan de MERS-CoV-casusdefinitie. Diagnostiek op aanwezigheid van MERS-CoV was negatief. De respiratoire klachten bij deze pelgrims werden grotendeels veroorzaakt door een influenzavirusinfectie.

17.4 MERS-CoV in dromedarissen

Na de ontdekking en het bewijs in 2013 dat MERS-CoV in dromedarissen circuleert, is in 2014 onder andere gekeken naar virusuitscheiding bij deze dieren. Het Clb-IDS werkte hiervoor samen met het EMC en de overheid van Qatar. Na laboratoriumanalyse van 105 materialen, afkomstig van MERS-CoV-positieve dromedarissen, bleek dat deze dieren het virus niet alleen respiratoir en/of fecaal uitscheiden, maar ook in hun melk. Consumptie van rauwe dromedariemelk kan dus een bijdrage leveren aan zoönotische transmissie.

Figuur 1. Staafdiagram waarin het aantal materialen per week is weergegeven waarvoor diagnostiek verricht is naar MERS-CoV met behulp van moleculaire of serologische testen. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen individuele MERS-CoV-diagnostieaanvragen en onderzochte contacten van twee MERS-CoV-importgevallen



17.4.1 Publicaties en referenties

Kraaij-Dirkzwager, M., *et.al.*, Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infections in two returning travellers in the Netherlands, May 2014. Euro Surveill, 2014. 19(21)

Reusken, C.B., *et.al.*, Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. Euro Surveill, 2014. 19(2)

Bacteriële surveillance en respons

18 Surveillance van gastro-enteritisisolaten

Auteurs: Sjoerd Kuiling, Anjo Verbruggen

Betrokkenen: Sjoerd Kuiling, Anjo Verbruggen

Contactpersoon: Max Heck (max.heck@rivm.nl)

Jaarlijks krijgt een op de vier Nederlanders te maken met gastro-enteritis (buikgriep). Het is dan ook één van de meest voorkomende infectieziekten. Naast allerlei leed veroorzaakt deze ziekte ook hoge kosten voor de maatschappij. Deze worden veroorzaakt door verzuim van school of werk en door (medische) verzorging. Het is dus belangrijk om te weten waardoor gastro-enteritis veroorzaakt wordt, hoe het voorkomen kan worden en welke groepen een groter risico lopen. Ook is het belangrijk om uitbraken van gastro-enteritis te bestuderen om de oorzaak te achterhalen. Clb-IDS, afdeling Bacteriële surveillance en respons (BSR) draagt daaraan bij door het typeren van onder andere *Salmonella* en *Escherichia coli*.

18.1 *Salmonella*

In 2014 zijn door Clb-IDS 2728 *Salmonella*-stammen getypeerd. Van dit aantal zijn 1274 stammen van humane en 1454 van niet-humane herkomst.

Van de humane monsters zijn er ongeveer 150 afkomstig van personen die gastro-enteritis opliepen na een verblijf in het buitenland (Tabel 1). De gevonden serotypes waren divers.

Tabel 1. Top zes van landen waar *Salmonella*-infecties zijn opgelopen

	Land	n
1	Turkije	26
2	Marokko	14
3	Thailand	14
4	Egypte	10
5	Spanje	9
6	Indonesie	8

Typering van alle *Salmonella*-isolaten vindt plaats met behulp van klassieke serotypering. Met deze serotypering worden thermostabiele (O-) en thermolabele (H-) antigenen aange- toond door directe agglutinatie met specifieke antisera.

O-antigenen maken deel uit van de celwand-lipopolysacchariden. De H-antigenen zijn proteïnen van de flagellen en kunnen voorkomen als mono-, di- of trifasische variaties.

De meest voorkomende serovars in 2014 zijn in Tabel 2 weergegeven.

Tabel 2. Top tien van meest voorkomende serovars (n/% totaal) in 2014

	serotype	n	%
1	Typhimurium	355	13
2	Enteritidis	347	12.7
3	4,[5],12:i:-	327	12
4	Anatum	165	6.1
5	Livingstone	143	5.2
6	Paratyphi B var. Java	112	4.1
7	Senftenberg	99	3.6
8	Heidelberg	95	3.5
9	Dublin	58	2.1
10	Agona	44	1.6

In 2014 is een begin gemaakt met onderzoek naar een efficiëntere methode voor de serotypering van *Salmonella*. Hiervoor is gebruik gemaakt van de "Luminex xMAP *Salmonella* Serotyping Assay" (SSA), een multiplex DNA-based assay. Het systeem heeft een kortere "turnaround time" dan de klassieke methode.

18.2 *Salmonella* Heidelberg

In 2014 was er een verheffing van *S. Heidelberg*. Na onderzoek bleek de oorzaak van de besmetting een onvoldoende verhitte spaghettimaaltijd. De maaltijd werd op meerdere kinderdagverblijven gegeten; het betrof jonge kinderen in de leeftijd van ± vijf maanden tot en met vier jaar. Zeven van de 93 zieke kinderen zijn opgenomen in het ziekenhuis. Voor dit onderzoek werd nauw samengewerkt met Clb-EPI, Clb-LCI, de NVWA, MML's en GGD'en.

18.3 *E. coli*

Sinds januari 1999 bestaat er een surveillance van STEC O157-infecties in Nederland: het zogenoemde Shigatoxineproducerende *Escherichia coli* (STEC) Diagnostiek-project. In 2007 is STEC non-O157 hieraan toegevoegd. In 2014 zijn 1482 *E. coli*-isolaten door Clb-IDS, BSR getypeerd. Een groot deel van deze stammen (1062; 72%) is getypeerd in het kader van dit project.

Het STEC-project houdt in dat elke positieve bevinding van STEC (op basis van fecesonderzoek of serologie) door het microbiologisch (ziekenhuis)laboratorium of de arts gemeld wordt aan de lokale GGD. De STEC-positieve *E. coli*-stammen worden vervolgens opgestuurd naar het Clb-IDS.

Hier worden alle ingestuurde STEC O157- en non-O157-isolaten getest met behulp van *polymerase chain reaction* (PCR) op aanwezigheid van de belangrijkste virulentiegenen. Indien positief wordt de stam verder getypeerd met de O- en H-serotypering. Ten slotte worden er DNA-profielen, ook wel fingerprints, van de STEC O157-isolaten gemaakt met *pulsed-field gel electroforese* (PFGE). Hiermee kunnen stammen onderling vergeleken worden en zijn clusters te detecteren. De PFGE wordt ingezet volgens een protocol dat vele landen gebruiken (PulseNet Europe en PulseNet USA).

Tabel 3. Meest gevonden O- en H-types in de STEC-diagnostiek 2014

	Serotype	n	%
1	O26:H11	21	9.3
2	O103:H2	15	6.6
3	O91:H-	12	5.3
4	O63:H6	11	4.8
5	O146:H21	10	4.4

18.3.1 Publicaties en referenties

Friesema I, de Jong A, Hofhuis A, Heck M, van den Kerkhof H, de Jonge R, *et.al.* “Large outbreak of Salmonella Thompson related to smoked salmon in the Netherlands”, August to December 2012. Euro Surveill. 2014 Oct 2;19(39). pii: 20918

Friesema IH, Schotsborg M, Heck ME, VAN Pelt W. “Risk factors for sporadic Shiga toxin-producing Escherichia coli O157 and non-O157 illness in The Netherlands, 2008-2012, using periodically surveyed controls.” Epidemiol Infect. 2014 Sep 8;1-8

19 MRSA-surveillance

Auteur: Thijs Bosch

Betrokkenen: Han van der Heide, Fabian Landman, Martijn van Luit, Marga van Santen, Corrie Schot, Leo Schouls, Sandra Witteveen, Kim van der Zwaluw

Contactpersoon: Leo Schouls (leo.schouls@rivm.nl)

19.1 Stroomlijning van de MRSA-diagnostiek

Sinds 1989 voert het RIVM de Nederlandse MRSA-surveillance uit. In dit 25-jarig jubileumjaar is deze MRSA-surveillance grondig herzien. Uitgangspunt hierin was het beter stroomlijnen van de MRSA-diagnostiek. De belangrijkste ontwikkelingen:

- Vorming van een surveillancegroep voor de dagelijkse uitvoering van MRSA typering;
- Optimalisatie en automatisering van data-analyse en terugkoppeling uitslagen aan inzenders;
- Gebruik van kant-en-klare PCR mixen voor MLVA en *spa*-typering;
- Uitbreiding van het aantal deelnemende MML's aan TypeNed;
- Alleen laboratoriumdiagnostiek uitvoeren bij een gerichte (transmissie) vraagstelling.

Deze ontwikkelingen hebben geleid tot een snellere, kwalitatief betere MRSA-typering die zowel de openbare gezondheid dient als lokale infectiepreventie gericht ondersteunt.

19.2 Aantal isolaten MRSA-surveillance blijft gelijk

Ondanks het feit dat een aantal bepalingen is afgeschaft, blijft het totaal aantal ingestuurde *S. aureus*-isolaten in 2014 vrijwel gelijk aan 2013 (4206 versus 4199). Hiervan is 11% ($n = 461$) door negen deelnemende laboratoria ingestuurd in het kader van TypeNed. Het gaat hier uitsluitend om *S. aureus* geïsoleerd bij mensen. Deze isolaten worden onderscheiden in isolaten met een type, geclassificeerd als diergerelateerde *S. aureus* (livestock-associated MRSA, LA-MRSA) en isolaten die niet tot die groep behoren (niet-LA-MRSA).

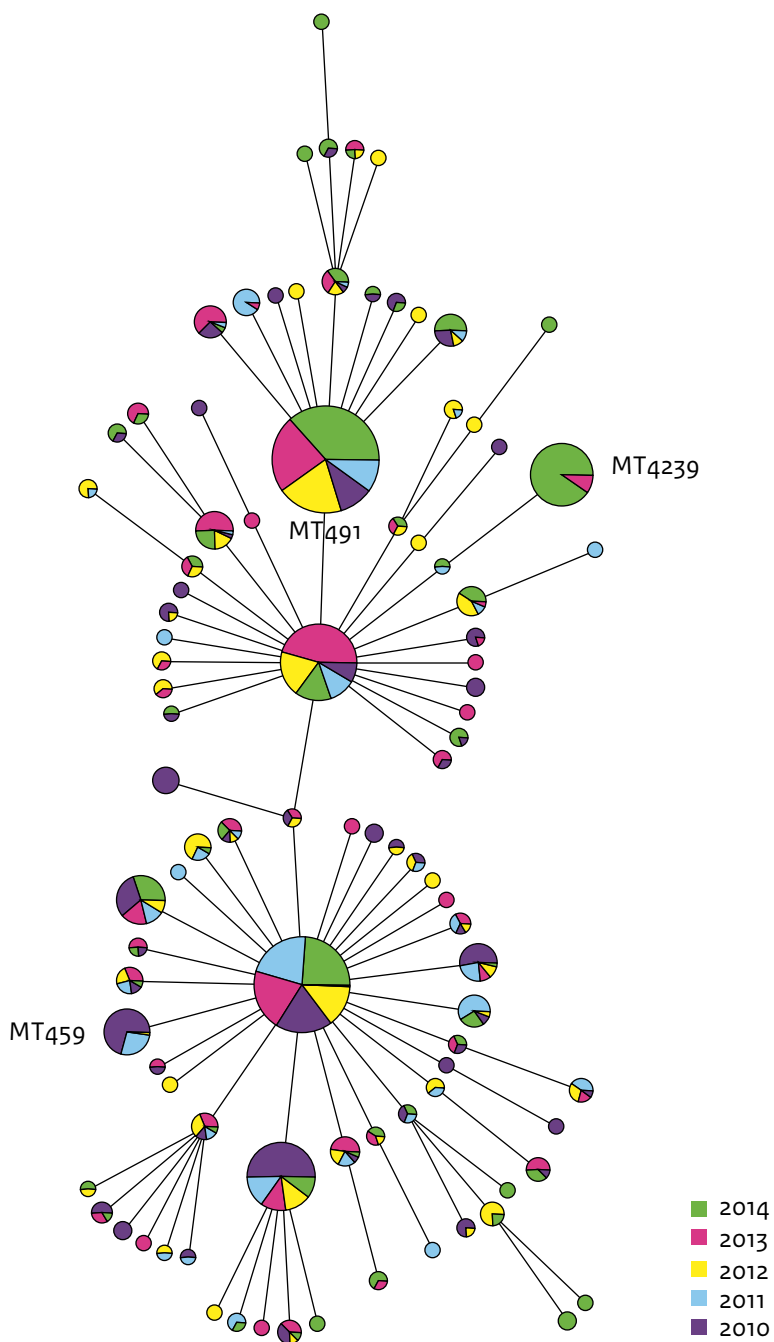
In totaal zijn 4162 *S. aureus*-isolaten (99%) compleet gekarakteriseerd. Dit houdt in: de *spa*-typering/MLVA naast detectie van *mecA/C* en PVL. Voor de overige 44 isolaten was dit om diverse redenen niet mogelijk: geen *S. aureus* ($n = 11$), verontreinigde cultuur ($n = 10$), geannuleerd door inzender ($n = 8$), andere redenen ($n = 15$).

Van de compleet getypeerde isolaten bleken er 269 (7%) geen *mec*-gen te bevatten (MSSA). Dit resulteert in een totaal van 3893 MRSA-surveillance-isolaten in 2014.

19.3 Surveillance van niet-LA-MRSA, opkomst van MT491

De resultaten van de surveillance van niet-diergerelateerde MRSA-isolaten (niet-LA-MRSA, $n = 2729$) verschilden ten opzichte van 2013 (Tabel 1). Binnen de top drie van MLVA-complexen (MC) kwamen MC5 MRSA-isolaten het meest voor in 2014 (24%), terwijl MC8 (23%) het meest voorkwam in 2013. Binnen alle MC's zijn 634 verschillende MLVA-types (MT's) gevonden en ook binnen deze MLVA-types was een opmerkelijke verschuiving zichtbaar. MT491 ($n = 87$), behorend tot MC22, kwam op één MT na het meest voor in 2014, terwijl dit MT in 2010 maar 25 keer is aangetroffen (Figuur 1). Naast de MLVA en *spa*-typering wordt in de MRSA-surveillance ook gekeken naar de aanwezigheid van de *mecC*- en PVL-genen. In 2014 bleef het percentage *mecC*-isolaten vrijwel gelijk aan 2013 (0.7% vs. 0.6%). Isolaten die genen bevatten voor de productie van de virulentiefactor PVL-toxine, zijn wel minder vaak gevonden (29% versus 26%).

Figuur 1. Minimum spanning tree van MC22 (2010-2014)



19.5 Surveillance van LA-MRSA, daling van het aantal isolaten

Het aantal diegerelateerde isolaten (LA-MRSA) daalde voor het vijfde opeenvolgende jaar. In 2014 behoorden 1164 (30%) isolaten tot LA-MRSA. Dit is een daling van 3% ten opzichte van 2013, en liefst 12% in vergelijking met 2009. Binnen MC398 zijn 51 MT's aangetroffen en de top drie van MT's bestond net als voorgaande jaren uit MT398 ($n = 652$), MT572 ($n = 151$) en MT569 ($n = 136$). Het aantal PVL-positieve MC398-isolaten steeg van 0.3% ($n = 4$) tot 0.6% ($n = 7$) (Tabel 1).

Tabel 1. MRSA-surveillance 2013 versus 2014

	MRSA		LA-MRSA (MC398)	
	2013	2014	2013	2014
Totaal aantal isolaten	2563	2729	1269	1164
Top drie MLVA-complexen	MC8, MC5, MC45	MC5, MC8, MC45		
Totaal aantal MLVA-types	608	634	60	51
Top drie MLVA-types	MT1352, MT314, MT240	MT1352, MT491, MT314	MT398, MT569, MT572	MT398, MT572, MT569
Aantal PVL positive-isolaten	750 (29%)	703 (26%)	4 (0.3%)	7 (0.6%)
Aantal mecC-positieve isolaten	15 (0.6%)	20 (0.7%)		

19.5 MRSA-surveillance in 2015

In 2015 krijgt de stroomlijning van de MRSA-diagnostiek een vervolg. Hierbij wordt gefocust op twee hoofdpunten:

- In 2015 wordt geprobeerd om 50% van alle MRSA-isolaten in te zenden en te karakteriseren via het TypeNed MRSA-systeem.
- De *spa*-typering verdwijnt in 2015 en alle isolaten worden alleen met MLVA getypeerd.

Dit besluit wordt onderbouwd door een inmiddels ingediend manuscript, waarin de prestaties van *spa*-typering en MLVA vergeleken worden.

20 Surveillance van carbapenemresistente micro-organismen

Auteurs: Kim van der Zwaluw, Hester Bootsma

Betrokkenen: Hester Bootsma, Thijs Bosch, Han van der Heide, Fabian Landman, Martijn van Luit, Marga van Santen, Corrie Schot, Leo Schouls, Sandra Witteveen, Kim van der Zwaluw

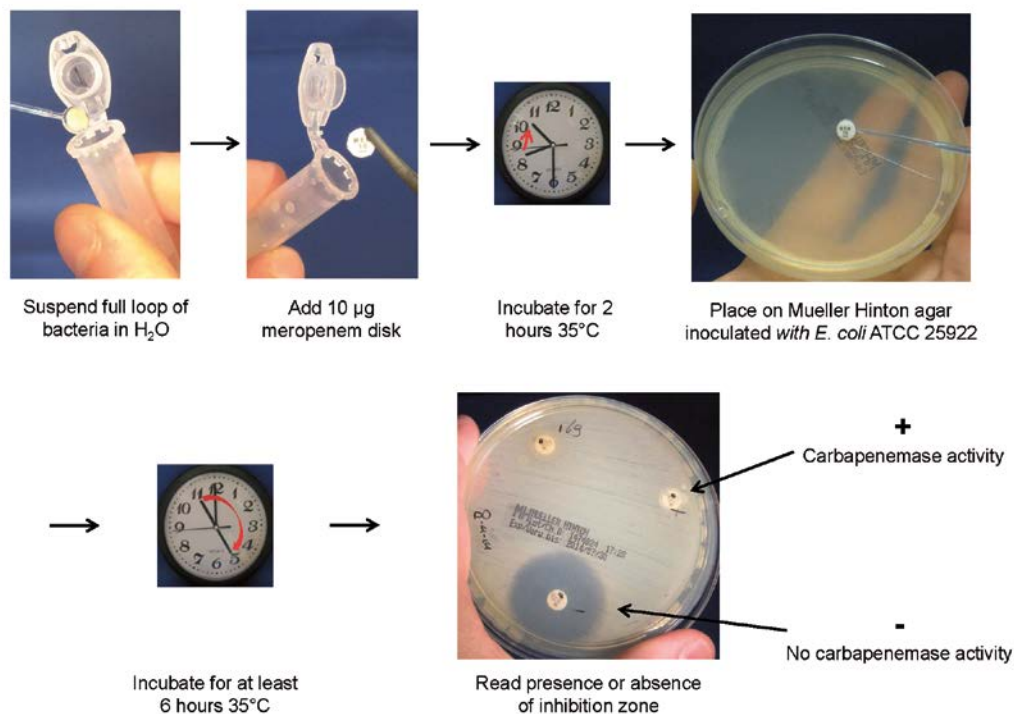
Contactpersoon: Hester Bootsma (hester.bootsma@rivm.nl)

Sinds 2011 loopt bij het Clb-IDS de nationale surveillance van carbapenemaseproducerende *Enterobacteriaceae* (CPE). De Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) heeft een richtlijn opgesteld voor de diagnostiek van mogelijk carbapenemase producerende micro-organismen. Volgens deze richtlijn moeten *Enterobacteriaceae* fenotypisch en genotypisch bevestigd worden als deze een meropenem-MIC van >0.25 mg/L of een imipenem-MIC van >1 mg/L hebben. Medisch microbiologische laboratoria kunnen kosteloos stammen insturen voor fenotypische en genotypische confirmatie. Naast *Enterobacteriaceae* kunnen ook andere carbapenemresistente micro-organismen (CRMO) worden ingestuurd. Dit zijn vooral non-fermenters (*Pseudomonas* spp. en *Acinetobacter* spp.). Daarom spreken we tegenwoordig liever van CRMO-surveillance.

Bij Clb-IDS, afdeling bacteriële surveillance en respons (BSR), komen de ingezonden isolaten binnen. Eerst wordt het bacteriespecies met MALDI-TOF bevestigd en de meropenem-MIC met de E-test.

De carbapenemase-activiteit wordt fenotypisch aangetoond met een in-house ontwikkelde test: de CIM (Carbapenem Inactivatie Methode). Hierbij wordt een disk met meropenem geïncubeerd in een suspensie van het te testen isolaat. Vervolgens wordt met een meropenemgevoelige stam (*Escherichia coli* ATCC 25922) bepaald of er nog werkzaam meropenem in de disk aanwezig is. Als de gevoelige stam ongehinderd kan doorgroeien tot aan de disk, is het testisolaat positief voor carbapenemase-activiteit (Figuur 1). Genotypische confirmatie gebeurt met een multiplex-PCR, gericht op de vijf meest voorkomende carbapenemasegenen: bla_{KPC} , bla_{NDM} , $bla_{OXA-48like}$, bla_{VIM} en bla_{IMP} .

Figuur 1. De Carbapenem Inactivatie Methode (CIM) stap voor stap



In het kader van de CRMOSurveillance zijn in 2014 ruim 700 isolaten ingezonden door 46 laboratoria. Net als in de twee voorgaande jaren behoorde de meerderheid van deze isolaten (55%) tot het genus *Pseudomonas* (Figuur 2). *Enterobacter* en *Klebsiella* zijn de meest frequent ingezonden *Enterobacteriaceae* (Figuur 2).

20.1 Fenotypisch versus genotypisch

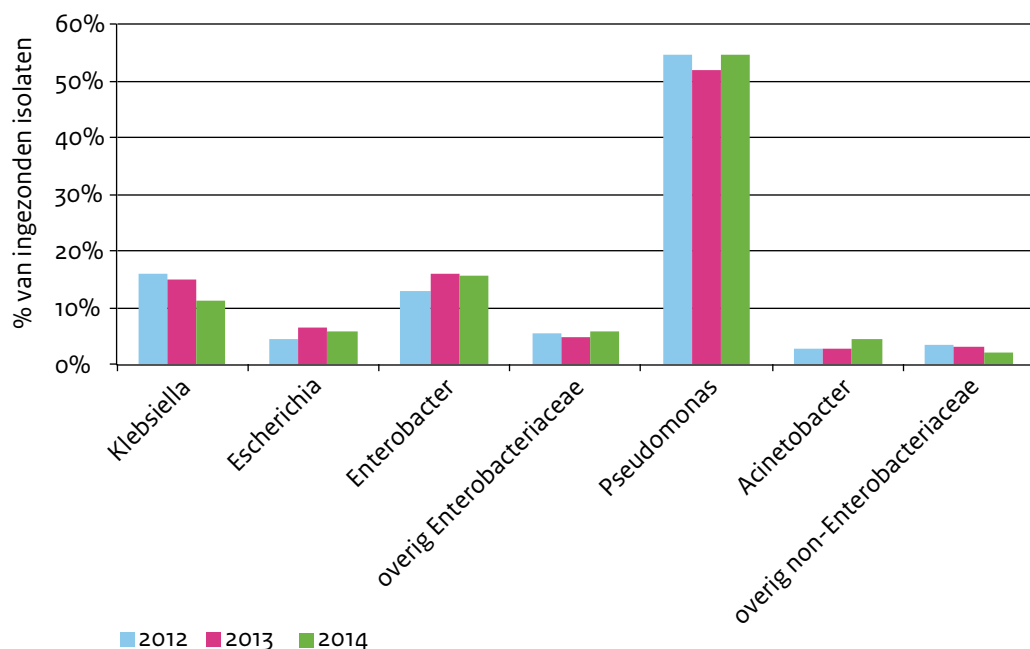
Met de CIM kon bij 28% van de isolaten fenotypisch carbapenemase-activiteit worden aangetoond.

Genotypisch is bij 21% van de ingezonden isolaten een van de vijf carbapenemasegenen aangetoond. In 2012 en 2013 was dit percentage respectievelijk 19% en 20%. Het meest gedetecteerde carbapenemase-gen is *bla*_{VIM} (10%), gevolgd door *bla*_{OXA-48like} (6%) (Figuur 3). Een verklaring voor de hogere prevalentie voor *bla*_{VIM} is dat dit gen vooral voorkomt bij *Pseudomonas*.

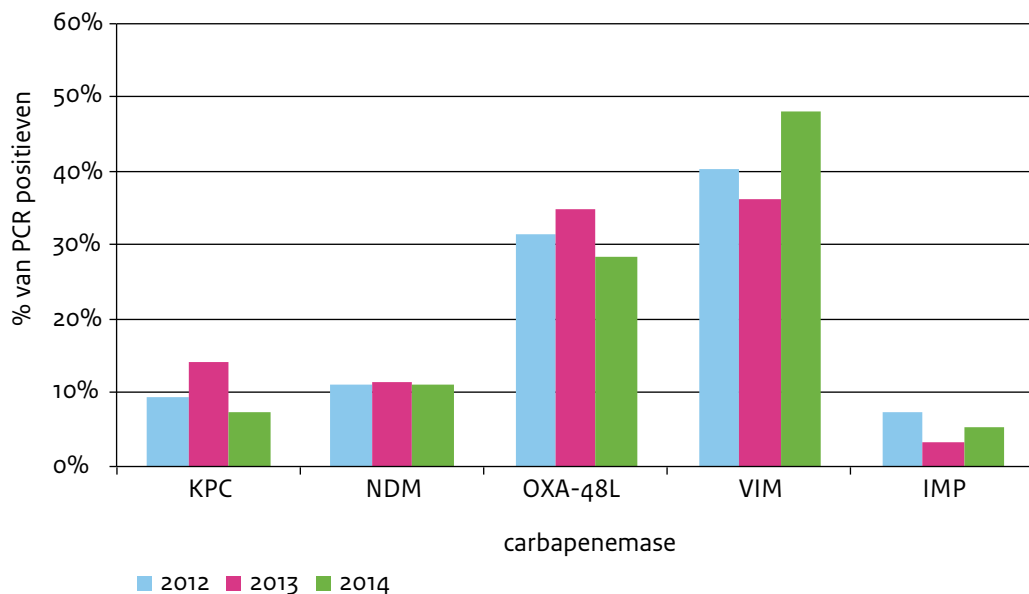
Er zijn dus meerdere isolaten gevonden die fenotypisch carbapenemase-activiteit vertoonden die we met de routinematig uitgevoerde PCR niet kunnen bevestigen. Om ook bij deze isolaten een carbapenemasegen aan te kunnen tonen passen we in de nabije toekomst de bestaande PCR aan. Daarmee is het mogelijk meer verschillende genvarianten te detecteren. Daarnaast wordt een additionele PCR geïntroduceerd om OXA-varianten aan te tonen. Deze komen vaker voor bij non-fermenters (o.a. *bla*_{OXA-23}).

Van de ingezonden *Enterobacteriaceae* had 31% een MIC-waarde boven het gevoelige bereik volgens EUCAST-richtlijnen ($S \leq 2$ mg/L), terwijl dit bij de non-fermenters voor 85% gold. Voor een groot deel van deze isolaten kon geen carbapenemase-activiteit aangetoond worden (42% van de *Enterobacteriaceae* en 71% van de non-fermenters). Dit wijst op andere resistentiemechanismen. Om dit beter in kaart te brengen zijn we in 2014 gestart met de analyse van isolaten met next-generation sequencing.

Figuur 2. Verdeling van de ingezonden genera in 2012 (totaal 702 isolaten), 2013 (872 isolaten) en 2014 (732 isolaten)



Figuur 3. Verdeling van de carbapenemasegenen aangetoond met PCR



20.1.1 Publicaties en referenties

Willemsen 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.' Infection Control & Hospital Epidemiology CJO 2015 doi:10.1017/ice.2014.76

21 Pneumokokken: niet alleen serotype, maar ook genotype kan van invloed zijn op de ernst van de ziekte

Auteurs: Karin Elberse en Gerlinde Pluister

Betrokkenen: Karin Elberse, Gerlinde Pluister

Contactpersoon: Karin Elberse (karin.elberse@rivm.nl)

Streptococcus pneumoniae veroorzaakt wereldwijd een hoge morbiditeit en mortaliteit. Vaccinatie van kinderen met geconjugeerde polysacharidevaccins is succesvol geïmplementeerd in veel landen. Het vaccin is gericht tegen de kapselpolysachariden van de pneumokok. Bekend is dat veranderingen in het genoom van de pneumokok kunnen ontstaan onder druk van vaccinatie. Dit kan leiden tot genetische varianten met een verschil in kapselgenen. Het is ook mogelijk dat er varianten ontstaan die complete kapselgenen of fragmenten daarvan hebben verworven door horizontale genoverdracht. Een resultaat kan zijn dat er pneumokokken ontstaan met veranderde kapselgenen in hun originele genetische achtergrond. Deze isolaten hebben dan een soortgelijke virulentie, maar reageren minder goed op het vaccin. Op deze manier kunnen zij de vaccindruk ondermijnen.

21.1 Nieuw genotype, hogere kans op meningitis

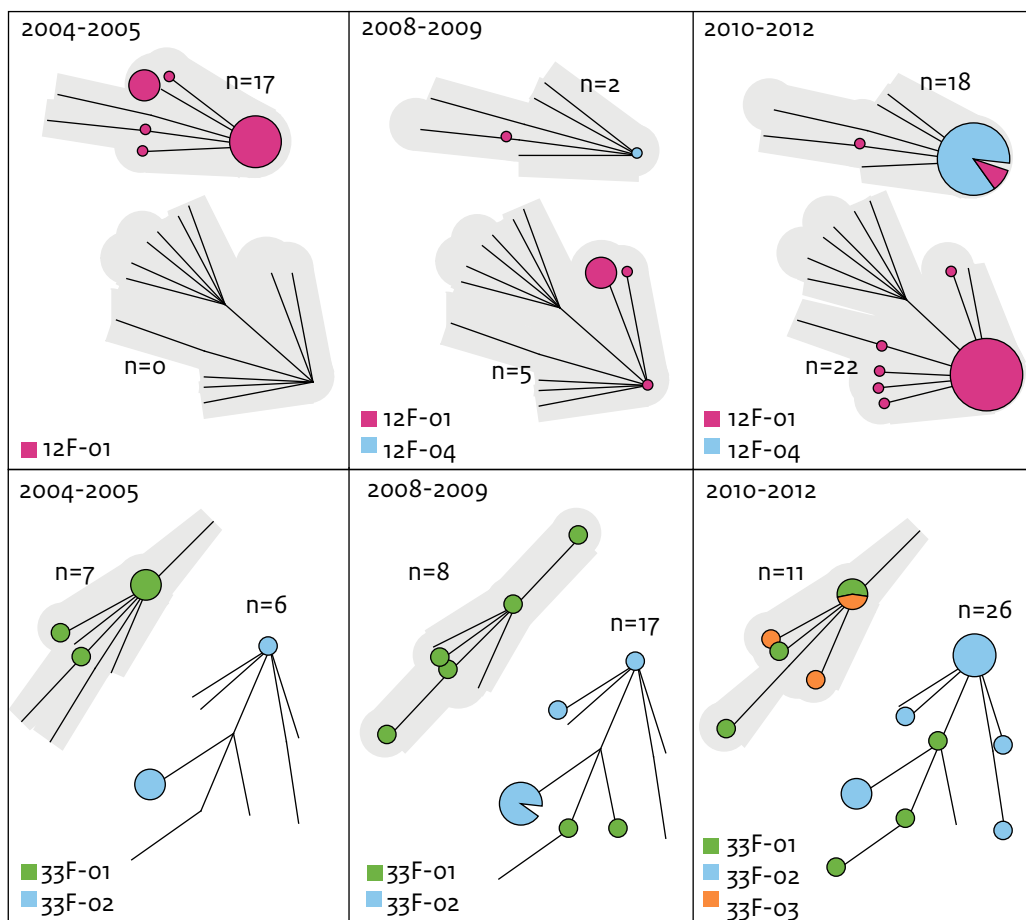
Om dit te onderzoeken is de pneumokokkenpopulatie van voor en na de invoering van het vaccin in het Rijksvaccinatieprogramma getypeerd. Hiervoor zijn een aantal typeermethoden gebruikt. Bij sommige serotypes wordt een verhoging van het aantal genotypes waargenomen. Na invoering van het vaccin zien we bijvoorbeeld meer genotypes van serotypes 12F en 33F. Dit verhoogt mogelijk de virulentie van het serotype. In Figuur 1 is de verschuiving van de genotypes per tijdperiode weergegeven. Een nieuw genotype van het serotype 12F blijkt een significant hogere kans op meningitis te geven. Hieruit blijkt dat niet alleen het serotype, maar ook de genetische achtergrond van een isolaat de ernst van de ziekte kan beïnvloeden.

21.2 Serotype 3

Virulentere isolaten binnen een opkomend serotype kunnen de niche opvullen die ontstaat door de vaccinatie. Een goed voorbeeld hiervan is serotype 3. Het genotype van de huidige serotype 3-isolaten verschilt in 15% van de stammen met het genotype van de Nederlandse pre-vaccinatie serotype 3-populatie. Deze nieuwe opkomende stammen lijken relatief meer pneumonie te veroorzaken, hoewel deze bevinding niet statistisch significant is. Serotype 3 is een belangrijk serotype om te monitoren. Dit serotype is niet opgenomen in het huidige vaccin en wordt steeds meer geïsoleerd bij invasieve ziekten.

De resultaten laten zien dat het relevant is om typeerdata te relateren aan klinische data. Dit is belangrijk om meer inzicht te krijgen in het effect van pneumokokkenvaccinatie op de pneumokokkenpopulatie.

Figuur 1. Minimum spanning tree van de MLVA-resultaten van serotypes 12F en 33F. De cirkels geven de MLVA-types aan en de grootte van de cirkels het aantal isolaten met hetzelfde MLVA-profiel. De lijnen tussen twee types geven een single-locusverschil aan. MLVA-complexen zijn weergegeven met grijze halo's. De kleuren geven verschillende kapseltypen aan binnen serotypes 12F of 33F



21.2.1 Publicaties en referenties

Elberse K, van Mens S, Cremers AJ, Meijvis SCA, Vlamincx B, de Jonge MI, *et.al.* 'Detection and serotyping of pneumococci in community acquired pneumonia patients without culture blood and urine samples.' Accepted for publication in BMC infectious diseases

22 De opkomst van vaccin-antigeendeficiënte *Bordetella pertussis*-stammen in Nederland: tijd voor maternale vaccinatie?

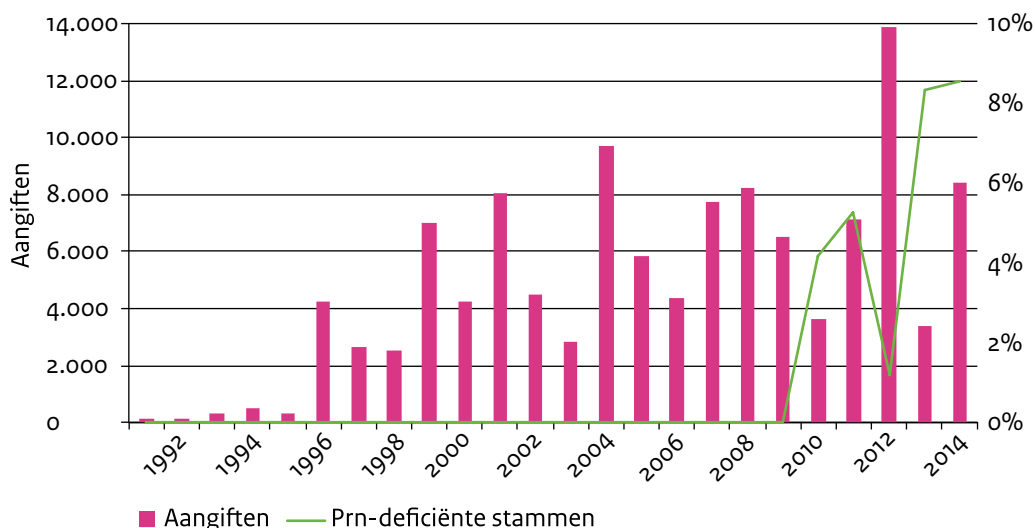
Auteur: Frits R. Mooi

Betrokkenen: Marjolein van Gent, Anne Zeddeman, Han van der Heide, Kees Heuvelman, Nicoline van der Maas

Contactpersoon: Marjolein van Gent (marjolein.van.gent@rivm.nl)

Kinkhoest neemt wereldwijd toe. In Nederland steeg het aantal kinkhoestgevallen in 1996 plotseling en sindsdien is er een trend zichtbaar van steeds hogere pieken van aangiften (Figuur 1). Twee belangrijke oorzaken voor de toename van kinkhoest zijn relatief snel wegebbende door vaccin geïnduceerde immuniteit en pathogeenadaptatie (Mooi FR *et.al.*, *Epidemiol Infect.* 2013;11-10). Bij de eerste oorzaak speelt het vervangen van helecelkinkhoestvaccins (HCV's) door a-cellulaire kinkhoestvaccins (ACV's) een rol. ACV's induceren een immuniteit die korter aanhoudt dan HCV's (Sheridan SL *et.al.*, *JAMA.* 2012;308(5):454-6). Het effect van kortdurende immuniteit wordt versterkt door pathogeenadaptatie.

Figuur 1. Het aantal aangiften en pertactine (Prn)-deficiënte stammen per jaar van 1991 tot en met 2014



Uit verschillende onderzoeken blijkt dat de veroorzaker van kinkhoest, *Bordetella pertussis*, zich stapsgewijs heeft aangepast aan vaccinatie (van Gent M *et.al.*, PLoS one. 2012;7(9):e46407, Octavia S *et.al.*, J Infect Dis. 2012;205(8):1220-4). Een van de adaptaties is antigene divergentie tussen circulerende en vaccinstammen. Daarnaast veranderde de genregulatie, waardoor de productie van pertussistoxine en een aantal andere virulentiefactoren werd verhoogd (Mooi FR *et.al.*, Emerg Infect Dis. 2009;15(8):1206-13, de Gouw D *et.al.*, PLoS One. 2014;9(1):e84523). Bij de meest recente adaptatie van *B. pertussis* is het gen voor pertactine (Prn) uitgeschakeld. Dit is één van de componenten van ACV's. Het RIVM deed onderzoek naar het voorkomen van Prn-deficiënte stammen in Europa (Zeddeman A *et.al.*, Euro Surveill. 2014;19(33). Dit was een samenwerking met een aantal Europese instituten, die is gesteund door het ECDC. Het onderzoek richtte zich op drie vragen:

- Is er een verband tussen de prevalentie van Prn-deficiënte stammen en het gebruikte vaccin?
- Is er sprake van de verspreiding van één bacteriestam of kloon, of is de mutatie meerdere keren (en in verschillende landen) ontstaan?
- Heeft het niet produceren van Prn een effect op vaccineffectiviteit?

22.1 Verband prevalentie Prn-deficiënte stammen en gebruikt vaccin

Bij dit onderzoek zijn zes landen betrokken: Denemarken, Finland, Nederland, Noorwegen, Zweden en het Verenigd Koninkrijk. Er zijn 576 stammen uit de periode 1996-2012 getypeerd op basis van "Single Nucleotide Polymorphisms" (SNP's) en door de Prn-productie te meten. Veertien van de 576 stammen (2.4%) waren Prn-deficiënt. In Denemarken, Finland en het Verenigd Koninkrijk zijn geen Prn-deficiënte stammen gevonden (Tabel 1). In Denemarken wordt een ACV gebruikt dat alleen pertussistoxine bevat. Daarom selecteert vaccinatie waarschijnlijk niet voor Prn-deficiënte stammen. Het percentage Prn-deficiënte stammen in de overige drie landen (Nederland, Noorwegen en Zweden) was respectievelijk 1%, 25% en 3%. Voor Nederland is het percentage Prn-deficiënte stammen ook bepaald in de jaren 2013 en 2014. De resultaten lieten een stijging zien van 4% in 2010 tot 9% in 2014 (Figuur 1). Vóór 2010 zijn geen Prn-deficiënte stammen in Nederland gevonden. De prevalentie van Prn-deficiënte stammen in de zes landen die in deze studie participeerden, is laag vergeleken met Australië (30%), Canada (18%), Frankrijk (14%), Japan (32%) en de Verenigde Staten (37%) (Lam C *et.al.*, Australia. Emerg Infect Dis. 2014;20(4):626-33, Tsang RS *et.al.*, Int J Infect Dis. 2014;28:65-9, Hegerle N *et.al.*, Clinical Microbiology & Infection. 2012;18(9):E340-6, Pawloski LC *et.al.*, Clinical and vaccine immunology: CVI. 2013).

Tabel 1. Het voorkomen van Prn-deficiënte stammen in diverse landen^a

Land	Jaar introductie ACV ^b	Periode onderzocht	Aantal stammen onderzocht	% Prn-deficiënt	Referentie
Australië	1997-2000	2008-2012	320	30%	Lam C. <i>et.al</i> , 2014
Canada	1997-1998	2012	348	18%	Tsang RS. <i>et.al</i> , 2014
Denemarken	1997	1996-2012	23	0%	Zeddeman A. <i>et.al</i> , 2014
Finland	2005	1996-2012	17	0%	Zeddeman A. <i>et.al</i> , 2014
Frankrijk	1998	2011	120	14%	Hegerle N. <i>et.al</i> , 2012
Japan	1981	2005-2009	57	32%	Otsuka N. <i>et.al</i> , 2012
Nederland	2005	1996-2012	311	1%	Zeddeman A. <i>et.al</i> , 2014
Noorwegen	1998	1996-2012	20	25%	Zeddeman A. <i>et.al</i> , 2014
Verenigd Koninkrijk	2005	1996-2012	18	0%	Zeddeman A. <i>et.al</i> , 2014
Verenigde Staten	1996	2010-2012	385	37%	Pawloski LC. <i>et.al</i> , 2013
Zweden	1996-1997	1996-2012	187	3%	Zeddeman A. <i>et.al</i> , 2014

^a. Landen onderzocht in het kader van de RIVM/ECDC studie zijn vetgedrukt.

^b. Jaar introductie primaire serie.

Het is problematisch om deze studies te vergelijken omdat verschillende perioden zijn onderzocht. Toch lijkt er een positieve relatie te zijn tussen het aantal jaren geleden dat het HCV vervangen werd door een ACV en het percentage Prn-deficiënte stammen. Zo'n relatie is goed te verklaren, want HCV's induceren een brede immuniteit tegen honderden antigenen. Het voordeel van het niet produceren van één antigeen is daardoor betrekkelijk klein. De meeste ACV's bevatten maar twee tot vijf antigenen en het niet produceren van één van deze componenten heeft een relatief groot (voor het pathogeen positief) effect. De overschakeling van HCV naar ACV heeft dus waarschijnlijk een rol gespeeld bij de opkomst van Prn-deficiënte stammen. Als deze aanname juist is, mogen we een verdere stijging van Prn-deficiënte stammen in Nederland verwachten. Een vraag die in de toekomst misschien beantwoord kan worden, is of het vijf-componenten-ACV beter in staat is de opkomst van Prn-deficiëntie te vertragen dan een drie-componenten-ACV.

22.2 Één bacteriestam/-kloon of meerdere keren gemuteerd?

De tweede vraag waarop wij ons richtten, was of er sprake is van één kloon die zich heeft verspreid over verschillende landen. Dit is al eerder geconstateerd met stammen die meer pertussis toxine produceren (Mooi FR *et.al.*, *Emerg Infect Dis.* 2009;15(8):1206-13). Uit DNA-sequentieanalyses van het Prn-gen bleek dat het gen op verschillende manieren was geïnactiveerd. Dit duidt op een polyclonale expansie (Zeddeman A *et.al.*, *Euro Surveill.* 2014;19(33)) en is bevestigd door een fylogenetische analyse op basis van SNP's. Deze laat zien dat Prn-deficiënte stammen voorkomen in verschillende takken van de boom (Figuur 2) (Zeddeman A *et.al.*, *Euro Surveill.* 2014;19(33)). Als mutaties meerdere keren en onafhankelijk van elkaar ontstaan (convergentie), duidt dat op een groot selectief voordeel, bijvoorbeeld doordat Prn-deficiënte stammen "resistenter" zijn tegen door vaccin geïnduceerde immuniteit, een aspect waar onze derde vraag zich op richtte.

22.3 Effect van Prn-deficiëntie op vaccinactiviteit

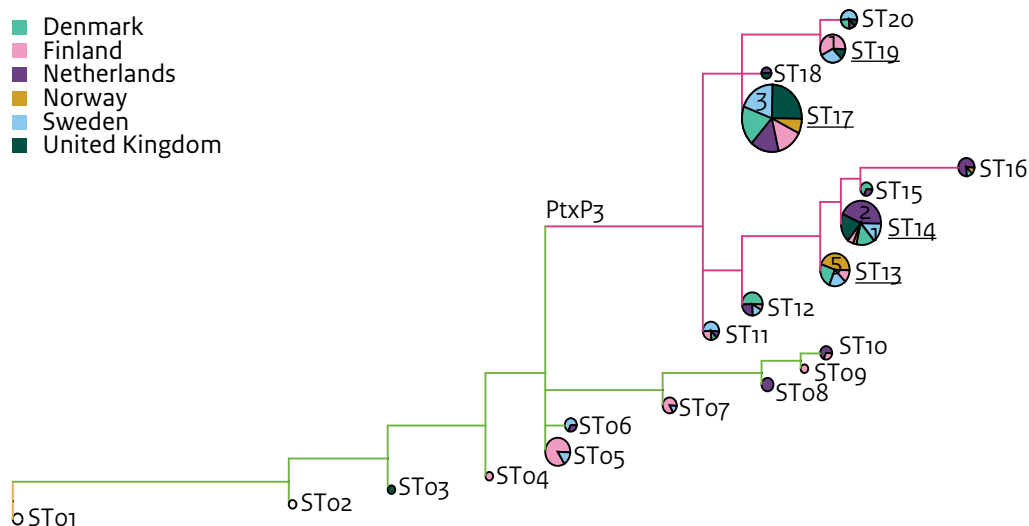
Studies in muis en mens suggereren inderdaad dat Prn-deficiëntie van invloed is op vaccineffectiviteit. In het muismodel toonden we aan dat Prn-deficiëntie de effectiviteit van ACV's vermindert, maar niet van HCV's (niet gepubliceerde resultaten). Voor dit onderzoek werkten we samen met het RadboudUMC.

Dit resultaat ondersteunt onze hypothese dat de overschakeling van HCV naar ACV een belangrijke rol heeft gespeeld in de opkomst van Prn-deficiënte stammen. Een Franse groep vond ook dat een ACV minder effectief was tegen Prn-deficiënte stammen, vergeleken met wildtype stammen (Hegerle N *et.al.*, *Vaccine.* 2014). Studies in de mens hebben aangetoond dat Prn-deficiënte stammen relatief vaker worden geïsoleerd uit patiënten die met een ACV zijn gevaccineerd dan uit niet-gevaccineerden. Ook dit ondersteunt de hypothese dat Prn-deficiënte stammen ACV-escapemutanten zijn (Martin SW *et.al.*, *Clin Infect Dis.* 2014).

22.4 Maternale vaccinatie

Het percentage Prn-deficiënte stammen is in Nederland nog betrekkelijk laag. Toch mogen we verwachten dat dit percentage (aanzienlijk) zal stijgen, gezien de trends in landen die ACV's al langer gebruiken. De opgaande trend in aangiften die sinds 1996 waarneembaar is, kan hierdoor verder versterkt worden. Niet of onvolledig gevaccineerde zuigelingen vormen de meest kwetsbare groep. Vooral voor deze groep is de toenemende circulatie van *B. pertussis* een gevaar. Tijdens de kinkhoestepidemie in het Verenigd Koninkrijk was de mortaliteit in deze groep 3% (Dabrera G *et.al.*, Clin Infect Dis. 2015;60(3):333-7). Maternale vaccinatie is een interventie die mogelijk deze dreiging op korte termijn kan afwenden. Uit Engelse studies blijkt dat maternale kinkhoestvaccinatie zeer effectief is en geen gevaar oplevert voor moeder of kind (Dabrera G *et.al.*, Clin Infect Dis. 2014, Amirthalingam G *et.al.*, Lancet. 2014;384(9953): 1521-8, Donegan K *et.al.*, BMJ. 2014;349:g4219).

Figuur 2. Genetische verwantschap tussen Prn-deficiënte stammen in zes Europese landen. De verwantschapsboom van *B. pertussis*-stammen, geïsoleerd in de periode 1998-2011, is gebaseerd op 113 SNP's. De grootte van de cirkels is gerelateerd aan het aantal stammen van dat SNP-type (ST). Gekleurde segmenten verwijzen naar het land waar de stammen zijn geïsoleerd. De locatie in de boom van Prn-deficiënte stammen is aangegeven door een onderstreept ST. Het aantal Prn-deficiënte stammen staat in het segment



22.4.1 Publicaties en referenties

Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman C, van der Heide H, Bart M, Advani A, *et.al.*

“Investigations into the emergence of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates in six European countries.” 1996 to 2012. Euro Surveill. 2014;19(33)

Bacteriële en parasitologische diagnostiek

23 Identificeren van hoogpathogene Gramnegatieve bacteriën met behulp van MALDI-TOF MS

Auteur: Amber Hendriks

Betrokkenen: Maaïke van den Beld, Airien Harpal, Maaïke de Vries, Frans Reubsaet

Contactpersoon: Amber Hendriks (amber.hendriks@rivm.nl)

Brucella species, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis* en *Yersinia pestis* zijn pathogene bacteriën die doorgaans niet endemisch zijn, maar wel als importgevallen kunnen voorkomen in Nederland. De hoge pathogeniciteit maakt snelle identificatie van deze bacteriën belangrijk.

MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) is een veel gebruikte techniek voor de identificatie van micro-organismen. Met deze massaspectrometrische techniek kan binnen een kwartier een eiwitprofiel gemaakt worden van een reinkweek van het te onderzoeken isolaat. Vervolgens wordt dit profiel vergeleken met een database om de identiteit van de desbetreffende bacterie te bepalen.

De meeste laboratoria hebben de massaspectrometer in een biosafety level 2 (BSL-2)-laboratorium staan, terwijl voor bovengenoemde bacteriën BSL-3-niveau vereist is. Om deze biologische agentia toch met de MALDI-TOF MS te kunnen analyseren, moeten de bacteriën afgedood zijn, voordat de MALDI-target de BSL-3-faciliteit verlaat.

Eerder is aangetoond dat de door de fabrikant voorgeschreven volledige eiwitextractie met mierenzuur (formic-acidextractie), met toevoeging van extra stappen voldoende afdoend werkt.

Voor de routinematige diagnostiek is het veiliger en sneller om op het BSL-3-laboratorium dezelfde standaardprotocollen (dus zonder toevoegingen) te hanteren. Hiermee worden fouten voorkomen die eventueel blootstelling tot gevolg hebben.

In dit onderzoek is gekeken of twee standaard MALDI-Biotyper-methoden op een veilige manier gebruikt kunnen worden voor het identificeren van hoogpathogene Gramnegatieve staven met MALDI-TOF MS. Bij de 'direct-transfermethode' worden intacte bacteriën geanalyseerd en bij de formic-acidextractie wordt een eiwitextract van de bacterie gemaakt.

In totaal zijn 110 hoogpathogene stammen met beide methoden getest. Het gaat om 42 *Brucella* species, 10 *Burkholderia mallei*, 22 *Burkholderia pseudomallei*, 18 *Francisella tularensis* en 18 *Yersinia pestis*. Daarnaast zijn genetisch verwante, minder pathogene stammen getest, namelijk twee *Ochrobactrum anthropi*, twee *Burkholderia thailandensis*, twee *Francisella philomiragia* en één *Yersinia pseudotuberculosis*.

Bij de direct-transfermethode is na het drogen van de α -cyano-4-hydroxykaneelzuur (HCCA)-matrix de spot geswabd met een steriele wattenstaaf die is bevochtigd met fysiologisch zout. Vervolgens is deze uitgestreken op een Columbia-schapenbloedagarplaat.

Om het aantal handelingen op een BSL-3-lab zo laag mogelijk te houden is de levensvatbaarheid bij de formic-acidextractie getest, nadat absolute ethanol is toegevoegd aan de waterige bacteriesuspensie. Van de suspensie is 25 µl op een Columbia schapenbloedagarplaat uitgestreken.

De minder pathogene bacteriën zijn gebruikt om uitzonderlijke omstandigheden te creëren en vervolgens te testen of de methoden voldoende afdodend werken. De volgende situaties zijn getest:

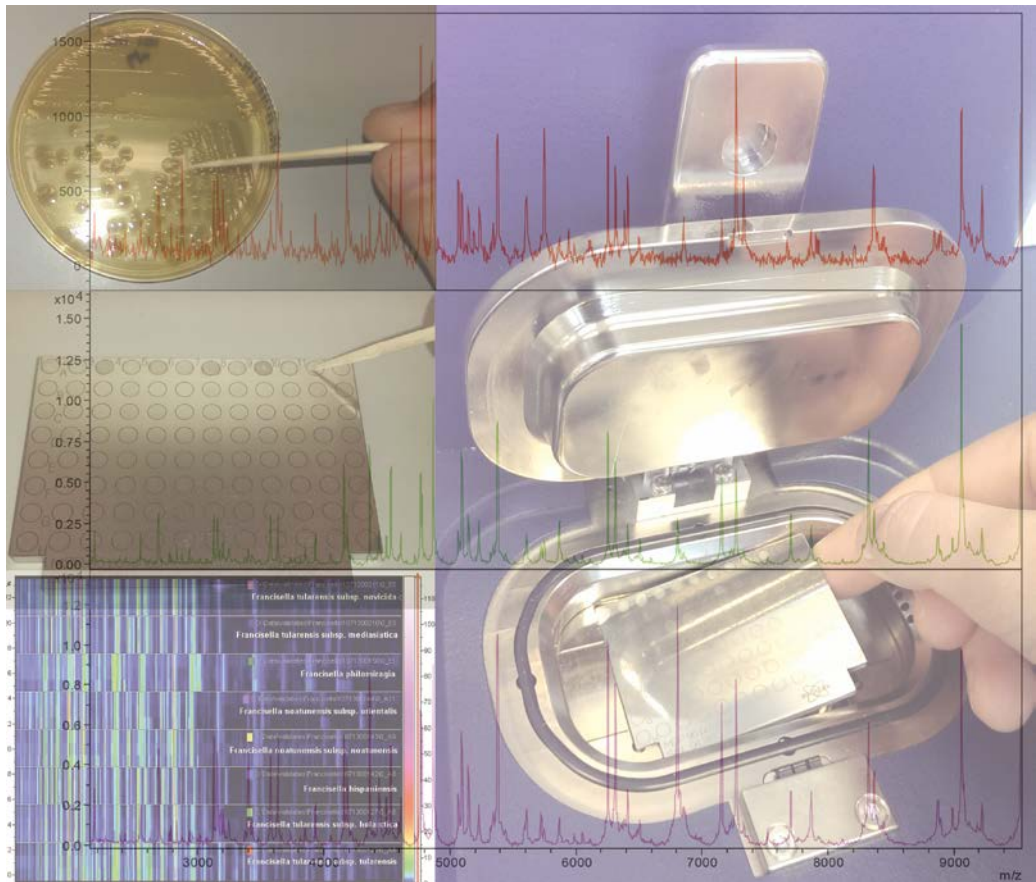
- Overmatig gebruik van bacterieel materiaal;
- Onvolledige suspensie van de bacterie in de extractiemix;
- Onvolledig bedekken van de spot met matrix.

Na minimaal 48 uur incubatie bij hun optimale groeitemperatuur zijn de platen gecontroleerd op groei.

Van de 110 stammen groeiden *Brucella species*, *Francisella tularensis* en *Yersinia pestis* niet meer na de formic-acidextractie of de direct-transfermethode. Vier verschillende *Burkholderia mallei*-stammen groeiden wel, waarvan twee na de direct-transfermethode. Opnieuw toevoegen van HCCA-matrix was voldoende om de laatste cellen af te doden. De groei van twee *Burkholderia mallei*-stammen na de extractiemethode is waarschijnlijk veroorzaakt door een slecht gemengde bacteriesuspensie. Nieuwe bacteriesuspensies werden wel afgedood door de extractiemethode. Een aantal van de genetisch verwante bacteriën groeide alleen na niet goed mengen of na gebruik van te veel bacteriecultuur bij de extractiemethode.

Zowel de formic-acidextractie als de direct-transfermethode kunnen veilig gebruikt worden voor het identificeren van hoogpathogene Gramnegatieve bacteriën met behulp van MALDI-TOF MS onder BSL-2-condities. Het is wel raadzaam om altijd een groeiconrole in te zetten, niet te veel bacteriecultuur te gebruiken en goed te controleren of de HCCA-matrix de hele spot bedekt.

Figuur 1. Werkwijze en resultaat MALDI-TOF MS



24 Parasieten: diagnostiek, trendanalyse en emerging infecties

Auteur: Jeroen Roelfsema

Betrokkenen: Titia Kortbeek, Nahid Nozari, Denise Hoek, Sietze Brandes

Contactpersoon: Jeroen Roelfsema (jeroen.roelfsema@rivm.nl)

Elk jaar ontvangt het Clb-IDS, afdeling bacteriële en parasitologische diagnostiek (BPD), bijzondere monsters om te bepalen welke parasiet in het materiaal aanwezig is. Het ingezonden materiaal varieert van stukjes wormlarve, proglottiden van lintwormen, feces met wormeneitjes of bipten van weefsel met ongebruikelijke infecterende organismen.

24.1 Vrijlevende amoeben

Typische voorbeelden van die laatste groep zijn vrijlevende amoeben. Dit zijn eencellige organismen die vrij in de natuur leven, zoals de term al aangeeft. Het zijn dus geen obligate parasieten. Bij toeval kan het organisme in het lichaam terechtkomen. Het gaat om diverse soorten van het genus *Acanthamoeba* en de soorten *Balamuthia mandrillaris* en *Naegleria fowleri*. Infecties met deze amoeben zijn zeer zeldzaam, maar toch gevreesd. Als de amoeben in de hersenen terechtkomen, zijn ze vrijwel onbehandelbaar en hebben ze de dood van de patiënt tot gevolg.

Naegleria fowleri komt in Nederland niet voor, maar *Acanthamoeba* sp. zijn wel veelvuldig aanwezig in Nederlands oppervlaktewater. *Acanthamoeba* sp. veroorzaken vaak infecties van het hoornvlies. Het Clb-IDS, afdeling BPD, krijgt met enige regelmaat monsters binnen van hoornvliesschraapsel of lensvloeistof om de aanwezigheid van *Acanthamoeba* sp. te testen. Een infectie met *Acanthamoeba* sp. in hersenen hebben wij nog niet gezien.

Twee jaar geleden ontvingen we echter een hersenbiopt van een overleden patiënt met een groot hersenabces. De inzender toonde de aanwezigheid van *Balamuthia mandrillaris* aan. We werden verzocht om de diagnose te bevestigen. Wij hebben dit materiaal getest met drie verschillende PCR's en *Balamuthia mandrillaris* werd inderdaad aangetoond. Dit is de eerste patiënt in Nederland bij wie deze infectie is vastgesteld. Het bijzondere is dat de patiënt niet in het buitenland is geweest.

In 2014 ontvingen we een vergelijkbaar verzoek van het Havenziekenhuis in Rotterdam. Ook hier ging het om een patiënt, overleden aan een infectie in de hersenen. De behandelende artsen dachten aan een vrijlevende amoebe. Het bleek ook nu weer te gaan om *Balamuthia mandrillaris*.

Van beide patiënten is het niet duidelijk hoe zij de infectie hebben opgelopen. De patiënt uit Rotterdam was in tegenstelling tot de eerste patiënt regelmatig buiten Europa, vooral in West-Afrika.

24.2 Wormen

Naast verzoeken om een amoebe aan te tonen of uit te sluiten ontvangt het Clb-IDS regelmatig verzoeken voor identificatie van 'wormen'. Het Havenziekenhuis zond bijvoorbeeld een vis in met een stukje worm daarin (Figuur 1). De vis was al gedeeltelijk geconsumeerd. De worm bleek eigenlijk een larve van de kabeljauwworm, *Pseudoterranova* sp. Deze rondworm behoort tot dezelfde groep wormen waar ook de spoelworm *Ascaris* sp. en de aarsmade *Enterobius vermicularis* toe behoren. De kabeljauwworm is de naaste verwant van de haringworm, *Anisakis* sp. Het verschil tussen beide wormlarven is de kleur: *Pseudoterranova* sp. is veel bruiner dan *Anisakis* sp. Voor een volledige determinatie is DNA-onderzoek uitgevoerd. Op basis van sequentieanalyse van de ITS1-sequentie is het mogelijk de meeste rondwormen benoemen.

Het is belangrijk om het onderscheid te maken tussen *Pseudoterranova* sp. en *Anisakis* sp. *Anisakis* sp., de haringworm, kan zich nestelen in de maagwand en daar voor veel last zorgen. Behandeling bestaat uit endoscopisch/chirurgisch verwijderen van de larve. Dankzij deze worm kent Nederland een haringwet, die eist dat alle haring vóór de verkoop eerst bevroren moet zijn geweest. Bevriezing is afdoende om de larven te doden. De meeste visparasieten die wij vinden, zijn *Pseudoterranova* sp. die onder andere in kabeljauw voorkomt. Van *Pseudoterranova* sp. is niet bekend dat hij in de maagwand nestelt en de wormenlarven zijn waarschijnlijk weinig pathogeen. Om infecties te voorkomen is het belangrijk dat de vis goed wordt bereid. In het Rotterdamse geval is de halfgare vis uitgespuugd en werd de nog bewegende worm uit de vis geplukt om uiteindelijk bij het RIVM terecht te komen.

Een van de bijzondere materialen die wij in 2014 hebben ontvangen, is een worm uit de feces van een patiënt die al herhaaldelijk was behandeld voor een *Ascaris*-infectie. De worm determineerden wij macroscopisch als een doodgewone regenworm (Figuur 2). Verder DNA-onderzoek werd niet nodig geacht. De regenworm is vrij gemakkelijk te herkennen. Regenwormen zijn niet verwant aan parasitaire rondwormen. Rondwormen zijn heel mooi glad aan de buitenkant en vertonen volstrekt niet de typische segmentatie van de regenworm en bewegen ook anders. Een regenworm heeft een soort peristaltische beweging, terwijl de *Ascaris* zwiept. Het is niet duidelijk of het een serieuze aanvraag is of dat het gaat om een (dure) grap.

Figuur 1. Kabeljauw met larve van *Pseudoterranova* sp. (foto Frits Fransen)



Figuur 2. Regenworm, ingestuurd met verzoek voor determinatie (foto Denise Hoek-van Deursen)



24.3 Voedsel- en wateroverdraagbare parasieten (Food and Waterborn Parasites FWBP)

Auteur: Titia Kortbeek

Betrokkenen: Nahid Nozari, Denise Hoek, Sietze Brandes en Jeroen Roelfsema

Contactpersoon: Titia Kortbeek (titia.kortbeek@rivm.nl)

Voedseloverdraagbare parasieten staan steeds meer in de belangstelling bij ECDC en WHO, mede door toegenomen belangstelling wereldwijd voor voedseloverdraagbare parasieten. In 2012 is een expertmeeting georganiseerd door de FAO/WHO. Hierbij is een geselecteerde lijst van 26 parasieten geprioriteerd op hun belang voor de volksgezondheid en mogelijkheden voor risicobeheer (<http://www.fao.org/3/a-i3649e.pdf>).

Een delegatie van het Clb nam samen met Edzart Bruinier (veterinair en senior officer veterinary products NVWA) in maart 2014 deel aan een pilotcursus van het ECDC: *ECDC/WHO workshop on Diagnostics and public health surveillance, prevention and control of foodborne parasites: A pilot multidisciplinary training jointly organised by ECDC, WHO Regional office for Europe and the WHO Global Foodborne Infections Network (GFN)*. De zes voedsel- en wateroverdraagbare parasieten (FWBP) die in deze pilot workshop aan bod kwamen, zijn allemaal zoönosen: *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Toxoplasma*, *Echinococcus multilocularis*, *Echinococcus granulosus* en *Trichinella*. De parasitologen van het RIVM-Clb (Clb-Z&O en Clb-IDS) werken aan deze zes parasieten, onder andere aan de verbetering van de detectie- en typeermethoden van humane echinococcose (Stijns C *et.al.* Euro Surveill. 2013 Apr 11;18(15):20448).

Door een verheffing van het aantal cryptosporidiumgevallen in 2012 (Fournet N *et.al.* Euro Surveill. 2013 Jan 10;18(2)) werd onderzoek verricht naar een versnelde methode om *Cryptosporidium* te typeren. Daarnaast is in 2013 een Clb-Cryptosporidiumproject gestart dat loopt tot en met 2015. Vanuit het ECDC is in 2014 het project *Inventory of national surveillance system for food- and waterborne parasitic diseases in the EU/EEA* gestart. Om dit inhoudelijk te ondersteunen is een expertpanel gevormd, waarvoor onder anderen Titia Kortbeek is uitgenodigd. De startbijeenkomst vond plaats op 26-27 mei 2014 in Stockholm. Het expertpanel is gevraagd commentaar te leveren op een uitgebreide enquête over vijf FWBP's. Het is de bedoeling deze enquête in 2015 naar Europese lidstaten te sturen.

Wetenschappelijk/inhoudelijk is een bijdrage geleverd aan het Vijfde Internationale Congres Crypto&Giardia in Uppsala. Hier zijn onder andere de eerste resultaten van het Clb-Cryptosporidiumproject bediscussieerd. Daarnaast kwam de deelname aan de COST Action Euro-FBP aan de orde. Deze COST Action (Cooperation in Science and Technology, ingediend door Dr. Lucy Robertson; zie http://www.cost.eu/COST_Actions/fa/Actions/) is in de loop van 2014 gehonoreerd en gaat in 2015 van start. COST is bedoeld om een netwerk te creëren, zodat coördinatie van nationale onderzoeken op een Europees niveau mogelijk wordt. Zowel Joke van der Giessen (Clb-Z&O) als Titia Kortbeek (Clb-IDS) nemen hieraan deel. Dit geldt ook voor een andere COST Action (TD 1302 CYSTINET, European Network on Taeniosis/Cysticercosis), met als trekker Dr. Sarah Gabriel uit Antwerpen (<<http://www.cystinet.org/>>).

In november 2014 is een werkbezoek gebracht aan Parijs, waarbij samenwerking is gestart op het gebied van *Cryptosporidium* met de groep van collega Loic Favennec (Rouen, Frankrijk). Er zijn verschillen tussen *Cryptosporidium*-stammen die in Frankrijk en Nederland worden gevonden. Daarom is ook met de groep van Rachel Chalmers in Swansea (UK) samenwerking gezocht en wisselen we DNA uit.

In de kinderdagverblijfstudie (KIZSS-studie) is ook de prevalentie van een aantal voedsel- en wateroverdraagbare parasieten onderzocht (*Cryptosporidium* en *Giardia*). Ook zijn de kosten en de ziektelast die deze parasieten veroorzaken in kaart gebracht.

24.3.1 Publicaties en referenties

- Enserink R, van den Wijngaard C, Bruijning-Verhagen P, van Asten L, Mughini-Gras L, Duizer E, *et.al.* "Gastroenteritis Attributable to 16 Enteropathogens in Children Attending Day Care. Significant Effects of Rotavirus, Norovirus, Astrovirus, *Cryptosporidium* and *Giardia*." *Pediatr Infect Dis J.* 2014 Jun 30. [Epub ahead of print]
- Enserink R, Scholts R, Bruijning-Verhagen P, Duizer E, Vennema H, de Boer R, *et.al.* "High detection rates of enteropathogens in asymptomatic children attending day care." *PLoS One.* 2014 Feb 24;9(2)
- Mangen MJ, Bouwknegt M, Friesema IH, Haagsma JA, Kortbeek LM, Tariq L, *et.al.* "Cost-of illness and disease burden Ranking of food-related pathogens in the Netherlands in 2011." *Int J Food Microbiol.* 2015 Mar 2;196:84-93

25 Mycobacteriën

Auteurs: Rina de Zwaan en Miranda Kamst

Betrokkenen: Tridia van der Laan, Mimount Enaimi, Arnout Mulder, Rina de Zwaan, Jessica de Beer, Miranda Kamst en Dick van Soolingen

Contactpersoon: Miranda Kamst en Dick van Soolingen (miranda.kamst@rivm.nl en dick.van.soolingen@rivm.nl)

25.1 *Mycobacterium tuberculosis*-complex

Het Clb-IDS verricht al tientallen jaren de secundaire diagnostiek van tbc. In het bijzonder worden de identificatie, resistentiebepalingen en epidemiologische typeringen van *Mycobacterium tuberculosis*-complex door het Clb-IDS uitgevoerd.

25.1.1 Overzicht 2013

In 2013 zijn landelijk 848 patiënten met tuberculose gemeld. Het aantal meldingen vertoont een dalende trend.

Het aantal tbc-patiënten in Nederland is in de laatste tien jaar met 38% gedaald.

Tuberculose komt in Nederland vaker voor bij personen die geboren zijn in het buitenland (74%).

Bij 11.3% van de kweekbevestigde tbc-patiënten is er een zekere vorm van resistentie vastgesteld. In 5.4% van de gevallen ging het om isoniazideresistentie en 2.8% van de stammen bleek multiresistent (MDR; Resistentie voor zowel INH als rifampicine). In totaal zijn dat zeventien MDR-patiënten.

25.1.2 Voorlopig overzicht 2014

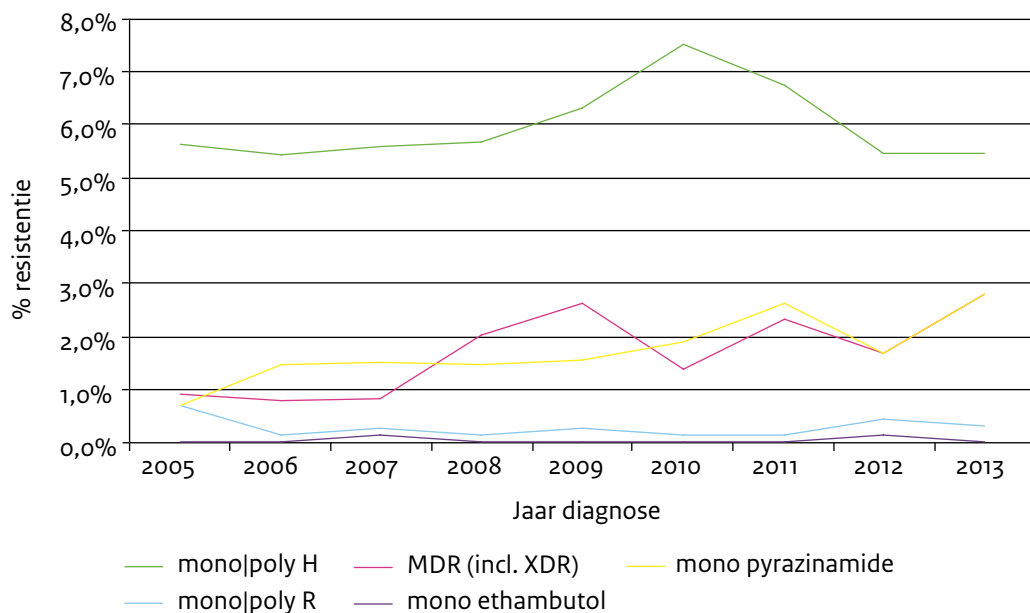
Tot nu toe zijn er in 2014 832 patiënten gemeld in het Nationale Tuberculose Register (NTR).

In 2014 is voor 382 *M. tuberculosis*-complexkweken een resistentiebepaling voor eerstelijns-middelen uitgevoerd (isoniazide, ethambutol, rifampicine en pyrazinamide).

Ruim 12% van deze kweken vertoonde een vorm van resistentie. Bij vijf patiënten werd de infectie veroorzaakt door een MDR.

Ter ondersteuning van bronopsporings- en contactonderzoek van de GGD zijn 517 moleculaire typeringen met Variable Number of Tandem Repeat (VNTR) uitgevoerd. De uitslagen zijn aan de aanvragers en aan de GGD'en doorgegeven. (Referentie: Tuberculose in Nederland 2013, Surveillancerapport. KNCV en RIVM.)

Figuur 1. Trend van resistentie tegen antibiotica (Opmerking: Poly H is resistentie tegen isoniazide en tegen een of meerdere van de andere antibiotica, geen MDR)



25.2 Non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM)

Naast de standaard secundaire diagnostiek voor *Mycobacterium tuberculosis*-complex werkt Clb-IDS ook aan de non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM). Deze staan ook bekend als de atypische mycobacteriën of MOTT (Mycobacteria other than tuberculosis).

Naast de *M. tuberculosis*-complexgroep en de *M. leprae* zijn de NTM's misschien wel de minst bekende mycobacteriën. Toch bestaat deze groep uit verreweg de meeste species binnen de mycobacteriën. Op dit moment zijn 160 mycobacteriële species bekend, waarvan er ongeveer 150 behoren tot de NTM's. Deze zijn officieel beschreven volgens de 'List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature'.

NTM's zijn opportunistische milieubacteriën, die voorkomen in aarde en water. Ook in het water van de Garra rufa-baden, beter bekend als baden met knabbelvisjes in spa-baden. In samenwerking met het Clb-Z&O is het water van verschillende Garra rufa-baden bacteriologisch onderzocht. Hierbij zijn verschillende Rapid Growing Mycobacteria (RGM) aangetoond. Het ging om bekende species (bekend van de routinepatiëntendiagnostiek), maar ook meer exotische of zelfs geheel nieuwe species.

NTM's worden soms geïsoleerd uit patiëntenmateriaal. Het kan dan gaan om een verontreiniging zonder klinische betekenis, maar ook om een verwekker van een infectie. NTM's kunnen bij zowel patiënten met een verminderde weerstand als bij immuuncompetente patiënten zorgen voor milde tot ernstige infecties. Het ziektebeeld wisselt van longaandoeningen die veel van TB weg hebben, tot algemene infecties die karakteristiek zijn voor patiënten met een verminderde weerstand. Denk hierbij aan AIDS-patiënten of patiënten die een orgaantransplantatie hebben ondergaan. Een andere typische infectie die een NTM kan veroorzaken is een geïnfecteerde lymfeklier; dit komt bijvoorbeeld voor bij kinderen. Mensen met een aquarium kunnen huidinfecties krijgen (zwemmersgranuloom).

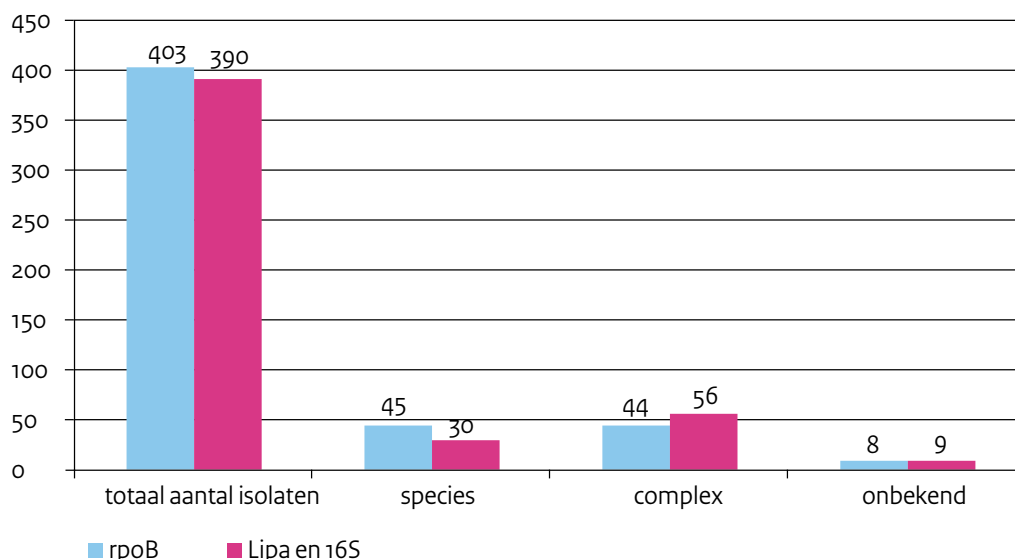
Ook bij patiënten met chronische ziekten zoals COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) worden deze NTM's steeds vaker geïsoleerd. Dit is mede te danken aan een betere diagnostiek, zoals de INNO-LiPA. Dit is een veel gebruikte methode voor de identificatie van NTM's. Deze snelle techniek maakt het mogelijk om binnen een dag een NTM te identificeren. Mede dankzij de betere diagnostiek stijgt het aantal NTM-species nog steeds.

Met zoveel (on)officiële species is het niet verwonderlijk dat probe-technieken, zoals de LiPA, niet 100% specifiek zijn en daardoor meerdere species dezelfde naam krijgen. Een beter discriminerend vermogen is mogelijk te bereiken met sequencing van de huishoudgenen. De gouden standaard is 16S rRNA. Van alle officieel erkende species is deze sequentie bekend. Toch is het ook hiermee niet altijd mogelijk om de verschillende NTM-species te onderscheiden. Vooral bij de Rapid Growing Mycobacteria (RGM) is dit het geval. In de literatuur wordt aangeraden om andere huishoudgenen zoals *hsp65*, *ITS* en *rpoB* te gebruiken. Vooral *rpoB* geeft bij RGM een goed discriminerend vermogen.

Over een periode van ruim één jaar zijn 455 NTM-isolaten naar Clb-IDS ingestuurd voor identificatie. Deze zijn getest met onze standaardtest INNO-LiPA en eventueel 16S rRNA-sequentiebepaling.

Daarnaast zijn de isolaten getest met de *rpoB*-sequencingmethode. Bij de combinatie LiPA en 16S rRNA zijn 390 isolaten geïdentificeerd als dertig verschillende species, 56 isolaten tot op complexniveau en negen zijn onbekende mycobacteriespecies. Op basis van *rpoB*-sequencing was het mogelijk de verschillende NTM's beter te onderscheiden. Met deze methode zijn 403 isolaten geïdentificeerd als 45 verschillende species. Tot op complexniveau zijn 44 isolaten geïdentificeerd en acht isolaten zijn onbekende mycobacteriespecies (Figuur 2).

Figuur 2. NTM-speciesdifferentiatie met verschillende identificatiemethoden



Hoewel DNA-probes, zoals de LiPA, snel en vaak goed de species (groep) identificeren, heeft sequencing van huishoudgenen de voorkeur.

De klinische significantie is afhankelijk van klinisch beeld, het aantal positieve kweken en de identificatie van de mycobacteriën. Een goede identificatie van NTM's is belangrijk, omdat de resistentieprofielen van verschillende NTM's verschillen. Deze gegevens zijn nodig om een goed behandelplan op te stellen.

25.2.1 Publicaties en referenties

de Zwaan R, van Ingen J, van Soolingen D. "Utility of rpoB gene sequencing for identification of nontuberculous mycobacteria in the Netherlands." 2014 Journal of clinical microbiology 52:2544-2551

Schets FM, van den Berg HHJL, de Zwaan R, Swaan CM, Oomen T, van Soolingen D, *et.al.* "Gezondheidsrisico's van baden met knabbelvisjes (of: Hoe gezond zijn baden met knabbelvisjes?)." Infectieziekten Bulletin jaargang 25 nummer 4, april 2014: 102-107

26 Tuberculose; samenwerking met WHO

Auteur: Kristin Kremer

Betrokkenen: Tuberculoseprogramma van het regionale hoofdkantoor voor Europa van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO), Kopenhagen, Denemarken

Contactpersoon: Kristin Kremer (kristin.kremer@rivm.nl)

26.1 Detachering bij de WHO

Van april 2011 t/m december 2013 was Kristin Kremer gedetacheerd bij het regionale hoofdkantoor voor Europa van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) te Kopenhagen, Denemarken. Ze werkte daar bij het Tuberculoseprogramma als wetenschapper voor antimicrobiële resistentie en het tuberculose (TB)-laboratoriumnetwerk. Zij bekeek bij de WHO het tuberculoseprobleem vanuit een ander perspectief dan gedurende haar tijd bij het TB-laboratorium van het Clb-IDS. Ze heeft veel geleerd over het gezondheidssysteem in Oost-Europa. Ze bezocht voor WHO twintig landen, voornamelijk in Oost-Europa en Centraal-Azië. Daarnaast leverde ze een bijdrage aan de optimalisatie van de tuberculosediagnostiek en de nationale tuberculuselaboratoriumnetwerken, stimulatie van operationeel onderzoek en coördinatie van nationale TB-resistentiesurveys. Ze speelde een belangrijke rol in de oprichting van het Europese tuberculuselaboratoriuminitiatief (ELI) van de WHO in 2012. Het doel van ELI is om de laboratoriumactiviteiten in de Europese regio te coördineren en stimuleren, vooral in de 18 'hoge prioriteitslanden voor TB'. Dit initiatief wordt de komende jaren voortgezet.

26.2 Tuberculose in de WHO Europese Regio

De WHO Europese regio bestaat uit 53 landen in West-Europa, de voormalige Sovjetrepublieken en de Kaukasus. Volgens de laatste schatting van de WHO in 2014 waren er in 2012 in deze regio 353.000 tuberculosegevallen waarvan er naar schatting 76.400 multiresistent (MDR) waren. Meer dan 35.000 mensen overleden aan TB in 2012. In de WHO Europese regio bevinden zich vijftien van de 27 landen met het hoogste TB-resistentieniveau in de wereld. In 2012 was het MDR-TB-percentage in deze regio onder nieuwe gevallen 15% en onder eerder behandelde gevallen 47%. Omdat de detectie van MDR-TB in die regio op praktische problemen stuit, werd geadviseerd om moleculaire sneltesten voor de detectie van MDR-TB te implementeren. Ook zijn adviezen gegeven over het optimaliseren van TB-laboratoriumnetwerken en nationale TB-programma's. Het doel hiervan was onder andere om de snelle diagnose van MDR-TB op te schalen.

Figuur 1. Tuberculosepatiënten in een longziekenhuis in Zuidwest-Roemenië dat bezocht werd door het internationale reviewteam van het Nationale TB-programma van Roemenië, maart 2014



26.3 Afronding eerste cursus operationeel onderzoek voor Oost-Europa

Tijdens Kristins detachering bij de WHO werkte zij ook aan het opzetten en organiseren van de eerste SORT-IT-cursus voor Oost-Europa. SORT-IT staat voor Structured Operational Research and Training Initiative. Dit is een samenwerking tussen WHO, MSF (Médecins Sans Frontières) en de Union (International Union Against Tuberculosis and Lung Diseases).

De cursus bestaat uit drie modules van een week;

1. Operational research;
2. Databasedesign/-analyse;
3. Manuscript schrijven.

Tijdens de eerste twee modules van de cursus werkt elke deelnemer een studieprotocol en analyseplan uit. Dit doen zij onder begeleiding van twee mentoren. De manuscripten schrijven zij tijdens de laatste module (ongeveer driekwart jaar later). Tijdens deze eerste ronde van SORT-IT/Oost-Europa werd in het Engels les gegeven. Daardoor was het alleen mogelijk om twaalf onderzoekers te selecteren die naast Russisch ook Engels verstonden. Alle lesmaterialen waren ter ondersteuning ook in het Russisch vertaald. Van deze twaalf onderzoekers zijn er vier geselecteerd die hulpmentor mogen zijn in de volgende cursus. Het doel is mentoren op te leiden die in de toekomst de cursus in het Russisch kunnen geven.

De vier studenten waar Kristin mentor van was, hebben de cursus succesvol afgerond en hun artikelen zijn gepubliceerd in *Public Health Action*.

Het beschreven onderzoek betreft:

- De eerste nationale tuberculoseresistentiesurvey in Azerbeidzjan (Alikhanova *et.al.* 2014);
- Tuberculose in gezondheidswerkers in Wit-Rusland (Klimuk *et.al.* 2014).
- M/XDR-TB in Letland (Kuksa *et.al.* 2014).
- Moleculaire epidemiologie van tuberculose in Estland (Toit *et.al.* 2014).

26.4 Evaluatie van het Nationale Tuberculoseprogramma in Roemenië

In maart 2014 maakte Kristin deel uit van het internationale reviewteam van het Nationale TB programma van Roemenië, dit op uitnodiging van de WHO. De evaluatie was gezamenlijk georganiseerd door WHO/EURO en het ECDC. Roemenië heeft de hoogste incidentie van TB in de Europese Unie (EU)/European Economic Area (EEA), en draagt voor een kwart bij aan de TB-last in de EU/EEA. Het evaluatieteam erkende het hoge detectiepercentage en het behandelingsucces onder patiënten met gevoelige vormen van TB. Daarnaast wees het team op het grote aantal patiënten met MDR-TB dat niet wordt gedetecteerd of slecht wordt behandeld. Het team stelde vast dat de belangrijkste uitdagingen op programmaniveau en op gezondheidssysteemniveau moeten worden aangepakt. De veertien belangrijkste aanbevelingen zijn aan het einde van de evaluatie aangeboden aan het ministerie van Volksgezondheid en het Nationale TB-programma. Inmiddels is het uitgebreide rapport openbaar beschikbaar (de Colombani *et.al.* 2015).

26.4.1 Publicaties en referenties

- Ahmedov S, Blondal K, Hasanova S, Hofman H, Hovhanessyan A, Kremer K, *et.al.* (Edited by: Dara M, Van den Boom M, Hasanova S, Mkrtchyan Z). 2014. "Extensive review of tuberculosis prevention, control and care in Tajikistan, 15–24 July 2013". World Health Organization; Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2014
- Ahmedov S, Danilovits M, Dara M, Djumaliyeva G, Eramova I, Goyon C, *et.al.* (Edited by: Dara M, Gozalov O and Turusbekova N). 2014. "Extensive review of tuberculosis prevention, control and care in Kazakhstan, 10–16 May 2012." World Health Organization; Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2014
- Alikhanova N, Akhundova I, Seyfaddinova M, Mammadbayov E, Mirtskulava V, Rüsç-Gerdes S, *et.al.* 2014. Public Health Action 4 (3): S17–S23. (*Also published in Russian*)
- Dara M, Acosta CD, Rusovich V, Zellweger JP, Centis R, Migliori GB *et.al.* 2014 "Bacille Calmette-Guérin vaccination: the current situation in Europe." *Eur Respir J.* 43(1):24-35. doi: 10.1183/09031936.00113413
- Klimuk D, Hurevich H, Harries AD, Babrukevich A, Kremer K, Van den Bergh R, *et.al.* 2014. "Tuberculosis in health care workers in Belarus." Public Health Action 4 (3): S29–S33 (*Also published in Russian*)
- Kuksa L, Riekstina V, Leimane V, Ozere I, Skenders G, Van den Bergh R, *et.al.* 2014. "Multi- and extensively drug-resistant tuberculosis in Latvia: trends, characteristics and treatment outcomes." Public Health Action 4 (3): S47–S53 (*Also published in Russian*)
- Toit K, Altraja A, Acosta CD, Viiklepp P, Kremer K, Kummik T, *et.al.* 2014. "A four-year nationwide molecular epidemiological study in Estonia: risk factors for tuberculosis transmission." Public Health Action 4 (3): S34–S40 (*Also published in Russian*)

27 Bacteriële serologie

Auteur: Kristin Kremer

Betrokkenen: Erik Bom, Idder Belmouden, Mark Jonker, Kristin Kremer, Carla Nijhuis, Daan Notermans, Ellen Stobberingh, Petra Turion, Clemens Uittenbosch, Fadime Uzel, Bianca van Berkel, Suzanne Verhoef

Contactpersoon: Kristin Kremer (kristin.kremer@rivm.nl)

Het Clb-IDS voert serologie uit om antistoffen te bepalen tegen twaalf bacteriële ziekteverwekkers. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen immuunstatusonderzoek en diagnostiek om (recente) infecties aan te tonen.

27.1 Immuunstatusonderzoek voor difterie en tetanus

Immuunstatusonderzoek is onderzoek naar vaccinatie-effect en/of mate van beschermende immuniteit. Het Clb-IDS voert onderzoek uit naar de immuunstatus ten opzichte van difterie en tetanus. Dit gebeurt met een in-house test, die met Luminex-technologie antistoffen tegen *Clostridium tetani*-toxine en *Corynebacterium diphtheriae*-toxoid meet. De testen zijn niet gevalideerd om een eventuele infectie vast te stellen, omdat bij het doormaken van tetanus onvoldoende antistoffen tegen tetanustoxine worden opgewekt. Voor zover bekend is het RIVM de enige aanbieder van dit onderzoek in Nederland.

27.2 Diagnostiek voor de ziekte van Lyme en andere teekoverdraagbare infecties

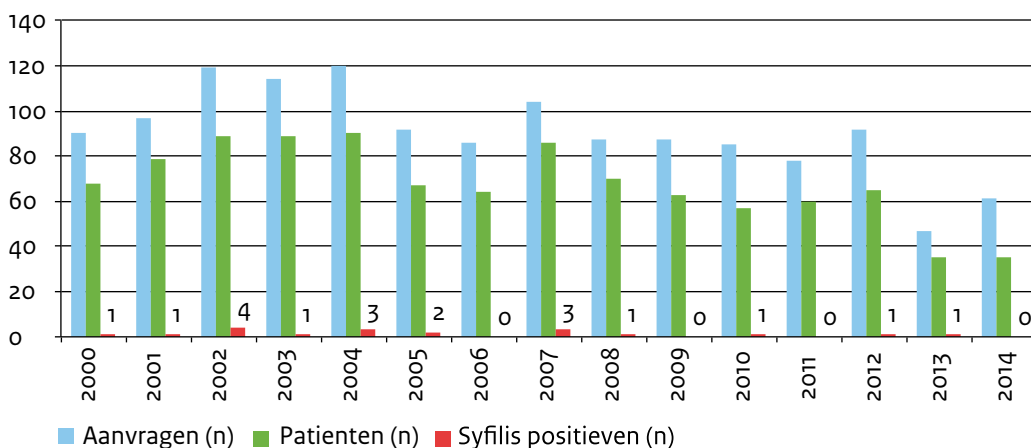
Voor de diagnostiek van Lyme borreliose (*Borrelia burgdorferi*) biedt Clb-IDS confirmatieserologie aan. Hiervoor gebruiken we IgM- en IgG-immunoblots en een ELISA (enzym-linked immunosorbent assay). Andere teekoverdraagbare infecties in het diagnostische pakket van Clb-IDS zijn humane granulocytair anaplasmosis (*Anaplasma phagocytophilum*), humane monocytair ehrlichiosis (*Ehrlichia chaffeensis*), Rocky Mountain spotted fever (*Rickettsia rickettsii*) en Mediterranean spotted fever (*Rickettsia conorii*). Om antistoffen tegen deze pathogenen aan te tonen gebruiken we immuunfluorescentie-assays (IFA). Deze testen worden door geen of slechts een paar andere laboratoria in Nederland uitgevoerd. Voor de ziekte van Lyme en andere teekoverdraagbare aandoeningen liggen een aantal kennisvragen van de minister voor. Hierop wordt in 2015 meer ingezet.

27.3 Syfilis en congenitale syfilis

Syfilis, ook wel lues genoemd, is een seksueel overdraagbare infectieziekte die veroorzaakt wordt door de bacterie *Treponema pallidum*, subspecies *pallidum*. De overdracht van moeder op kind kan plaatsvinden door de placenta of tijdens de bevalling. Men spreekt dan van congenitale syfilis bij het kind. Zwangere vrouwen kunnen zowel bij recente als bij oudere niet- of onvoldoende behandelde infecties besmettelijk zijn voor de foetus. Als onderdeel van de derdemaandscreening worden alle zwangere vrouwen in Nederland onderzocht op onder andere syfilis. Iedere pasgeborene van een moeder met positieve syfilisserologie - al of niet behandeld - hoort te worden onderzocht op syfilis.

Voor referentiediagnostiek naar congenitale syfilis voert het Clb-IDS vier testen uit: de *Treponema Pallidum* Haem- of Particle-agglutination Assay (TPPA), de Fluorescent *Treponemal* Antibody absorption test (FTA-abs-test), de Venereal Disease Research Laboratory (VDRL)-test en een IgM-immunoblot. Hiervoor komen ongeveer negentig aanvragen per jaar binnen, waarvan nul tot vier kindjes per jaar positief getest worden (Figuur 1). Daarnaast biedt het Clb-IDS confirmatiediagnostiek aan voor volwassenen met gebruik van de TPPA, FTA, VDRL en een IgG-immunoblot.

Figuur 1. Aantal congenitale syfilis-aanvragen, het aantal betreffende neonaten en kinderen jonger dan één jaar en het aantal door het RIVM positief geteste gevallen, 2000-2014



27.4 Serologische diagnostiek voor overige bacteriële infecties

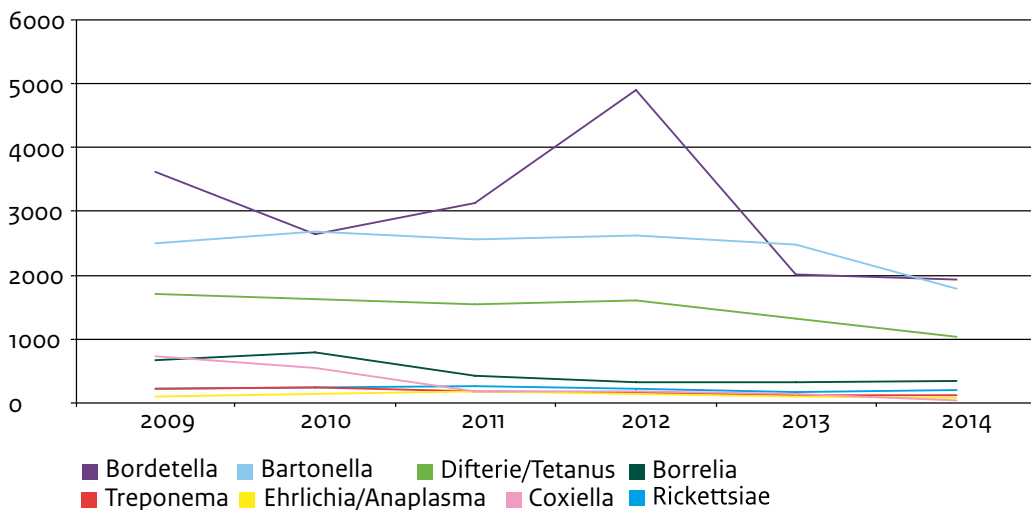
Het RIVM voert diagnostiek van kattenkrabziekte uit met een in-house ELISA. Hiermee tonen we IgM-antistoffen aan tegen *Bartonella henselae*. Deze bacterie komt voor bij katten en wordt overgedragen door een krab, beet of contact met speeksel van een kat. Er is maar een beperkt aantal laboratoria in Nederland dat serologie van *B. henselae* uitvoert. IgM-antistoffen tegen *B. henselae* zijn meestal aantoonbaar van drie weken tot drie maanden na infectie. Het Clb-IDS ontvangt jaarlijks 2000 tot 2500 aanvragen voor kattenkrabziektediagnostiek. (Figuur 2).

Kinkhoestvaccinatie is al enige tientallen jaren opgenomen in het rijksvaccinatieprogramma. Toch komt kinkhoest sinds 1996 regelmatig voor, met periodieke stijgingen in de incidentie iedere twee à drie jaar. Dit was ook het geval in 2012. Daarom varieert het aantal aanvragen voor kinkhoestserologie bij het Clb-IDS ook aanzienlijk; van meer dan 4900 in 2012 tot 2000 in 2014 (Figuur 2). Voor de diagnostiek van kinkhoest gebruikt het Clb-IDS in-house ELISA's. Hiermee tonen we IgA-antistoffen aan, gericht tegen de hele *Bordetella pertussis*-bacterie en IgG-antistoffen gericht tegen het pertussistoxine.

In tegenstelling tot de twee hierboven genoemde bacteriën ontvangt het Clb-IDS weinig aanvragen voor diagnostiek van endemische vlektyfus. Endemische vlektyfus wordt veroorzaakt door *Rickettsia typhi*, die wordt overgedragen door een rattenvlo. De aanvragen voor diagnostiek voor *R. typhi* zijn daarom vooral voor reizigers naar warme gebieden waar ratten voorkomen, of voor inwoners van deze gebieden. De diagnostiek voeren we uit met behulp van een IFA.

Ten slotte voert het Clb-IDS diagnostiek uit voor Q-koorts (*Coxiella burnetii*). Deze zoönose vindt zijn bron vooral in melkgeiten en melkschapen. Na de piek van de Q-koorts epidemie van 2007-2010 is het aantal gevallen sterk afgenomen. Daarmee nam bij het Clb-IDS ook het aantal aanvragen voor antistofbepaling tegen Q-koorts sterk af. Aanvragen komen meestal uit een laagrisicogebied (westen van het land) of het zijn sporadische aanvragen voor confirmatie uit het zuiden van het land. Inmiddels zijn er voldoende laboratoria in het zuiden van het land die op Q-koorts testen. Daarom is besloten de serologie voor Q-koorts ten behoeve van patiëntenzorg op het RIVM in 2015 uit te faseren.

Figuur 2. Aantal aanvragen voor bacteriële serologie ontvangen op het RIVM, 2009-2014



Perinatale screening

28 Screening op het Syndroom van Down voor de noordoostelijke provincies

Auteurs: Erik Bom en Jacqueline Siljee

Betrokkenen: Mark Jonker, Idder Belmouden, Suzanne Verhoef, Petra Turion, Maike Candel en Fadime Uzel

Contactpersoon: Jacqueline Siljee (jacqueline.siljee@rivm.nl)

In het eerste trimester van de zwangerschap kunnen zwangere vrouwen laten bepalen of ze een verhoogde kans hebben om te bevallen van een kind met Downsyndroom (trisomie 21), Edwardssyndroom (trisomie 18) of Patausyndroom (trisomie 13). Deze kans wordt bepaald met de eerstetrimestercombinatietest. Bij een verhoogde kans kan de aanstaande moeder besluiten verder onderzoek te laten doen om uitsluitsel te geven. Dit kan bijvoorbeeld met een niet-invasieve prenatale test (NIPT) of een vruchtwaterpunctie dan wel vlokcentest. De eerstetrimestercombinatietest bestaat uit een serumbepaling en een foetale-nekplooiemeting door middel van een echo.

De afdeling Perinatale screening (PNS) van IDS is het Nederlands referentielaboratorium voor de combinatietest. Zij voert serumbepalingen en berekeningen uit voor de regio's Utrecht, Leiden en Caribisch Nederland. Sinds juni 2014 worden ook de berekeningen na de serumbepaling uitgevoerd voor de noordoostelijke regio van Nederland.

Bij de eerstetrimestercombinatietest wordt de concentratie van vrij β -hCG en PAPP-A in het serum van de zwangere vrouw bepaald. De gemeten concentraties zijn afhankelijk van de zwangerschapsduur. Dit stelt de echoscopist vast door de lengte van de foetus te bepalen. Daarnaast bepaalt deze de grootte van de nekplooi.

De uitkomsten van de serumbepalingen worden, behalve door de mogelijke aanwezigheid van een syndroom bij de foetus, beïnvloed door verschillende grote en kleine factoren. Een kleine factor is het verschil in absolute meetgevoeligheid van de apparatuur van het laboratorium dat de testen uitvoert. Een groot verschil is de duur van de zwangerschap. Daarom worden de gemeten concentraties vergeleken met de mediane waarden voor normale zwangerschappen met dezelfde zwangerschapsduur, die op het gebruikte apparaat zijn gemeten. Met deze gegevens wordt de vrije β -hCG en PAPP-A 'multiple of the median' (MoM) berekend. Deze 'MoM' is eigenlijk een gecorrigeerde concentratie. Bij IDS-PNS berekenen we de omrekenfactoren om van concentratie naar MoM te komen, voor ieder Nederlands laboratorium.

De kansberekening voor de combinatietest komt tot stand door de serumuitslag (de vrije β -hCG- en PAPP-A-MoM's) te relateren aan de leeftijd van de zwangere vrouw en de gemeten nekplooi. Over het algemeen geldt dat een lage PAPP-A-concentratie, een hoge leeftijd en/of een grote nekplooi de kans verhogen op het krijgen van een kind met een van de drie syndromen. Een hoge concentratie vrij β -hCG-MoM verhoogt de kans op een kindje met Downsyndroom en/of Patauysyndroom, terwijl een lage vrij β -hCG-MoM de kans op een kindje met Edwardssyndroom juist vergroot. Wanneer de kans op een kind met een syndroom hoger is dan 1 op 200, spreken we van een verhoogde kans.

De afdeling PNS ontvangt de gemeten serumconcentraties van het UMC Groningen en berekent voor hen daaruit de MoM-waarden op basis van landelijke consensus. De berekende MoM's worden gerapporteerd op de beveiligde Downsyndroomscreeningwebsite van het RIVM. Alleen de desbetreffende aanvrager (echoscopist) kan deze resultaten inzien. Dit geldt al enige jaren voor de screening in de regio's Utrecht en Leiden.

29 Digitale efficiency bij het aanvragen van een combinatietest

Auteur: Jacqueline Siljee (IDS-PNS)

Betrokkenen: Loek Timmermans, Kemal Ozturk, Mohammed Uaftouh, Anneke Rutgers

Contactpersoon: Jacqueline Siljee (jacqueline.siljee@rivm.nl)

Het IDS ontvangt dagelijks veel papieren aanvraagformulieren voor verschillende onderzoeken. Deze vaak handgeschreven informatie wordt ingevoerd in het laboratoriuminformatiesysteem. Dit is tijdrovend en foutgevoelig. Voor de screening op Downsyndroom, Edwardssyndroom en Patausyndroom moeten de aanvragers van de test deze gegevens ook opnemen in het eigen informatiesysteem. In opdracht van het ministerie van VWS moeten voor kwaliteitsdoeleinden al deze gegevens ook in een nationale database worden opgenomen. Oversturen van al deze gegevens moet op een veilige manier gebeuren. De aanvragers mogen alleen de gegevens inzien van die zwangere vrouwen met wie zij een zorgovereenkomst hebben.

IDS heeft in samenwerking met de Nederlandse screeningslaboratoria gewerkt aan een geautomatiseerd systeem. Als een screeningstest gewenst is, kunnen met enkele klikken de gegevens naar de digitale database verstuurd worden

In 2015 vindt de geleidelijke uitrol plaats en is er veel minder handmatig werk nodig.

De aanvraag wordt sneller en accurater aangeleverd. Winst voor iedereen, en bovenal voor de zwangere vrouw. Zij ontvangt snel en nauwkeurig haar testresultaat, zonder dat de gegevens onder ogen komen van mensen voor wie de data niet bedoeld zijn.

30 Hielprikscreening bij Clb-IDS: nieuws in 2014

Auteurs: Peter Schielen en Marelle Bouva

Betrokkenen: Mark Jonker, Idder Belmouden, Suzanne Verhoef, Petra Turion, Maike Candel, Clemens Uittenbosch, Fadime Uzel, Bianca van Berkel, en Guido Diependaal

Contactpersoon: Peter Schielen en Marelle Bouva (peter.schielen@rivm.nl en marelle.bouva@rivm.nl)

30.1 Veertig jaar hielprikscreening

In 2014 bestond de neonatale hielprikscreening in Nederland veertig jaar. Op 11 september 2014 is dit gevierd bij het RIVM met het landelijke symposium '40 jaar hielprikscreening in Nederland'. In de afgelopen veertig jaar mogen de analysetechnieken veel moderner zijn geworden, het basismateriaal is nog steeds hetzelfde: een stukje filtreerpapier met daarop bloedvlekjes, afkomstig van een klein sneetje in de hiel van een pasgeborene. Uit deze bloedvlekjes wordt voor iedere test een ponsje met een doorsnede van 3 mm gemaakt. Jarenlang werd op drie ernstige metabole ziekten gescreend (phenylketonurie, congenitale hypothyreoïdie en adrenogenitaal syndroom). Sinds 2007 gaat het om achttien aandoeningen. In de toekomst zullen het er misschien nog meer worden, want een adviescommissie van de Gezondheidsraad zal naar verwachting in maart 2015 adviseren over de uitbreiding van het hielprikprogramma met nieuwe aandoeningen.

Het Clb-IDS, afdeling perinatale screening (PNS), voert samen met vier andere screeningslaboratoria ieder jaar ongeveer 180.000 hielprikanalyses uit. Het Clb-IDS, afdeling PNS, is ook het referentielaboratorium voor de hielprikscreening en is betrokken bij onderzoek naar verbeteringen en veranderingen van het hielprikprogramma.

30.2 Galactosemie

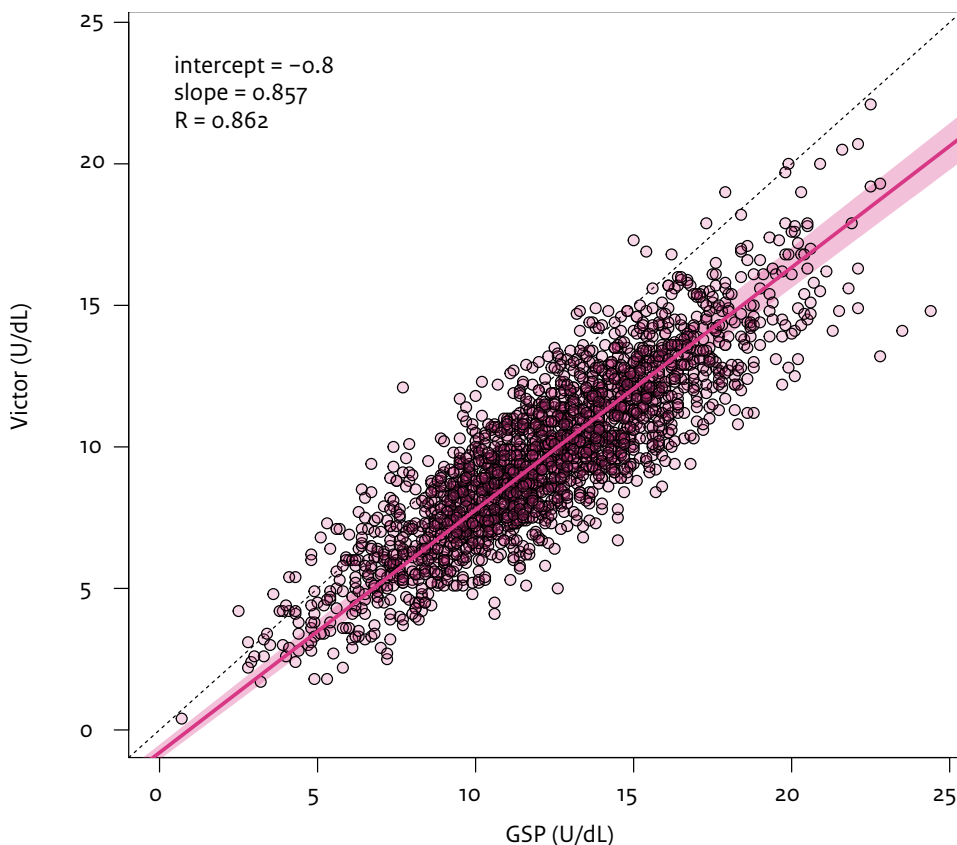
Een van die verbeteringen is het onderzoek op galactosemie. In 2013 en 2014 is hier veel tijd en aandacht aan besteed. Klassieke galactosemie is een van de ziektes waarop sinds 2007 gescreend wordt. Kinderen met klassieke galactosemie kunnen geen galactose afbreken. Ze krijgen ernstige lever- en nierklachten. Galactosemie wordt in een bloedvlek aangetoond door de activiteit te bepalen van het enzym galactose-1-fosfaat uridylyltransferase (GALT).

In 2013 is de productie van de GALT-assay van de firma Biorad gestaakt. De laboratoria hebben toen gekozen voor de assay van een andere firma: Perkin Elmer. Deze verkoopt haar assay in twee vormen: de 'Victor'-methode (deels handmatige afwerking nodig) en de 'GSP'-methode (afwerking door het analyseapparaat Genetic Screening Processor). Analytisch verschillen de assays niet van elkaar. Van de vijf screeningslaboratoria in Nederland werken er drie met een 'GSP', de overige twee met de handmatige 'Victor'-methode. Dat betekent dat beide methodes gevalideerd moeten worden, zodat zij hetzelfde meten. Daarnaast heeft de wijziging van de assay gevolgen voor de afkapgrenzen voor galactosemie in het Nederlandse hielprikprogramma; deze moeten opnieuw worden vastgesteld. Validatie-experimenten zijn uitgevoerd door het Clb-IDS in samenwerking met de vier andere Nederlandse screeningslaboratoria.

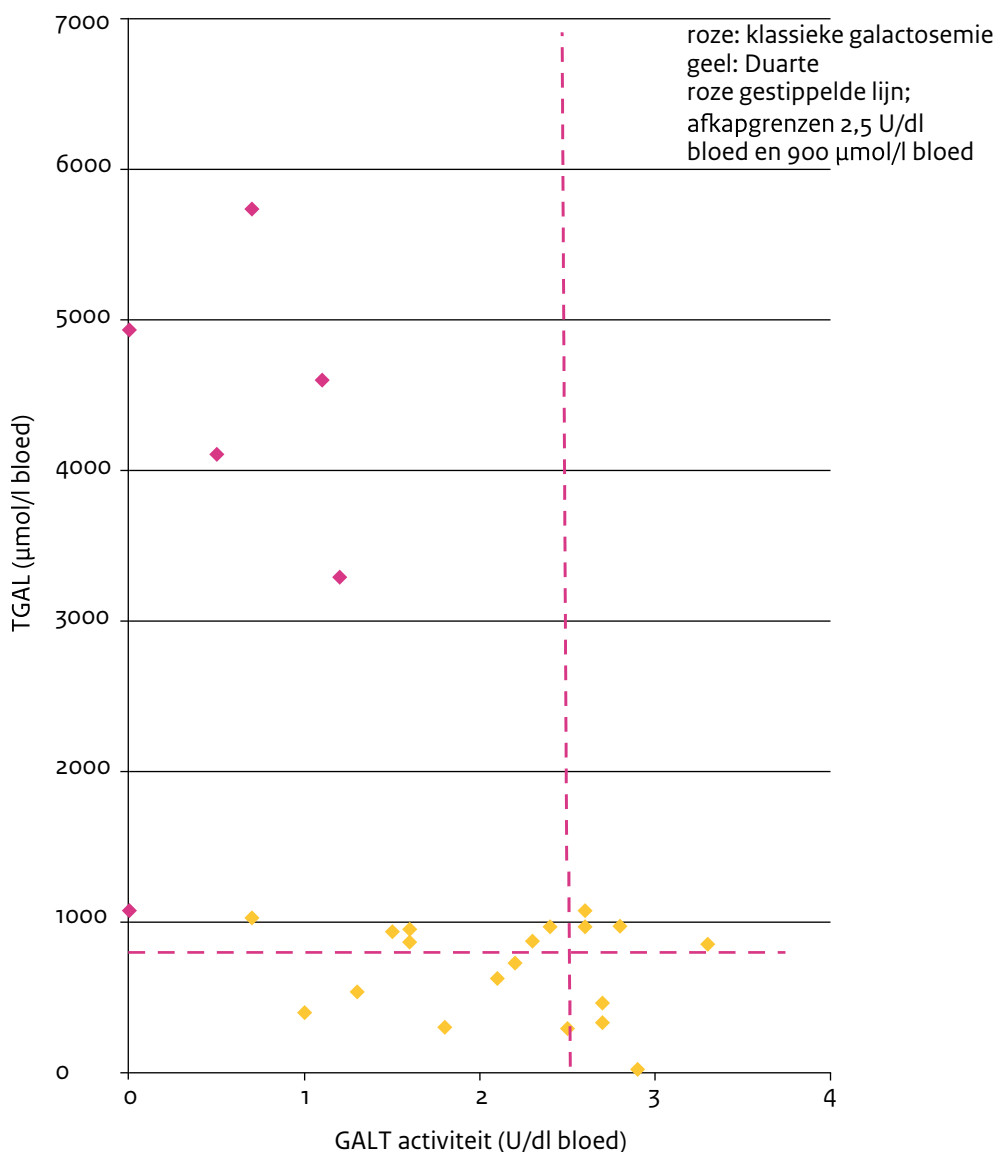
Op basis van de resultaten is de conclusie dat de Victor en GSP dezelfde resultaten opleveren (Figuur 1) en is een nieuwe, landelijk gehanteerde afkapgrens voor GALT-activiteit vastgesteld. Vanaf 1 juli 2014 is deze 2.7 U/dl bloed.

Om er zeker van te zijn dat er echt sprake is van een afwijkende hielprikuitslag wordt ook de totale concentratie galactose in het bloed gemeten. Bij een GALT-activiteit gelijk aan of lager dan 2.7 U/dl bloed en een galactoseconcentratie van 900 $\mu\text{mol/l}$ bloed of meer worden ouders opgeroepen om nader onderzoek te laten doen naar de gezondheid van hun kind. Klassieke-galactosemiepatiënten (Figuur 2, rode symbolen) hebben lage GALT-activiteit en hoge galactoseconcentraties in hun bloed. In Figuur 2 staan ook gegevens van patiënten met een milde vorm van galactosemie ('Duarte-variant') die niet worden opgespoord in de screening.

Figuur 1. GALT-activiteit in tweeduizend hielprikmonsters, bepaald met de GSP-methode (horizontale as) en de Victor-methode (verticale as). Richtingscoëfficiënt en as-afsnijding van de lineaire regressielijn (roze) staan in de figuur. Het blauwe gebied geeft het 95% betrouwbaarheidsinterval van de regressielijn.



Figuur 2. GALT-activiteit (in U/dl bloed) en TGAL-concentraties (in $\mu\text{mol/L}$ bloed) in neonatale hielprikmonsters van klassiekegalactosemiepatiënten (roze) en patiënten met een zeer milde vorm van galactosemie, de 'Duarte'-variant. (Gegevens uit: Fingerhut, R, Torresani, R. Evaluation of the genetic screening processor (GSP™) for newborn screening. T Anal. Methods. 2013; 5: 4769-4776)



30.2.1 Publicaties en referenties

Poster

Boelen A, Kemper E, Bosch AM, van Veen M, Bouva MJ, Jakobs B, *et.al.* "Establishing new cut off limits for galactose 1-phosphate-uridylyltransferase (GALT) deficiency for the Dutch Newborn screening programme." (7e conferentie International Society Neonatal screening, Birmingham)

Boek

van El C; Loeber JG. "Veertig jaar hielprikscreening in Nederland." Uitgeverij Prelum.
ISBN/ISBN13:9789085621331

Bijlagen

Bijlage 1 Publicatielijst Clb-IDS 2014

De complete publicatielijst 2014 is beschikbaar op de website:
www.rivm.nl/publicatielijst-cibids-2014

Bijlage 2 Opleidingen verzorgd door Clb-IDS in 2014

Auteur: Titia Kortbeek

Clb-IDS draagt bij aan de opleiding van diverse professionals. Van verschillende middelbare en hogere laboratoria scholen in Nederland komen stagiaires die door medewerkers van Clb-IDS worden begeleid. Ook universitair studenten volgen hier hun stage. In 2014 waren dat vier universitaire, elf hbo- en veertien mbo-stagiaires. Daarnaast hebben twee AIOS medische microbiologie hun stage in het kader van openbare gezondheidszorg gevolgd bij Clb-IDS.

Op dit moment zijn er acht promovendi werkzaam binnen Clb-IDS. Daarnaast was in 2014 een EU-Fellow bij ons laboratorium gedetacheerd en hebben de volgende promovendi hun proefschrift met goed gevolg verdedigd:

- Marjolijn Wegdam-Blans, promotie 17 januari 2014. (promotor Marion Koopmans): 'Diagnostic challenges during the Dutch Q fever outbreak'
- Mai Nguyet Thu Huyen; promotie februari 2014 (promotor Dick van Soolingen): 'Molecular epidemiology of tuberculosis in Vietnam.'
- Faizel H.A. Sukhrie; promotie 20 mei 2014 (promotor Marion Koopmans, co-promotor Harry Vennema): 'Identifying sources and transmission routes of norovirus outbreaks'
- Era Tuladhar; promotie 30 oktober 2014 (co-promotor: Erwin Duizer): 'Intervention methods to control the transmission of noroviruses and other enteric and respiratory viruses'

Het Clb-IDS is erkend voor het onderdeel Openbare Gezondheidszorg van de opleiding medische microbiologie. Dit jaar heeft Clb-IDS opnieuw een verzoek gedaan tot erkenning als opleidingsinstituut voor de medische microbiologie voor OGZ- en onderzoeksstages tot maximaal twaalf maanden. Titia Kortbeek is hiervoor opleider. Een visitatiecommissie 'Opleiding medische microbiologie' bracht hiervoor in januari 2015 een bezoek aan Clb-IDS. In het voorjaar van 2015 neemt de Registratiecommissie Geneeskundig Specialisten (RGS) het besluit.

Bijlage 3 Referentielaboratoria binnen Clb-IDS

- Focal point medische microbiologie bij ECDC
- Nationaal Influenzacentrum voor WHO, in samenwerking met ErasmusMC
- European Reference Laboratory Network for Human Influenza (ERLI-Net) voor ECDC, in samenwerking met ErasmusMC
- Nationaal referentiecentrum mazelen en rubella voor WHO
- WHO Specialized Reference Laboratory for Polio
- Referentielaboratorium neonatale hielprikscreening voor RIVM-CvB
- Referentielaboratorium Downscreening voor RIVM-CvB

Bijlage 4 Organisatie RIVM en Managementteam IDS

Het Rijksinstituut voor Volksgezond en Milieu (RIVM; directeur-generaal prof.dr. Andre van der Zande) kent drie domeinen: Centrum Infectieziektebestrijding (CIb, directeur prof.dr. Jaap van Dissel), Volksgezondheid en Zorg (directeur, drs. Annemiek van Bolhuis), Milieu en Veiligheid (directeur, dr. Els van Schie).

Het CIb wordt gevormd door vijf centra: Landelijke coördinatie Infectieziektebestrijding (LCI), Epidemiologie en Surveillance van Infectieziekten (EPI), Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS), Zoönose en Omgevingsmicrobiologie (Z&O), Immunologie van Infectieziekten en Vaccins (IIV).

Managementteam IDS:

- dr. Nico Meessen; Centrumhoofd; per 1 augustus 2014
- Georget van den Burg, hoofd afdeling Pre- en Neonatale Screening en Bacteriële serologie (PNS); per 1 september 2014
- Max Heck, hoofd afdeling Bijzondere Bacteriële respons (BSR)
- dr. Audrey King, hoofd afdeling Surveillance Virus RVP (SVR)
- dr. Daan Notermans, hoofd afdeling Bacteriologische en Parasitologische Diagnostiek (BPD)
- dr. Barry Rockx, hoofd afdeling Emerging Infectious Diseases (EID); per 1 oktober 2014
- dr. Berry Wilbrink, hoofd afdeling Beheer en Secretariaat (B&S)
- Vacature, hoofd afdeling Respiratoire en Enterale Virussen (REV)
- dr. Ellen Stobberingh, topexpert bacteriologie ad interim

Bijlage 5 Afkortingen en acroniemen

ACV	Acellulair vaccin
AMC	Amsterdam Medisch Centrum
ARI	Acute Respiratoire Infecties
BMR	Bof, Mazelen, Rubella
BPD	Bacteriële en Parasitologische Diagnostiek (afdeling binnen Cib-IDS)
BSR	Bacteriologie Surveillance en Respons (afdeling binnen Cib-IDS)
CCKL	Coördinatie Commissie ter bevordering van de Kwaliteitsbeheersing op het gebied van Laboratoriumonderzoek in de Gezondheidszorg
Cib	Centrum Infectieziektebestrijding
COA	Centraal Orgaan opvang asielzoekers
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
CPE	Carbapenemase-producerende Enterobacteriaceae
CPE	Cytopathologisch Effect
CRMO	Carbapenem-resistente micro-organismen
CvB	Centrum voor Bevolkingsonderzoek
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EEA	European Economic Area
EID	Emerging Infectious Diseases (afdeling binnen Cib-IDS, Virale zeldzame en emerging infecties en respons)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ELI	Europees tuberculose laboratoriuminitiatief
EMC	Erasmus MC
EPI	Epidemiologie en Surveillance van Infectieziekten (centrum binnen Cib, RIVM)
EU	Europese Unie
EV	Enterovirus
FTA-ABS	Fluorescent Treponemal Antibody Absorbtion test
GEV	Gastro-enteritisvirus
GGD	Gemeentelijke Gezondheidsdienst
HAVANA	HPV amongst vaccinated and non-vaccinated adolescents
HAVNET	Hepatitis A virus network
HBV	Hepatitis B virus
HCV	Hele-celvaccin (kinkhoest)
HCV	Hepatitis C virus
HPV	Humaan papillomavirus
HRV	Humaan rhinovirus
IAZ	Influenza-achtig ziektebeeld
IDS	Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (centrum binnen Cib, RIVM)
IFA	Immunofluorescence assay
IIV	Immunologie van Infectieziekten en Vaccins (centrum binnen Cib, RIVM)

KNCV	Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot Bestrijding der Tuberculose
LA_MRSA	Livestock-associated Meticilline Resistente Staphylococcus aureus
LCI	Landelijke Coördinatie Infectieziektebestrijding (centrum binnen Clb, RIVM)
LUMC	Leids Universitair Medisch Centrum
M&V	Milieu en Veiligheid
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry
MDCK	Madin Darby Canine Kidneycells
MDR	Multi-drug resistant
MERS-CoV	Middle East respiratory syndrome coronavirus
MLVA	Multiple-Locus Variable number of tandem repeat Analysis
MML	Medisch Microbiologisch Laboratorium
MOTT	Mycobacteria other than tuberculosis
MRSA	Meticilline-resistente Staphylococcus aureus
MSM	Males who have sex with males
MSSA	Meticilline-sensitieve Staphylococcus aureus
MT (MLVA)	MLVA-type
NIPT	Niet-invasieve prenatale test
NTM	Non-tuberculeuze Mycobacteriën
NTR	Nederlands Tuberculose Register
NVWA	Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit
NWKV	Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie
OGZ	Openbare gezondheidszorg
OSIRIS	Registratiesysteem beheerd door het RIVM
PAHO	Pan American Health Organization
PCR	Polymerase chain reaction
PEV	Parechovirus
PFGE	Pulse Field Gelelectroforese
PNS	Pre-en Neonatale Screening en bacteriële serologie (afdeling binnen Clb-IDS)
PVL	Panton-Valentine leukocidine
REV	Respiratoire en Enterale Virologie (afdeling binnen Clb-IDS)
RGM	Rapid Growing Mycobacterium
RGS	Registratiecommissie Geneeskundig Specialisten
RIO	RIVM I-organisatie
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
RNA	Ribonucleïnezuur
RSV	Respiratory syncytial virus
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RV	Rotavirus
RVGE	Rotavirus gastro-enteritis
RVP	Rijksvaccinatieprogramma
SOA	Seksueel overdraagbare aandoening
STEC	Shigatoxineproducerende Escherichia coli

SVR	RVP en Virologie (afdeling binnen Clb-IDS)
TB	Tuberculose
TPHA	Treponema pallidum haemagglutination assay
TPPA	Treponema pallidum particle agglutination assay
TypeNed	Typeringsnetwerk Nederland
UMCG	Universitair Medisch Centrum Groningen
UMCU	Universitair Medisch Centrum Utrecht
VDRL	Venereal Disease Research Laboratory test
VE	Vaccineffectiviteit
VS	Verenigde Staten van Amerika
VU	Vrije Universiteit
VWS	Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport
VZ	Volksgezondheid en Zorg
WHO	World Health Organization
XDR	Extensively drug-resistant
Z&O	Zoönose en Omgevingsmicrobiologie (centrum binnen Clb, RIVM)

Eindredactie

Nico Meessen | Ellen Stobberingh |
Ingrid van de Pol



www.rivm.nl/cib

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl

april 2015

De zorg voor morgen begint vandaag