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

LIS/IDS rapportage 2012

LIS/IDS rapportage 2012

LIS rapportage 2012

Colofon

Eindredactie:
Marion Koopmans, afdelingshoofd Virologie, marion.koopmans@rivm.nl; 06-52098601
Henk Bijlmer, afdelingshoofd Bacteriologie, henk.bijlmer@rivm.nl; 06-54773350
Ingrid van de Pol, onderzoeksmedewerker / web redacteur, ingrid.van.de.pol@rivm.nl; 030-2747588

Cover foto:
RIVM Beeldbank

© RIVM 2012
Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Auteursnamen, de titel van publicatie, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en het jaar van uitgave.

Voorwoord

Voor u ligt het jaarverslag van het Laboratorium voor Infectieziekten en Screeening van het Centrum Infectieziektebestrijding, RIVM, over 2012. Dit was een transitie jaar, met het vertrek van de oprichter van LIS, Gerard Loeber, en de voorbereiding van een flinke reorganisatie die in 2013 zijn beslag moet krijgen. Het LIS heeft een nieuwe naam gekregen: IDS (Centrum voor Infectie ziekten en Screening).
Binnen LIS/IDS verdween de afdeling Immuunsurveillance (IMM) door overplaatsing naar een nieuwe poot bij het CIb: het Centrum Immunologie van Infectieziekten en Vaccins (IIV). Desondanks hebben onze medewerkers weer een mooi overzicht samengesteld, waarmee u een tour d' horizon krijgt van de activiteiten binnen ons lab.

Wij horen graag wat u er van vindt.

Marion Koopmans
Henk Bijlmer

Inhoud

Bacteriologie 9
Kleine mutaties in de bacterie *Bordetella pertussis* zijn geassocieerd met een toename in stam frequenties 10
Misidentificatie van *Burkholderia pseudomallei* en *Francisella tularensis* door verschillende identificatiesystemen 14
Differentiatie van *Shigella*, Entero-Invasieve *Eschericia coli* (EIEC) en niet entero-invasieve *E. coli* 16
Bioterrorisme in patiënten diagnostiek 18
Carbapenemase producerende *Enterobacteriacae* 19
Exit Modified Hodge Test? 21
MRSA in Nederland 23
Whole genome mapping van LA-MRSA 26
Salmonella serovar Thompson uitbraak 28

Neonatale screening 31
1e trimester combinatietest: Downsyndroom, Patau syndroom en Edwards syndroom 32
Hielprikscreening in Caribisch Nederland 34

Parasitologie 39
Diagnostiek, trendanalyse en emerging infections 40

Virologie 45
Poliovirus exclusie en enterovirus surveillance 46
Bijzondere virologische diagnostiek: zoönosen en zeldzame infecties 49
Gastro-enteritis virus surveillance 52
Genotypering hepatitis A 55
Emerging infections en ondersteuning bij grote/bijzondere uitbraken; Schmallenberg virus, Sin Nombre virus en humaan coronavirus-EMC 58
Humaan papillomavirus studies 61
Genotypering hepatitis B virussen 64
Eerste evaluatie van TypeNed: Surveillance 2010 en 2011 69
Diagnostiek en surveillance van bof, mazelen, rodehond en parvo virus (parvo B19 virus) 69
Monitoring van antivirale gevoeligheid van influenzavirussen, seizoen 2011-2012 73

Publicatielijst 79

Bacteriologie

Kleine mutaties in de bacterie *Bordetella pertussis* zijn geassocieerd met een toename in stam frequenties

Auteur: Marjolein van Gent
Betrokkenen: Kees Heuvelman, Han van der Heide, Marieke Bart, Anne Zeddeman, Sabine de Greeff, Nicoline van der Maas, Frits Mooi
Contactpersoon: Marjolein van Gent (marjolein.van.gent@rivm.nl)

Kinkhoest wordt veroorzaakt door de bacterie *Bordetella pertussis* en is een ernstige, zeer besmettelijke infectie aan de bovenste luchtwegen. Kinkhoest was in het begin van de 20e eeuw een van de meest voorkomende kinderziekten, totdat in het begin van de jaren 50 gestart is met vaccineren. Kinkhoest verloopt het meest ernstig bij pasgeborenen die nog niet, of nog niet volledig, zijn gevaccineerd. Bij kinkhoest wordt een aantal fasen onderscheiden. De eerste fase van de ziekte wordt gekenmerkt door weinig specifieke symptomen als verkoudheid en milde koorts. Deze fase wordt gevolgd door de kenmerkende "kinkende" hoest, waarbij taai slijm wordt opgehoest. Deze periode kan weken tot maanden duren. Pasgeborenen en kleine kinderen kunnen als gevolg van ademhalingsproblemen dit taaie slijm niet ophoesten. Soms heeft dit de dood tot gevolg.

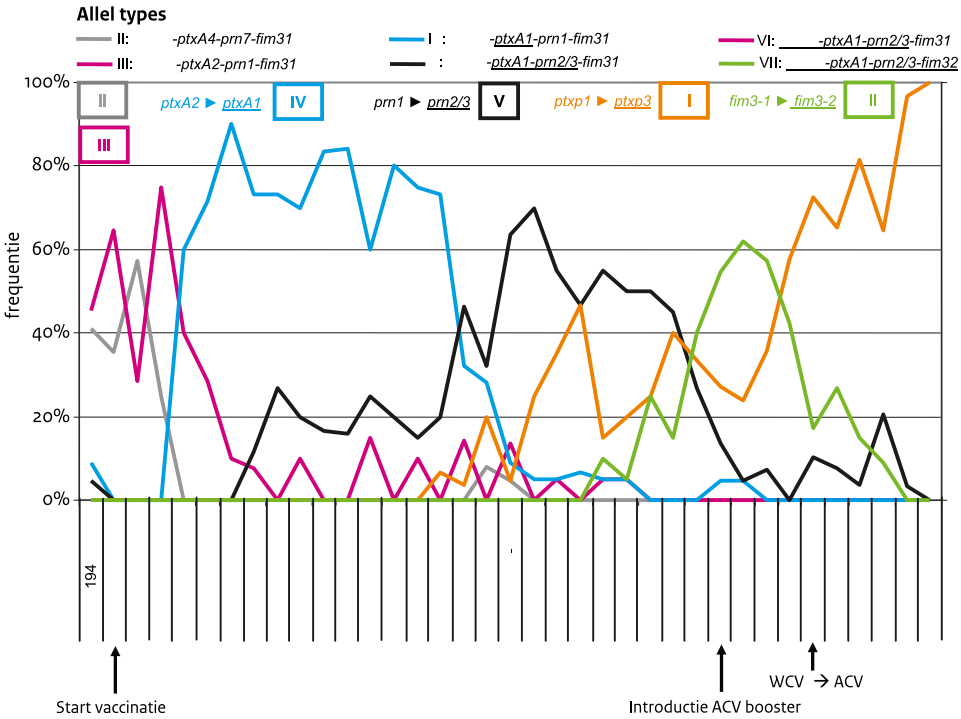
In de jaren 50 is gestart met vaccineren tegen kinkhoest met zogenaamde whole cell vaccins (WCV's). Deze vaccins bestaan uit hele, gedode kinkhoestbacteriën en hebben geleid tot een drastische afname van het aantal kinkhoestgevallen. Destijds is gestart met vaccineren op de leeftijd van 3, 4 en 5 maanden, waarna een booster werd gegeven op de leeftijd van 12 maanden. Om de periode waarin de zuigeling niet of onvolledig beschermd is te verkorten, wordt tegenwoordig gevaccineerd op de leeftijd van 2, 3 en 4 maanden en wordt een booster gegeven op de leeftijd van 11 maanden. Als gevolg van de bijwerkingen van de WCV's zijn er in de jaren 90 van de vorige eeuw acellulaire vaccins (ACV's) ingevoerd, die uit gezuiverde eiwitten van *B. pertussis* bestaan. In eerste instantie werd in Nederland in 2001 alleen een booster met ACV voor vierjarigen ingevoerd, maar sinds 2005 worden alle zuigelingen op 2, 3, 4 en 11 maanden gevaccineerd met ACV's. Het aantal geregistreerde bijwerkingen is als gevolg van de invoering van het ACV aanzienlijk gedaald.

De kinkhoestaangiften hadden al voor de invoering van vaccinatie een cyclisch verloop. Pieken in aangiften om de 3-5 jaar werden afgewisseld met perioden waarin kinkhoest veel minder voorkwam. De kinkhoest aangiftepieken zijn na de invoering van vaccinatie veel kleiner geworden. Het aantal geregistreerde kinkhoestgevallen nam in 1996 echter in Nederland plotseling enorm toe (Mooi et al., 2009). Een toename in kinkhoestaangiften is ook gevonden in andere landen met een hoge vaccinatiegraad, zoals Australië, de Verenigde Staten, Noorwegen en Israël. Uit serologisch onderzoek bleek bovendien dat er, ondanks vaccinatie, sprake was van een hoge circulatie van de kinkhoestbacterie in Nederland en andere landen. Een Nederlandse studie laat een infectiefrequentie zien van meer dan 9% in 2006-2007 voor de populatie ouder dan 9 jaar (de Greeff et al., 2010). Omdat adolescenten en volwassenen die geïnfecteerd raken met de kinkhoestbacterie vaak een asymptomatische of mildere infectie doormaken, wordt de infectie vaak niet herkend als kinkhoest. Adolescenten en vooral volwassenen zijn een belangrijke bron van infectie voor zuigelingen.
Er worden verschillende oorzaken genoemd voor de aanhoudende toename van het aantal kinkhoest-

aangiften. De diagnostiek van kinkhoest is sterk verbeterd en huisartsen zijn alerter op het vóórkomen van de infectie, waardoor vaker op kinkhoest wordt getest. Verder is de duur van bescherming na vaccinatie niet levenslang; immuniteit na vaccinatie verdwijnt na 5-10 jaar. Uit eerder RIVM onderzoek blijkt dat ook aanpassing van de bacterie aan vaccinatie een oorzaak is (Mooi et al., 2010). Zowel in Nederland als in andere landen zijn grote verschuivingen gevonden in de *B. pertussis* populatie na invoering van vaccinatie. Deze verschuivingen zijn vooral zichtbaar in de virulentie factoren van *B. pertussis*; fimbriae (Fim2 en/of Fim3), pertussis toxine (Ptx) en pertactine (Prn). Deze eiwitten zijn belangrijk voor infectie en transmissie.

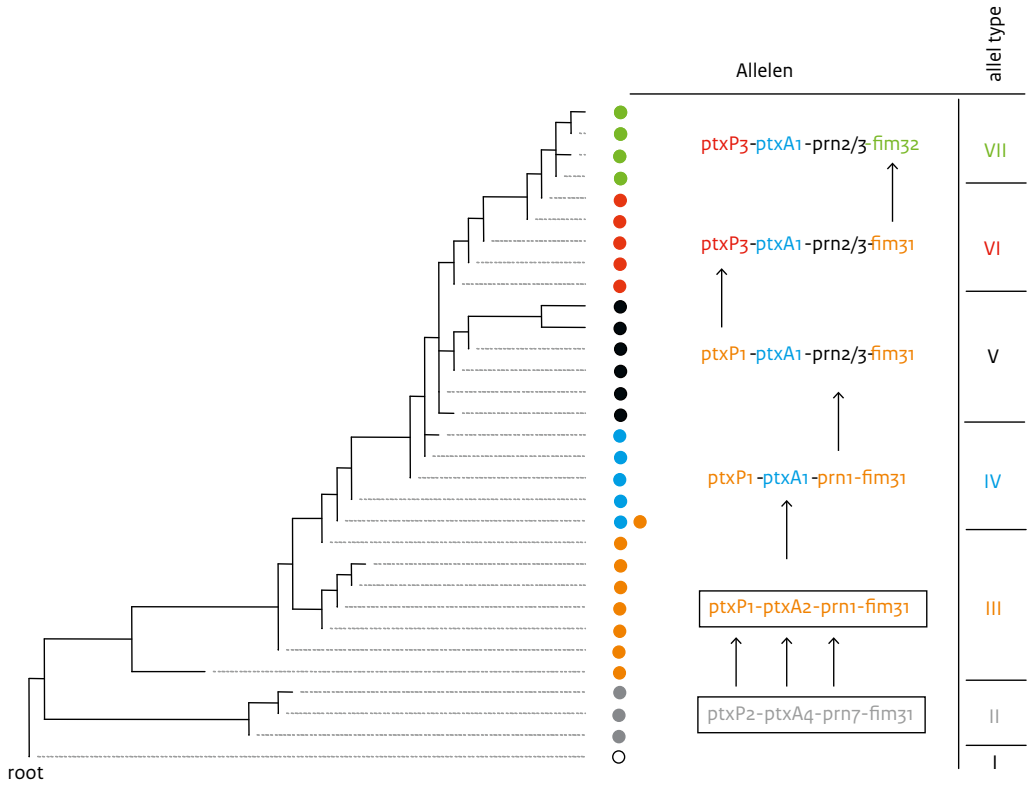
Het LIS/IDS doet onderzoek naar de effecten van 60 jaar vaccinatie op de *B. pertussis* populatie. De focus ligt hierbij op de genen die geassocieerd zijn met eiwitten die geïncludeerd zijn in de ACV's; *ptxA, prn, ptxP* en *fim3*. Kleine mutaties in deze genen blijken te resulteren in mismatches tussen vaccinstammen en circulerende stammen en deze mutaties bleken geassocieerd met een toename in stam frequenties (Figuur 1). De *ptxP3* mutatie lijkt in het kader van de volksgezondheid de belangrijkste verandering in de *B. pertussis* populatie, deze mutatie is geassocieerd met een toename in aangiften (Mooi et al., 2009).

Figuur 1. Trends in stam frequenties in Nederland voor de periode 1949-2010. Stam frequenties worden weergegeven door gekleurde lijnen. Stammen zijn samengevoegd tot allel types (AT's), welke bestaan uit een combinatie van de allelen voor ptxP, ptxA, prn en fim3. AT's worden weergegeven door Romeinse cijfers en veranderingen in allelen die resulteren in verschillen tussen AT's zijn weergegeven. Niet-vaccin types zijn onderstreept. Veranderingen in het vaccinatie programma zijn weergegeven onder de X-as.



Een fylogenetische analyse op basis van “single nucleotide polymorphisms” (SNP’s) laat een stapsgewijze adaptatie van de B. pertussis populatie zien, waarbij de mutaties als het ware accumuleren in de tijd (Figuur 2).

Figuur 2. Relatie tussen fylogenie en accumulatie van mutaties in virulentiegenen. Zeven allel types kunnen onderscheiden worden op basis van *ptxP*, *ptxA*, *prn* en *fim3*. De verschillende AT’s worden weergegeven door gekleurde stippen en de pijltjes stellen veranderingen tussen AT’s voor. De AT’s die gebruikt zijn voor het maken van WCV’s en ACV’s zijn geblokkeerd.



Naast deze mutaties is gekeken naar het verlies van genen, omdat dit mogelijk ook heeft bijgedragen aan adaptatie aan vaccinatie. Hoewel *B. pertussis* stammen met grote regelmaat genen verliezen, blijkt maar één deletie ontstaan en gefixeerd te zijn na de invoering van vaccinatie. Deze deletie is geassocieerd met het *ptxP3* allel. Om een vollediger beeld te krijgen van mutaties die geassocieerd zijn met succesvolle stammen, zijn hele *B. pertussis* genomen en met elkaar vergeleken. Dit resulteerde in de identificatie van een aantal nieuwe polymorfismen, die mogelijk een positieve invloed hebben gehad op adaptatie aan vaccinatie. Het belang van deze mutaties moet blijken uit verder onderzoek. Uit het genoom onderzoek bleek dat *B. pertussis* na de introductie van vaccinatie geen nieuwe genen heeft opgenomen.

De conclusie die getrokken kan worden is dat de verschuiving van *ptxP1* naar *ptxP3 B. pertussis* stammen de adaptatie is met de grootste impact op public health. De *ptxP3* stam heeft zich in een korte periode wereldwijd verspreid, is waarschijnlijk virulenter dan de *ptxP1* stam en is geassocieerd met een hogere Ptx productie. Dit onderzoek toont de cruciale rol aan die Ptx speelt bij infectie met en verspreiding van de bacterie en geeft wegen aan om het kinkhoest probleem aan te pakken, namelijk het gebruik van vaccins die lang persisterende, neutraliserende antilichamen tegen Ptx induceren. Dit kan (deels) bereikt worden door gebruik te maken van ACV's met een hoog gehalte aan Ptx. De huidige ACV's kunnen mogelijk verder worden aangepast door Ptx niet chemisch te inactiveren maar genetisch, omdat genetisch geïnactiveerd Ptx immunogener is. Verder wordt de beschermingsduur van ACV's waarschijnlijk verlengd door eiwitvarianten, die voorkomen in de huidige *B. pertussis* populaties, te includeren in vaccins.

Publicaties

Mooi FR, van Loo IH, van Gent M, He Q,. Bart MJ, Heuvelman K J, de Greeff SC, et al. Bordetella Pertussis Strains with Increased Toxin Production Associated with Pertussis Resurgence. Emerg Infect Dis 15, no. 8 (Aug 2009): 1206-13.

de Greeff SC, de Melker HE, van Gageldonk PG, Schellekens J F, van der Klis FR, Mollema L, et al. Seroprevalence of Pertussis in the Netherlands: Evidence for Increased Circulation of Bordetella Pertussis. PLoS One 5, no. 12 (2010): e14183.

Mooi FR. Bordetella Pertussis and Vaccination: The Persistence of a Genetically Monomorphic Pathogen. Infect Genet Evol 10, no. 1 (Jan 2010): 36-49.

van Gent M, Bart MJ, van der Heide HG, Heuvelman KJ, and Mooi FR. Small Mutations in Bordetella Pertussis Are Associated with Selective Sweeps. PLoS One 7, no. 9 (2012): e46407.

Misidentificatie van *Burkholderia pseudomallei* en *Francisella tularensis* door verschillende identificatiesystemen

Auteur: Maaike van den Beld
Betrokkenen: Airien Harpal, Amber Hendriks, Dieneke Hoeve, Evy Heerkens, Erik Reinders, Daan Notermans, Frans Reubsaet
Contactpersoon: Maaike van den Beld (maaike.van.den.beld@rivm.nl)

Correcte identificatie van organismen met inperkingsniveau 3 (BSL-3) is belangrijk, voor zowel de individuele patiëntenzorg als de openbare gezondheidszorg. Daarom wordt bij de bacteriologie snelle moleculaire diagnostiek ingezet ter confirmatie of uitsluiting van de volgende organismen: *Bacillus anthracis*, *Brucella species*, *Burkholderia mallei* en *Burkholderia pseudomallei*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis* en *Yersinia pestis*. Voor deze diagnostiek ontving het LIS/IDS in 2009 stammen, geïsoleerd uit proceswater. De API 20 NE identificeerde deze stammen als vermoedelijk *B. pseudomallei*.

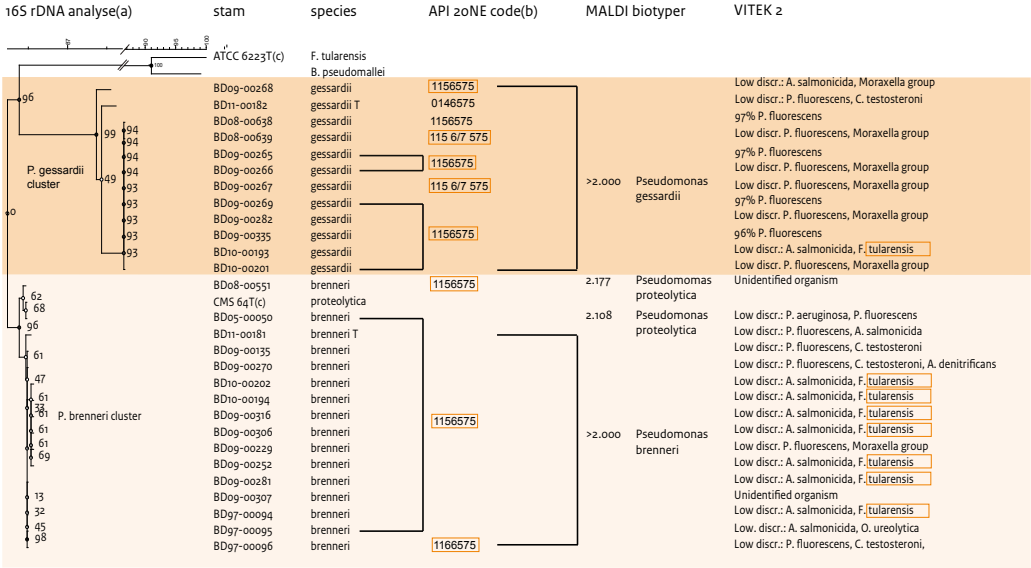
B. pseudomallei is een non-fermentatieve gram-negatieve staaf die in tropische gebieden voorkomt in de grond. De bacterie kan Melioidosis veroorzaken bij vee en mensen. Dit is een zeer infectieuze, potentieel letale ziekte die endemisch voorkomt in Zuidoost Azië en Australië. *B. pseudomallei* behoort tot de CDC categorie B: organismen die potentieel gebruikt kunnen worden voor bioterrorisme.
F. tularensis is een micro-organisme dat de ernstige ziekte Tularemie kan veroorzaken in mens en dier. De klinische manifestatie kan verschillen en hangt af van de route van infectie, het subspecies en de virulentie kenmerken van het organisme. *F. tularensis* behoort tot CDC-categorie A, en staat bekend om zijn laboratorium besmettingen. Beide ziekteverwekkers zijn hoog pathogeen en daarom zijn er na diagnose BSL-3 faciliteiten nodig om de stammen te kweken.

De ingestuurde stammen uit het proceswater werden getest met een *B. pseudomallei* specifieke realtime PCR en bleken negatief. Met een polyfasische benadering werden de stammen geïdentificeerd als *Pseudomonas brenneri* en *Pseudomonas gessardii*. Deze benadering bestaat uit meerdere identificatietechnieken, inclusief 16S rDNA sequentie analyse. Dit resultaat spoorde aan tot meer onderzoek naar genetisch verwante stammen, inclusief twee stammen geïsoleerd uit humaan materiaal. De API 20 NE is op veel laboratoria vervangen door geautomatiseerde identificatie systemen. Daarom is deze studie vooral gericht op identificatie van de *P. brenneri* en *P. gessardii* gerelateerde stammen met behulp van VITEK 2 en MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption/ionization–time of flight) massa spectrometrie.

In deze studie werd de polyfasische benadering gehanteerd als de 'gouden standaard'. Alle gerelateerde stammen werden met deze benadering geïdentificeerd als *P. brenneri* en *P. gessardii*. Met MALDI-TOF werd een overeenkomst bereikt van 93%. Twee stammen werden foutief geïdentificeerd als *Pseudomonas proteolytica* die sterk verwant is aan *P. brenneri* en *P. gessardii*. De species behoren alle drie tot de *P. gessardii* subgroep binnen het *Pseudomonas fluorescens* cluster. In de database van de VITEK 2 komen de species *P. brenneri* en *P. gessardii* niet voor, waardoor de stammen geïdentificeerd werden als verschillende andere species, waaronder *Francisella tularensis* en *Pseudomonas aeruginosa*.

Als een snelle high-throughput methode is MALDI-TOF het meest geschikt voor identificatie van *P. brenneri* en *P. gessardii*. Alle commerciële systemen die identificatie baseren op biochemische kenmerken, scoren slecht bij *P. brenneri* en *P. gessardii*. Dit heeft vooral te maken met de afwezigheid van deze species in de databases. Het kwaliteitskenmerk van API 20 NE was een 'low discrimination' voor *B. pseudomallei* en voor VITEK 2 een 'low discrimination' voor *F. tularensis*.
De conclusie is dat als een dergelijke lage waarschijnlijkheid voor deze twee micro-organismen wordt gevonden, er aanvullende testen gedaan moeten worden om ze uit te sluiten.

Figuur 1. Vergelijking van verschillende identificatiemethoden voor *P. brenneri* en *P gessardii* aan de hand van 16S clusteranalyse.



(a) 16S rDNA clusteranalyse: Neighbour Joining, Jukes & Cantor, 2000 bootstrapped.
(b) API 20NE codes:

1156575	: Low discr.:	o.a. 92,5% B. pseudomallei
0146575	: Low discr.:	o.a. 99,5% P. fluorescens
115 6/7 575	: Low discr.:	o.a. 88,1% B. pseudomallei
1166575	: Low disr.:	o.a. 2% B. pseudomallei

(c) T = typestam

MALDI-TOF and VITEK analyse werd uitgevoerd door de afdeling MMI van het St. Antonius Ziekenhuis.

Differentiatie van *Shigella*, Entero-Invasieve *Escherichia coli* (EIEC) en niet entero-invasieve *E. coli*

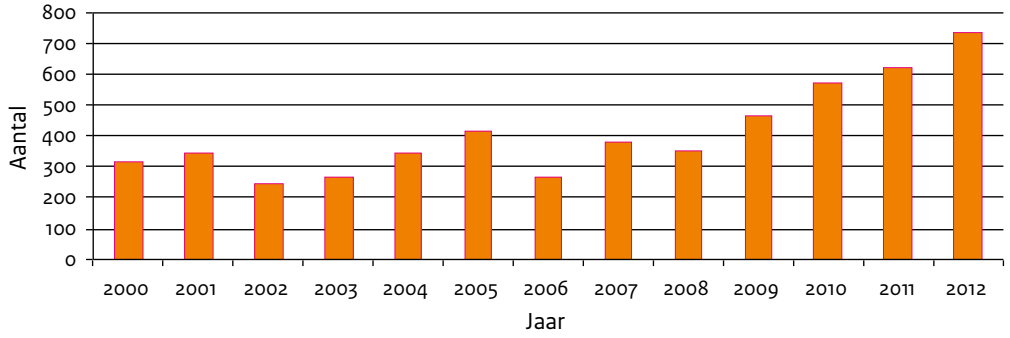
Auteur: Maaike van den Beld
Betrokkenen: Dieneke Hoeve, Daan Notermans, Frans Reubsaet
Contactpersoon: Maaike van den Beld (maaike.van.den.beld@rivm.nl)

Shigella veroorzaakt bacteriële dysenterie en is ingedeeld in vier species, gebaseerd op antigene karakteristieken. Deze classificatie is geen weerspiegeling van de genetische verwantschap. In feite zijn *Shigella* species dusdanig verwant aan *E. coli*, dat ze ingedeeld moeten worden als één enkel species binnen het genus *Escherichia*. Het verschil tussen *Shigella* en *E. coli* is nog gecompliceerder door de beschrijving van entero-invasieve *E. coli* (EIEC). EIEC zijn stammen met de biochemische kenmerken van *E. coli*, maar ze veroorzaken dysenterie via hetzelfde infectiemechanisme als *Shigella*. Vergelijking van meerdere huishoudgenen toont aan, dat EIEC nauwer verwant is aan *Shigella*, dan aan non-invasieve *E. coli*. *Shigella* en EIEC zijn geëvolueerd vanuit dezelfde voorouder en vormen een pathovar binnen *E. coli*.

Sinds een aantal jaren wordt binnen LIS/IDS gezocht naar een methode om *Shigella* te kunnen onderscheiden van *E. coli* en in het bijzonder van EIEC. Dit is vanuit het perspectief van de openbare gezondheidszorg van belang, aangezien infecties met *Shigella* meldingsplichtig zijn (Figuur 1) en EIEC infecties niet. Steeds meer medisch microbiologische laboratoria (MML's) voeren feces diagnostiek uit m.b.v. PCR's. De nu gebruikte PCR's voor *Shigella* zijn echter niet in staat deze te onderscheiden van EIEC, zodat de melding pas plaats kan vinden na kweek.

Shigella en EIEC kunnen van andere *E. coli* worden onderscheiden met behulp van een PCR op het *ipaH*-gen, een multicopy gen dat alleen in *Shigella* en EIEC wordt gevonden. Het is mogelijk om *Shigella* en alle *E. coli*'s van elkaar te differentiëren met behulp van verschillende tests, waaronder PCR op het *ipaH*-gen, fysiologische- en biochemische eigenschappen en serotypering. Een op literatuurstudie gebaseerd algoritme werd opgezet voor dagelijks gebruik in diagnostische laboratoria. Hiermee worden *Shigella* en alle *E. coli* van elkaar onderscheiden (Figuur 2).

Figuur 1. aantal meldingen per jaar van Shigella. Van 2000 t/m 2008 meldplicht 'bacillaire dysenterie', sinds 2008 'shigellose'.



Tabel 2: Key voor differentiatie van *Shigella* en *E. coli*,
uit van den Beld, M.J.C. and Reubsaet, F.A.G. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012) **31**:899–904

LDC [a]	ipaH PCR [b]	Beweeglijkheid [c]	Salicine, zuurvorming [a]	Esculine hydrolyse [a]	Gas uit D-Glucose en indol [a]	Agglutinatie met EIEC geassocieerde antisera [d]	Agglutinatie met Shigella antisera	
+								*E.coli* niet entero-invasief
-	-							*E.coli* niet entero-invasief
	+	+						EIEC
		-	+					EIEC
			-	+				EIEC
				-	+			EIEC
					-	+		EIEC
						-	+	*Shigella*
							-	Provisorische *Shigella*

- Gebaseerd op Edwards and Ewing's identification of *Enterobacteriaceae*, 4th edition, 1986 en/of Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 3rd edition, 1993.
- Uitgevoerd met een standaard PCR protocol, met primers ontwikkeld om een gedeelte van de geconserveerde regio van *ipaH7.8* te amplificeren, deze regio is beschreven door Buysse *et al.*, Microb. Pathoge. 19(5):335-349.
- 24 geincubeerd in BHI-medium bij 37°C.
  Bekende O:H serotypen van EIEC volgens Bergey's manual of Systematic Bacteriology, second edition, volume 2, The *Proteobacteria*, Part B The *Gammaproteobacteria*.

Een gekweekt isolaat is nodig om de testen, genoemd in figuur 2, uit te kunnen voeren. Soms is kweken van *Shigella*, en vooral EIEC, uit feces lastig. Daarom wordt dit jaar het onderzoek voortgezet om een specifiek target te vinden, zodat het onderscheid met behulp van moleculaire technieken gemaakt kan worden.

Publicaties

Lede IO, Kraaij-Dirkzwager MM, van den Kerkhof JHTC, Notermans DW. Gebrek aan uniformiteit bij meldingen van Shigatoxineproducerende Escherichia coli en Shigella aan en door GGDen. Infect. Bull. 23: 116-118. (Mei 2012).

van den Beld MJ, and Reubsaet FA. Differentiation between Shigella, Enteroinvasive Escherichia Coli (Eiec) and Noninvasive Escherichia Coli. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31, no. 6 (Jun 2012): 899-904.

Bioterrorisme in patiënten diagnostiek

Auteur: Maaike de Vries
Betrokkenen: Daan Notermans, Frans Reubsaet
Contactpersoon: Maaike de Vries (maaike.de.vries@rivm.nl)

Een niet verdachte, moeilijk te identificeren stam uit 2011 bleek een minder virulent subspecies van *Francisella tularensis* te zijn: *Francisella tularensis* subspecies *holartica*. Deze bacterie staat, naast o.a. *Bacillus anthracis, Burkholderia mallei, B. pseudomallei, Francisella tularensis, Yersinia pestis* en *Brucella* ssp., op de CDC-lijst van mogelijk bioterroristische organismen. Naar aanleiding hiervan is gekeken welke stappen een MML zou moeten doorlopen bij mogelijke bewuste verspreiding van de bacterie.
Omdat de meeste van deze bacteriën in Nederland niet endemisch voorkomen en veel MML's de benodigde tests ter confirmatie niet in huis hebben, zijn er real-time PCR's ontworpen bij het LIS/IDS. Als deze geen uitsluitsel geven, wordt de bacterie geïdentificeerd met 16S sequentie analyse en biochemische tests. Snelle confirmatie is op die manier mogelijk.

Naast confirmatie wordt gekeken of de symptomen wijzen op een (on)gebruikelijke infectieroute, of de patiënt naar een endemisch gebied is geweest en of de patiënt gewoontes heeft die de infectie verklaren, zoals de Europese uitbraak van *B. anthracis* bij injecterende drugsgebruikers. De hier beschreven patiënt was geïnfecteerd met *F. tularensis* subsp. *holarctica*, en bleek de afgelopen jaren niet in het buitenland geweest. De ulcero-glandulaire Tularemie wees op besmetting door een beet of steek van een insect. De aanwezigheid van *F. tularensis* subsp. *holarctica* in de ons omringende landen maakte het waarschijnlijk dat dit organisme ook (soms) in Nederland voorkomt.

De MML's werden via het verslag van het signaleringsoverleg geïnformeerd. Dit leidde niet tot de melding van andere gevallen. Ook claimde niemand een terroristische aanslag. De kans op een bewuste verspreiding van *F. tularensis* werd daarom als zeer onwaarschijnlijk ingeschat. In een later stadium werd de bevinding op verschillende manieren in Nederland gepresenteerd, zoals in de cursus "Openbare gezondheidszorg voor AIO's Medische microbiologie en dierenartsen in opleiding" en via de COM (Commissie Openbare diagnostiek en Microbiologie). De respectievelijke verantwoordelijkheden bij bevindingen als hierboven beschreven, zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. De rol van medische microbiologische laboratoria (MML's) en van LIS/IDS bij het identificeren van bewuste verspreiding van bacteriën (++: verantwoordelijk, +: deels verantwoordelijk, -: niet verantwoordelijk).

	MML	LIS/IDS
Identificatie van de bacterie	++	+
Confirmatie van de bacterie	+	++
GGD waarschuwen	+	-
Informeren andere laboratoria (b.v. labinf@ct, signaleringsoverleg)	+	++
Kennis achtergrond incidentie	+	++
Identificatie andere gevallen	+	++

Carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae*

Auteur: Daan Notermans
Betrokkenen: Kim van der Zwaluw, Max Heck, Leo Schouls, Henk Bijlmer, Anja Haenen, Jan Muilwijk, Jeroen Alblas, Jos Monen, Sabine de Greeff
Contactpersoon: Daan Notermans (daan.notermans@rivm.nl)

Sinds 2011 loopt bij het RIVM de nationale surveillance van carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae* (CPE). Volgens de richtlijn van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) moet bij een bevinding van meropenem MIC van >0.25 mg/L of een imipenem MIC van >1 mg/L bij *Enterobacteriaceae*, de aanwezigheid van carbapenemases zowel fenotypisch als genotypisch bevestigd worden (voor species zonder intrinsieke resistentie voor imipenem) (Bernards et al., 2012). De genoemde MIC-waarden liggen onder de grens voor verminderde gevoeligheid volgens EUCAST richtlijnen (S ≤ 2 mg/L). Medisch microbiologische laboratoria (MML's) kunnen stammen insturen voor fenotypische en genotypische confirmatie. Als zij zelf de confirmatie uitvoeren wordt gevraagd carbapenemase producerende- en carbapenem resistente stammen in te sturen. M.b.v. een web-based vragenlijst worden enkele epidemiologische gegevens opgevraagd. Bij LIS/IDS wordt m.b.v. PCR's op acht carbapenmase genen getest:
In Amblerklasse A: KPC,
In klasse B: NDM, VIM, IMP, GIM, SIM en SPM,
in klasse D: OXA-48.

In 2011 ontving LIS/IDS (buiten de Maasstad-uitbraak) van 40 laboratoria 170 stammen van 143 patiënten. Hierin werden 36 verschillende CPE's van 32 patiënten gedetecteerd. In 2012 ging het om 280 stammen van 248 patiënten, afkomstig van 58 labs. Hiervan werden 58 CPE's van 53 patiënten gedetecteerd. Oxa-48 bevattende *Klebsiella pneumoniae* was met 43 (46%) de meest voorkomende CPE. Zie tabel 1 voor de verdere verdeling van de verschillende genen en species.

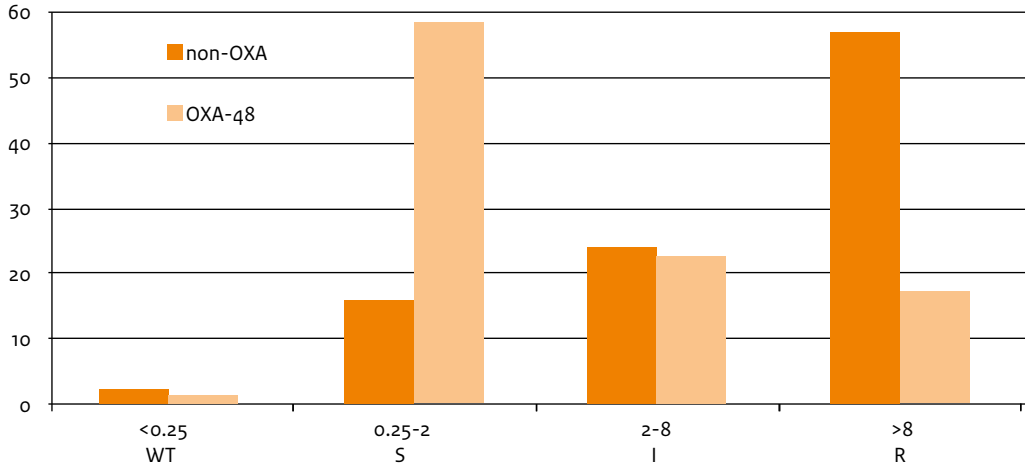
Tabel 1. Verdeling van de verschillende genen en species in 2011 en 2012.

		OXA-48	KPC	VIM	NDM	IMP	Totaal
2011	Klebsiella pneumoniae	22	5	1	2		30
	Citrobacter freundii			1			1
	Escherichia coli	2			1		3
	Enterobacter cloacae				2		2
2012	Klebsiella pneumoniae	21	9	1	6	3	40
	Klebsiella oxytoca	1					1
	Escherichia coli	6			3		9
	Enterobacter cloacae	5		1		1	7
	Enterobacter aerogenes				1		1
	Totaal 2011+2012	57	14	4	15	4	94

De MIC voor meropenem lag voor meer dan de helft van de Oxa-48 bevattende bacteriën in het gevoelige bereik, terwijl dit voor de andere carbapenemases intermediair, gevoelig of resistent was (Figuur 1). De meting is uitgevoerd met Etest,

Het aantal stammen dat voor confirmatie werd aangeboden en het aantal CPE dat is aangetoond, is t.o.v. 2011 gestegen. Dat kan wijzen op een betere participatie vanuit het land. ISIS-data suggereren dat een aanzienlijk deel van de Enterobacteriaceae met een daarvoor in aanmerking komende MIC niet worden geconfirmeerd.

Figuur 1. Verdeling van meropenem MIC's van Oxa-48 en overige carbepenemases.
WT: wild type; S: gevoelig; I: intermediair gevoelig; R: resistent



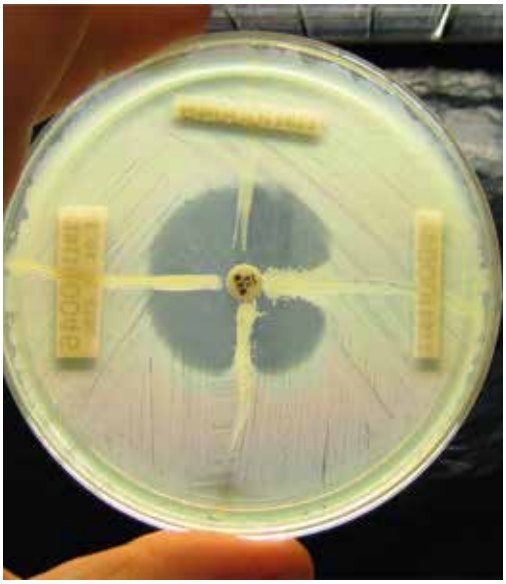
Exit Modified Hodge Test? Toepassing Nordmann/Poirel test op Nederlandse isolaten

Auteur: Kim van der Zwaluw
Betrokkenen: Angela de Haan, Max Heck, Henk Bijlmer
Contactpersoon: Kim van der Zwaluw (kim.van.der.zwaluw@rivm.nl)

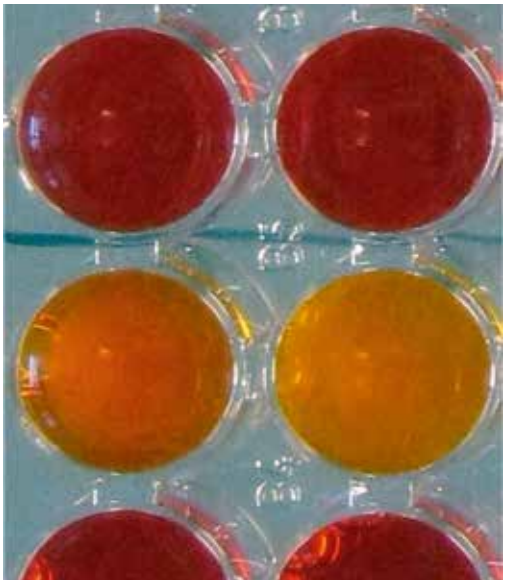
De opkomst en verspreiding van carbapenemase producerende, gram-negatieve staven is een wereldwijde bedreiging voor de volksgezondheid. De meeste aandacht gaat uit naar de detectie van genetische markers voor resistentie mechanismen. Fenotypische tests zijn daarentegen lange tijd onveranderd gebleven. Op PCR gebaseerde technieken kunnen echter alleen de targets detecteren waar deze voor ontworpen zijn. Het bezwaar hiervan is dat de carbapenemase niet meer wordt gedetecteerd als het onderliggende genetische mechanisme verandert.
Met een fenotypische test kunnen alle isolaten met de betreffende eigenschap gedetecteerd worden, ongeacht het onderliggende genetische mechanisme. Tot op heden wordt carbapenemase activiteit bepaald met de Modified Hodge Test (Figuur 1). Deze test is echter moeilijk te interpreteren en heeft een lage specificiteit en typeerbaarheid.

Recent is hiervoor een nieuwe test, de Carba NP (Nordmann / Poirel) test gepubliceerd, die een specificiteit en sensitiviteit van 100% claimt (Nordmann P. et al.2012 en Dorlet L. et al. 2012).
De Carba NP test is gebaseerd op de daling van pH wanneer imipenem gehydrolyseerd wordt. Een mengsel van imipenem met fenolrood wordt geïncubeerd met een enzymextract van een test-isolaat.

Figuur 1. Modified Hodge Test



Figuur 2: Carba NP test



Wanneer carbapenemase enzymen aanwezig zijn in dit extract, daalt de pH en slaat de indicator om van paars naar oranje-geel (Figuur 2).

De Carba NP test werd uitgetest op 60 stammen. Vanwege de hoge kosten van imipenem werd daarnaast een alternatieve methode opgezet, waarbij een tablet meropenem (10ug) werd geïncubeerd met hetzelfde enzym extract (Figuur 3). Vervolgens werd bepaald of deze tablet nog steeds een remmingszone veroorzaakte bij een gevoelige stam. De zestig isolaten waren verschillende species (zowel *Enterobacteriaceae* als non-fermentors), met variërende MIC en zowel met- als zonder carbapenemase genen. De Carba NP test werd zowel met meropenem als met het goedkopere imipenem getest. Ook werd de houdbaarheid van de imipenem-fenolroodoplossing getest.

Beide tests blijken een aanzienlijk betere specificiteit en typeerbaarheid te hebben dan de Modified Hodge Test. Enkele isolaten gaven wisselende resultaten en moeten nader onderzocht worden. De Carba NP test blijkt niet te werken met meropenem omdat dit onvoldoende zuurvorming geeft na hydrolyse. Verder blijkt de imipenem-fenolroodoplossing slechts zeer beperkt houdbaar en deze houdbaarheid wordt bij gebruik van de goedkopere variant nog lager.

De conclusie is dat beide tests veelbelovend zijn als vervanging van de Modified Hodge Test.
De alternatieve methode is eenvoudiger uit te voeren, goedkoper en geeft minder dubbelzinnige resultaten (verdwijning remmingszone). Daarbij is het principe universeel toe te passen om iedere enzymatische inactivatie van ieder antibioticum te detecteren. Hier staat tegenover dat de Carba NP test binnen drie uur resultaat geeft, terwijl het alternatief overnacht incubatie vereist.

Figuur 3: Alternatieve hydrolyse test

MRSA in Nederland

Auteur: Henk Bijlmer
Betrokkenen: Leo Schouls, Ellen Stobberingh, Jan Muilwijk, Anja Haenen, Max Heck, Kim van der Zwaluw, Thijs Bosch, Gerlinde Pluister
Contactpersoon: Henk Bijlmer (henk.bijlmer@rivm.nl)

Nederland wordt geografisch gezien omringd door landen met een hoog MRSA resistentie niveau. Naast dit feit zullen reizigers van en naar deze landen vaak zorgen voor import van MRSA. Desondanks slaagt Nederland erin om een laag resistentie niveau te behouden voor flucloxacilline / methicilline resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA). Strikte surveillance is daarom noodzakelijk om veranderingen in prevalentie en verschuivingen in MRSA types te detecteren. Deze verschuivingen kunnen een voorbode zijn voor verhoogde prevalentie.
Voor deze samenvatting zijn verschillende bronnen gebruikt.

- Gezonde, of in ieder geval niet geïnfecteerde patiënten uit de Nederlandse bevolking die de huisarts bezoeken
- Data van verpleeghuisbewoners
- Data uit een doorlopend surveillance project (ISIS) onder medisch microbiologische laboratoria (MML's)
- Data van het nationaal MRSA surveillance en typeringslaboratorium RIVM-BSR (Bacteriële Surveillance en Respons)

De data afkomstig van de MML's laat zien dat een stabiel laag percentage MRSA gehandhaafd blijft in 2012. (Tabel 1)

Tabel 1. MRSA data verkregen uit MML's (ISIS)

Micro-organisme	jaar	*S.aureus* getest	Resistentie (%)
MRSA	2008	32398	514 (1.6)
MRSA	2009	32765	421 (1.3)
MRSA	2010	32715	512 (1.6)
MRSA	2011	32294	528 (1.6)
MRSA	2012	31047	464 (1.5)

Uit surveillance in de algemene bevolking komen iets andere cijfers: van patiënten (> 3 jaar oud) die hun huisarts bezochten voor een niet-infectie gerelateerde aandoening, werd een monster afgenomen uit de neusgaten. De data die hieruit voortkwamen lieten geheel volgens verwachting een lager percentage MRSA zien. In totaal werd van 3873 mensen in 20 huisartspraktijken een monster afgenomen. Hiervan werden er 26 uitgesloten van deelname wegens leeftijd en/of afwezigheid van patiënten data. De voor alle leeftijden gecorrigeerde prevalentie van *S. aureus* was 27.3% (22.9-32.1), wat overeenkomt met de verwachte prevalentie van *S. aureus* dragerschap. Het percentage MRSA binnen alle S. aureus isolaten bedroeg 0.8% (0.4-1.6) en binnen de totale studie populatie 0.2% (0.1-0.4) (Stobberingh, persoonlijke

communicatie).
Bewoners van verpleeghuizen blijken meer op patiënten uit ziekenhuizen te lijken: onder 332 bewoners van 6 verschillende verpleeghuizen werd in 2 van de 109 *S.aureus* isolaten MRSA gevonden (1.8%) (Hoogendoorn M. et al., 2013). Deze resultaten wijzen er niet op dat verpleeghuizen in Nederland een reservoir zouden zijn voor MRSA.

Een groot deel van alle MRSA isolaten is livestock-associated (LA-MRSA). Het percentage LA-MRSA van het totaal aan MRSA blijft over de jaren 2008-2012 stabiel rond de 40 %.

Hoewel de ratio MRSA / MSSA (methicillin susceptible *S. aureus*) stabiel laag blijft, verandert de populatie MRSA wel. Binnen de top-10 van non-LA-MRSA Spa-typen heeft een belangrijke verschuiving plaatsgevonden van de types t064, t740 en t038. Het meest voorkomende Spa-type veranderde niet (Tabel 2).

Tabel 2: Top-10 Non-LA-MRSA Spa-types

Spa-Type	2008	2009	2010	2011	2012
t008	242	220	231	240	219
t002	143	138	158	188	177
t064	78	74	70	32	26
t032	75	55	83	65	34
t740	55	19	8	11	6
t044	50	61	54	41	51
t019	48	61	50	55	85
t003	48	47	51	24	28
t038	46	37	21	19	14
t045	43	28	15	11	46
Top 10 (n)	828	740	741	686	686

Binnen de MLVA-types werd een soortgelijke verschuiving gezien. Het absolute aantal van het in 2008 meest voorkomende MRSA-type werd geleidelijk aan steeds lager. Dit terwijl het totaal aantal ingestuurde stammen sinds 2008 langzaam groeide. De top-10 MRSA-types van 2008 is in 2012 echter beduidend gewijzigd (Tabel 3).

Surveillance van MRSA en typering lijkt nog steeds zinvol, o.a. omdat verschuivingen in types consequenties kunnen hebben. Het lijkt erop dat de MRSA virulentiefactor PVL (Panton-Valentine leukocidine) geassocieerd is met bepaalde, nauw verwante MLVA-complexen. In 2008 was 60% van de isolaten, behorend tot het MLVA-complex 30 (MC30), al PVL+. Dit is in 2012 gestegen naar 79%. Deze stijging wordt grotendeels veroorzaakt door MLVA-type 240. Het percentage PVL+ isolaten van dit MLVA type steeg van 12.5% (325/2606) in 2008 naar 19.3% (548/2838) in 2012. Het absolute aantal PVL+ isolaten is gestegen van 325 in 2008 naar 548 in 2012.

Tabel 3: Top-10 Non-LA-MRSA MLVA-types

MLVA-Type	2008	2009	2010	2011	2012
314	105	107	91	116	94
5	66	68	18	14	22
528	58	17	11	13	9
240	57	64	74	79	62
195	47	43	71	30	21
527	46	37	19	13	15
22	45	43	33	33	17
130	42	29	39	14	16
80	41	45	33	21	22
8	36	16	14	21	25
Top 10 (n)	**543**	**469**	**403**	**354**	**303**

In Engeland steeg het aantal PVL+ isolaten uit sputum en dat leidde tot 41 gevallen van 'community accuired severe pneumonia' met een influenza-achtig ziektebeeld (zie beide current news publicaties). De stijging van het aantal PVL+ isolaten binnen Nederland wordt tot op heden niet gezien bij isolaten uit sputum.

De conclusie is dat het percentage MRSA in 2012 laag is in zowel de ziekenhuizen (1.5%) als de verpleeghuis populatie (1.8%) en de Nederlandse bevolking (0.8%). Spa-types en MLVA-types veranderen, maar het percentage PVL+ isolaten, geassocieerd met bepaalde MLVA-complexen, is in 5 jaar tijd met 50% gestegen.

Publicaties

Hoogendoorn M, Smalbrugge M, Stobberingh EE, van Rossum SV, Vlaminckx BJ, and Thijsen SF. Prevalence of Antibiotic Resistance of the Commensal Flora in Dutch Nursing Homes. *J Am Med Dir Assoc* 14, no. 5 (May 2013): 336-9.

Apparent rise in PVL pneumonia and possible association with Influenza. Health Protection Report 2013; 7(2): current news

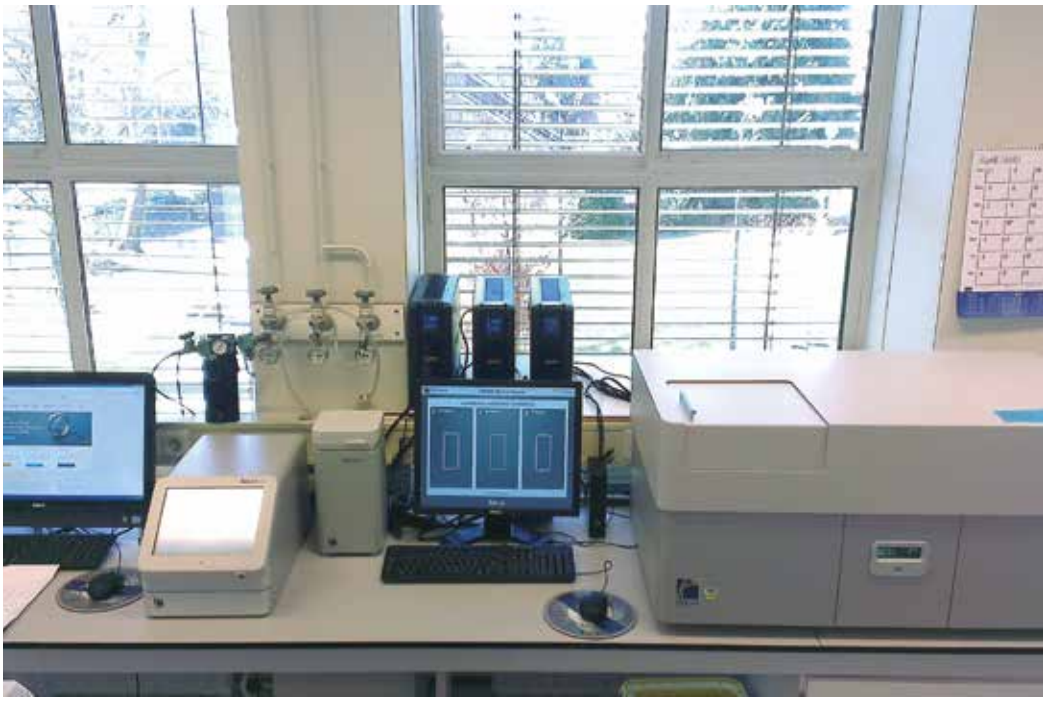
Investigation following continued apparent rise in PVL pneumonia. Health Protection Report 2013, 7(13): current news

Whole genome mapping van LA-MRSA

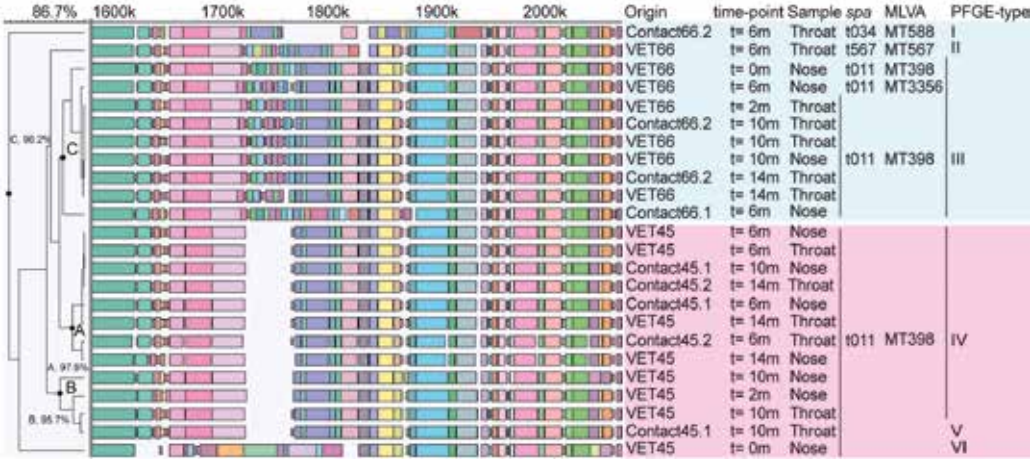
Auteur: Thijs Bosch
Betrokkenen: Martijn van Luit, Leo Schouls
Contactpersoon: Thijs Bosch (thijs.bosch@rivm.nl)

In 2003 is een nieuw MRSA type ontdekt dat geassocieerd is met vee (dier gerelateerde MRSA, LA-MRSA). Sinds die tijd heeft dit type gezorgd voor een indrukwekkende toename van het aantal isolaten dat is ingestuurd als onderdeel van de Nationale MRSA surveillance. Op dit moment behoort 40% van alle ingestuurde isolaten tot dit LA-MRSA type. Het bleek dat de huidige typeertechnieken voor de MRSA surveillance, zoals Staphylococcal protein A (spa) en Multiple locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA), een gelimiteerd onderscheidend vermogen hebben voor LA-MRSA. Dit maakt het vrijwel onmogelijk om studies te doen naar de oorsprong van LA-MRSA en om transmissieroutes van dit type MRSA te identificeren. Recentelijk is een nieuwe moleculaire analyse techniek geïntroduceerd, genaamd Whole Genome Mapping (WGM). Deze methode is gebaseerd op het creëren van hoog-resolutie, gerangschikte whole genome restrictie mappen en kan als typeringstool worden ingezet. Wij bestudeerden en valideerden het vermogen van WGM om LA-MRSA isolaten beter van elkaar te onderscheiden.

Figuur 1. Apparaat waarop whole genome mapping wordt uitgevoerd.



Figuur 2. Whole genome maps van twee niet-gerelateerde dierenartsen en leden van hun huishouden.



Uit meerdere validatie experimenten bleek dat de resultaten van WGM zeer reproduceerbaar waren. Toepassing van de techniek op twee goed gedocumenteerde MRSA uitbraken toonde aan dat WGM één uitbraak kon bevestigen, maar dat in de whole genome maps van de andere uitbraak grote verschillen werden gevonden. Dit duidde erop dat niet alle isolaten tot deze uitbraak behoorden.

WGM van epidemiologisch niet-gerelateerde LA-MRSA isolaten leverde een veel hoger differentiërend vermogen op dan de huidige spa-typering en MLVA. Daarentegen waren de maps van LA-MRSA isolaten, afkomstig van de bewezen LA-MRSA uitbraak, bijna niet van elkaar te onderscheiden. Daarmee werd aangetoond dat transmissie van LA-MRSA gedetecteerd kan worden met WGM.
In een ander experiment werden LA-MRSA isolaten, afkomstig van twee niet-gerelateerde dierenartsen en leden van hun huishouden getest. De whole genome maps lieten zien dat dierenartsen mogelijk meerdere LA-MRSA stammen bij zich kunnen dragen en verspreiden op hetzelfde tijdstip (Figuur 2).
Op basis van spa- en MLVA-typering was het eerder niet mogelijk om dit soort conclusies te trekken. .
Whole genome sequencing zal uiteindelijk de ultieme typeermethode worden, maar de throughput van deze methodiek is op dit moment nog niet afdoende. Whole Genome Mapping kan echter binnen twee dagen na ontvangst van de bacteriële reincultuur een vergelijking met andere whole genome maps geven. Dit maakt Whole Genome Mapping zeer geschikt om onderzoek te doen naar transmissieroutes en uitbraken veroorzaakt door LA-MRSA.

Publicaties

Bosch T, Verkade EJM, van Luit M, Pot B, Vauterin P, Burggrave R, et al. High resolution typing by whole genome mapping enables discrimination of LA-MRSA (CC398) strains and identification of transmission events. *PLoS One, in press.*

Salmonella serovar Thompson uitbraak

Auteur: Max Heck
Betrokkenen: Thijs Bosch, Anjo Verbruggen, Kim van der Zwaluw, Henny Maas, Sjoerd Kuiling
Contactpersoon: Max Heck (max.heck@rivm.nl)

In 2012 werden door LIS/IDS 5048 salmonella's getypeerd waarvan 2942 van humane herkomst. *Salmonella eneterica* is met serotypering onder te verdelen in circa 2010 serovariaties. Serotypering is gebaseerd op de interactie van antisera gericht tegen O-antigenen en H-antigenen van de bacterie. *Salmonella* Typhimurium en Enteritidis zijn met 33% van de ingezonden stammen de meest bekende en voorkomende types (Tabel 1).

In week 32 van het jaar 2012 werden 9 gevallen van Salmonella Thompson gevonden in monster-mate-rialen van humane herkomst. Normaliter wordt per jaar een beperkt aantal gevonden (Tabel 2).

Tabel 1. Top-10 van de meest voorkomende serovars in 2011

	serotype	n	%
1	Typhimurium	581	17.3
2	Enteritidis	544	16.2
3	4,[5],12:i:-	378	11.2
4	Paratyphi B variatie Java	123	3.7
5	1,3,19:i:-	92	2.7
6	Cubana	78	2.3
7	Infantis	75	2.2
8	Derby	74	2.2
9	Worthington	74	2.2
10	Livingstone	71	2.1
	Thompson	**14**	**0.4**

Tabel 2. Aantal S.Thompson isolaten 2005 t/m 2011

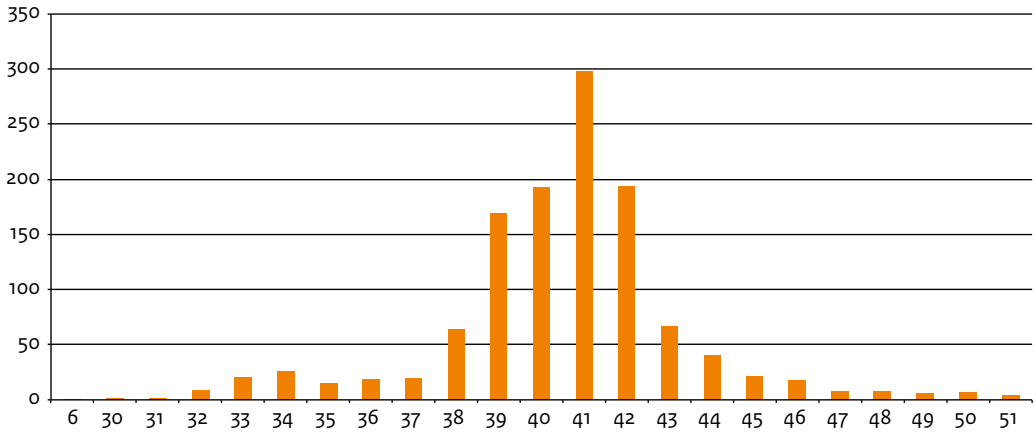
Jaar	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
S.Thompson (n =)	6	6	18	19	10	13	14

In de weken daarna liep het aantal bevestigde Salmonella Thompson isolaten sterk op. Binnen de epidemiologie afdeling van het RIVM werd dit ook opgemerkt, waarna in week 33 een case-control studie werd opgezet. Deze studie leverde na enkele weken de hypothese dat gerookte vis -en zalm in het bijzonder- de mogelijke bron was. De Nederlandse Voedsel en Warenautoriteit (NVWA) isoleerde

Salmonella uit zalm. Deze zalm werd verwerkt door een bedrijf uit Harderwijk dat ± 70% van de Nederlandse markt voorzag. De uit zalm geïsoleerde stammen werden naar het RIVM gebracht voor serotypering. In dat weekeinde werden de stammen door LIS/IDS getypeerd. Zondagmiddag werd aangetoond dat zalm inderdaad de vermoedelijke bron van de uitbraak was. Doordat het zeldzame type "Thompson" zowel bij de patiënten als in de zalm werd aangetoond, was de cirkel rond. Met deze kennis kon de NVWA starten met gericht onderzoek naar de locatie van besmetting van de zalm en de wijze van besmetting. Het aantal inzendingen in de daarop volgende weken nam toe met een piek van 298 bevestigde "S.Thompson gevallen" in week 41 (Figuur 1).

Daarnaast werd met behulp van moleculaire typering geconfirmeerd dat de isolaten uit patiënten en de zalm tot dezelfde stam behoorden. M.b.v. PFGE (pulsed field gel electroforese) werden de eerdere bevindingen bevestigd door LIS/IDS en door het CDC in Atlanta. De uitbraak was in december beëindigd. Omdat niet iedereen met darmklachten een huisarts bezoekt en wordt getest, moet het aantal bevestigde gevallen van S. Thompson als het topje van de ijsberg beschouwd worden. Naar schatting betekent één bevestigd geval in werkelijkheid ± 20 besmettingen in de samenleving (van Pelt, W. et al., 2003). Vanwege de omvang van de uitbraak, waarbij enkele patiënten zijn overleden, werd ook de Onderzoeksraad voor Veiligheid erbij betrokken.
De constatering is dat in 2012 een van de grootste uitbraken van Salmonella heeft plaatsgevonden.

Figuur 1. Aantal bevestigde Salmonella Thompson gevallen, week 25-52, 2012



Publicaties

Friesema IH, de Jong AE, Fitz James IA, Heck ME, van den Kerkhof JH, Notermans D W, et al. Outbreak of Salmonella Thompson in the Netherlands since July 2012. *Euro Surveill* 17, no. 43 (2012): 20303.

van Pelt W, de Wit MA, Wannet WJ, Ligtvoet EJ, Widdowson MA, and van Duynhoven YT. Laboratory Surveillance of Bacterial Gastroenteric Pathogens in the Netherlands, 1991-2001. *Epidemiol Infect* 130, no. 3 (Jun 2003): 431-41.

Figuur 2. Typeren in het weekeinde

Neonatale screening

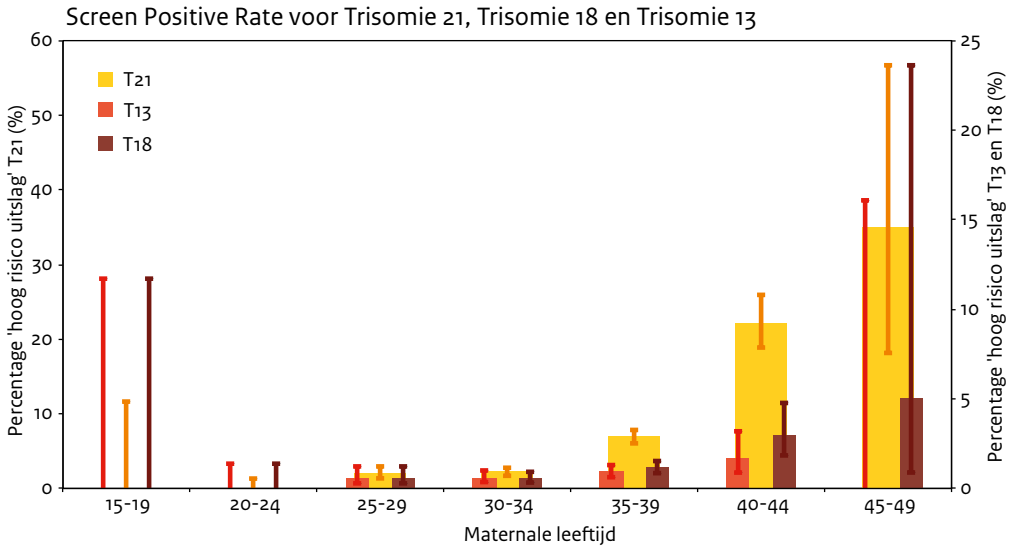
1e trimester combinatietest: Downsyndroom, Patau syndroom en Edwards syndroom

Auteur: Jacqueline Siljee
Betrokkenen: Idder Belmouden, Maike Candel, Mark Jonker, Peter Schielen, Petra Turion, Suzanne Verhoef, Guido Diependaal
Contactpersoon: Jacqueline Siljee (jacqueline.siljee@rivm.nl)

De afdeling Pre- en Neonatale Screening (PNS) binnen LIS/IDS, heeft landelijke referentietaken op het gebied van de eerste trimester-combinatietest. In 2012 is Peter Schielen opgevolgd door Jacqueline Siljee als projectleider voor de prenatale screening.

Op verzoek van de zwangere kan in het eerste trimester van de zwangerschap onderzoek worden gedaan naar de kans op aanwezigheid van downsyndroom (trisomie 21). Sinds 2011 zijn hier twee trisomieën aan toegevoegd; Patau syndroom (trisomie 13) en Edwards syndroom (trisomie 18). Hierbij wordt de bepaling van de eiwitten PAPP-A en fβ hCG in een serummonster gecombineerd met een nekplooimeting van de foetus en een a priori risico dat gebaseerd is op de maternale leeftijd. PNS voert de laboratoriumonderzoeken uit voor de regio's Utrecht en Leiden. Voor 75% van de ruim tienduizend laboratoriumanalyses op jaarbasis wordt bij PNS ook de volledige kansberekening gedaan. Voor de overige 25% wordt door PNS de uitslag van de laboratoriumanalyse gerapporteerd en wordt perifeer een kansberekening uitgevoerd. Dit wordt in een ziekenhuis of bij een verloskundigenpraktijk gedaan.

Figuur 1. Percentage hoog risico uitslagen voor de verschillende trisomieën waarop gescreend wordt bij PNS: Downsyndroom (blauw), Patau syndroom (rood) en Edwards syndroom (groen). Het percentage uitslagen van 1:5 - 1:200 is uitgezet per leeftijdscategorie, met gekleurde trendlijn per syndroom en betrouwbaarheidsintervallen.



De gerapporteerde kans kan een waarde hebben van 1:5 t/m kleiner dan 1:5000. De afkapgrens voor een 'hoog risico' uitslag ligt voor alle drie de trisomieën op 1:200. Het percentage 'hoog risico' uitslagen voor downsyndroom was in de huidige onderzoekspopulatie 5,46 %. Voor Edward syndroom was het percentage 'hoog risico' uitslagen veel lager, te weten 0,95%, en voor Patau syndroom ligt dit nog lager: namelijk 0,76%. De verdeling van het percentage hoog risico uitslagen staat in figuur 1.

In Nederland is de deelname door zwangeren aan de eerste trimester combinatietest met 28% niet zo hoog als in de ons omringende landen waar de screening wordt gedaan. Naar de oorzaak van dit soort verschillen in deelname tussen Europese landen wordt onderzoek gedaan.

Onderzoeksprojecten

Voor de prenatale screening is PNS betrokken bij diverse studies met als doel screening voor pre-eclampsie en zwangerschapsdiabetes in het eerste trimester te testen. Pre-eclampsie is de belangrijkste oorzaak van maternale en foetale sterfte in de westerse wereld; van de zwangeren ontwikkelt 2-8% een vorm van pre-eclampsie. Een vroege behandeling met aspirine kan een groot deel van de pre-eclampsie gevallen voorkomen. Het is daarom van groot belang dat er in het eerste trimester op wordt gescreend, ver voor er symptomen van pre-eclampsie optreden.

Naast onderzoek naar markers voor pre-eclampsie is een implementatie onderzoek gestart. Voor het opzetten van screening op pre-eclampsie is de zogenaamde RESPECT studie opgezet vanuit het UMCU. In 2012 is begonnen met de eerste fase van dit onderzoek; het valideren van een kansberekeningsmodel voor de opsporing van pre-eclampsie en zwangerschapsdiabetes. In de tweede fase van het onderzoek wordt dit geïmplementeerd in het verloskundig zorgsysteem en vindt er een evaluatie van moeder-en-kind uitkomsten plaats. Door toepassing van het voorspelmodel worden voor iedere vrouw al vroeg de aandachtspunten voor haar zwangerschap duidelijk. Hierdoor is risico-gestuurde zorg op maat mogelijk, zonder onnodige interventies, en kan deze zorg tijdig en betrouwbaar worden aangeboden.
Gedurende de studie worden in het 1e trimester van de zwangerschap de gegevens van de zwangere vrouwen geregistreerd, de bloeddruk gemeten en bloed afgenomen. PNS zal in het maternale serum twee eiwitten meten in deze monsters, te weten PAPP-A en PlGF. Deze worden door de placenta geproduceerd.

Om de logistiek, analyse en risicoberekening en infrastructuur gestroomlijnd op te zetten voor de screening voor pre-eclampsie en zwangerschapsdiabetes, is PNS naast het analyseren van de sera actief betrokken bij het opzetten van de (ICT) infrastructuur**.** Hierbij wordt de jarenlange kennis en expertise op het gebied van de screening op downsyndroom gebruikt. Mocht de studie een succes worden, dan wordt deze infrastructuur ingezet. Het systeem heet Peridos. Er wordt bekeken wat er van de bovenstaande plannen ook daadwerkelijk in ons screenings- en zorgsysteem geïmplementeerd zal worden.

Publicaties

Koster MP, Heetkamp KM, de Miranda E, and Schielen PC. Comparison of Risk Calculation Approaches in a Screening Programme for Down Syndrome. *J Perinat Med* 40, no. 3 (Apr 2012): 259-63.

Benn P, Borrell A, Cuckle H, Dugoff L, Gross S, Johnson JA, et al. Prenatal Detection of Down Syndrome Using Massively Parallel Sequencing (Mps): A Rapid Response Statement from a Committee on Behalf of the Board of the International Society for Prenatal Diagnosis, 24 October 2011. *Prenat Diagn* 32, no. 1 (Jan 2012): 1-2.

Hielpriksscreening in Caribisch Nederland

Auteur: Marelle Bouva
Betrokkenen: Mark Jonker, Idder Belmouden, Petra Turion, Suzanne Verhoef, Maike Candel, Guido Diependaal, Bert Elvers, Peter Schielen
Contactpersoon: Marelle Bouva (marelle.bouva@rivm.nl)

De drie eilanden Saba, St Eustatius en Bonaire van 'Caribisch Nederland' (de officiële benaming) hebben de status van bijzondere Nederlandse Gemeente binnen het koninkrijk der Nederlanden. Daarom kunnen zij sinds oktober 2010 aanspraak maken op het aanbod van preventie en zorg, dat geldt binnen het koninkrijk. Vanuit de eilanden is in 2011 het verzoek gedaan om de neonatale hielpriksscreening in te mogen voeren. Daarop is door de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport aan het Centrum voor Bevolkingsonderzoek (RIVM) opdracht gegeven om een uitvoeringstoets te doen. Voor de analytische aspecten van die uitvoeringstoetsen komt de afdeling Pre- en Neonatale Screening (PNS), als referentie-laboratorium voor de neonatale screening, in beeld. Ten behoeve van die uitvoeringstoets is in 2012 geadviseerd over de mogelijkheden van de analyse van hielprikmateriaal, afkomstig van deze eilanden. Daarnaast is experimenteel getoetst of de kwaliteit van hielprikmonsters voldoende gewaarborgd was na een reis vanuit het Caribisch gebied.
Uit de literatuur is bekend dat transsporttijd, warmte en vochtigheid tijdens transport invloed kunnen hebben op diverse screeningsmarkers van het Nederlandse hielprikprogramma (Adam B.W. et al., 2011). Voor de uitvoeringstoets "hielprik in Caribisch Nederland (CN)" is de verwachting dat de transporttijd langer en de luchtvochtigheid en temperatuur hoger zijn dan in continentaal Nederland. Daarom is een korte pilotstudie uitgevoerd met de verzending van hielprikmateriaal van Bonaire naar Nederland. Hiermee is

Figuur 1. De geprepareerde envelop

informatie verkregen over de praktische mogelijkheden, doorlooptijden, betrouwbaarheid en traceerbaarheid van het hielprikmateriaal. Omdat verzending per koerier op voorhand te duur was om daadwerkelijk tijdens reguliere screening vanaf CN te gebruiken, is deze optie in dit pilot-onderzoek niet onderzocht.

Voor deze studie werd materiaal van het '2nd ISNS' kwaliteitsprogramma gebruikt. Dat materiaal bestaat uit filterpapier-kaartjes met twee keer zes bloedvlekken. Deze bevatten verschillende, bekende, concentraties van 17 hydroxy-progresteron (OHP), thyroid-stimulerend hormoon (TSH), fenylalanine (phe), thyroxine-bindend globuline (TBG) en galactose.
In de reguliere bruine "hielprik" enveloppen werden twee zip-bags met elk één vlek 'concentratie 5' en één vlek 'concentratie 6' verpakt. Slechts één van deze zakjes bevatte een droogzakje silicagel. Op de envelop werd een sticker geplakt waarop genoteerd kon worden wanneer de envelop op Bonaire uit de vriezer was gehaald, ter verzending was aangeboden en in Nederland in het laboratorium was gearriveerd.

De 40 enveloppen werden op droogijs van Nederland naar Bonaire gestuurd. De enveloppen werden bij -20°C bewaard totdat ze naar Nederland werden terug gestuurd.
Tussen 18 februari en 11 april 2013 werden op werkdagen twee enveloppen met de reguliere post naar Nederland verzonden (één naar het postbusnummer en één naar het antwoordnummer).
Bij aankomst in Nederland werden de enveloppen bij -20 °C opgeslagen. Nadat alle kaartjes in Nederland waren aangekomen werden de analyses in één run geanalyseerd om inter-assay variatie uit te sluiten. Als controle werden kaartjes geanalyseerd van het 2nd ISNS kwaliteitsprogramma, die gedurende het experiment opgeslagen waren bij -20 °C bij PNS.

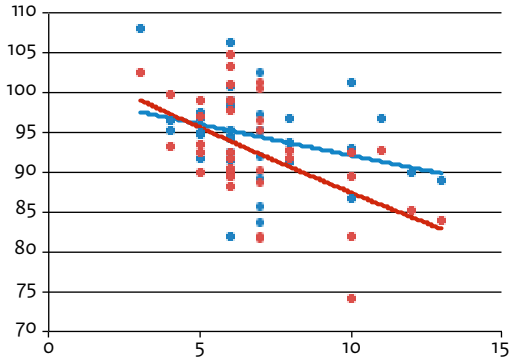
Beoordeeld werden de transporttijd en de concentraties van:
- OHP, TSH, phe, GALT-enzymactiviteit en totale galactose-concentratie (TGAL)
- C0 en C2 (twee parameters voor de acylcarnitine-deficiëntie)
- biotinidase (BIOT)
- immunoreactive trypsinogen (IRT)
- pancreatitis-associated protein (PAP. IRT en PAP worden gemeten voor de cystic fibrosis-screening)

Deze concentraties zijn uitgedrukt als percentage van de concentraties in de controlemonsters. Tot slot werden de hemoglobine-patronen in de bloedvlekken bepaald met HPLC.

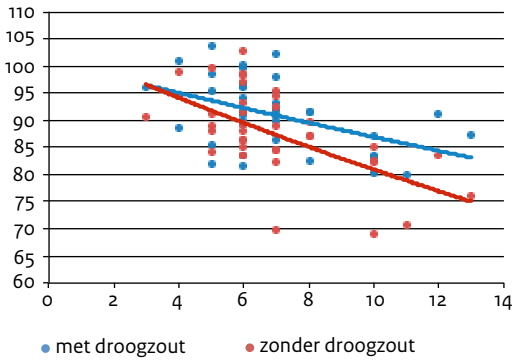
De verzendingen naar antwoordnummer en postbusnummer kwamen meestal op dezelfde dag binnen. De zendingen naar het antwoordnummer waren echter 's ochtends beschikbaar voor analyse en de zendingen naar het postbusnummer pas later op de dag. Wanneer een envelop op maandag verzonden werd, was de envelop gemiddeld 7 dagen onderweg. Bij verzending op vrijdag was dit gemiddeld 9 dagen. Bij verzending op de overige werkdagen was de gemiddelde reistijd 6 dagen.

Voor bijna alle markers geldt dat de recovery (dus de concentratie) van de biomarkers licht afneemt bij een langere transporttijd (alleen voor OHP, IRT en PAP is er geen groot verschil). Voor een aantal biomarkers is dat effect minder groot als er silicagel gebruikt wordt. Een typisch voorbeeld daarvan is de activiteit van GALT (Figuur 2a) en de concentratie TGAL (Figuur 2b) waarbij de recovery sterker afneemt wanneer er geen silicagel gebruikt wordt.
Hemoglobine bleek uiteen te vallen bij het transport vanuit Caribisch Nederland.

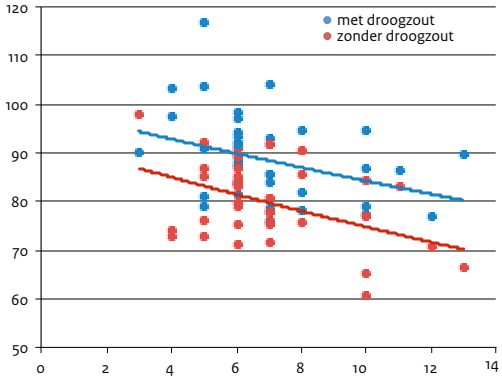
Figuur 2a: Recovery GALT activiteit in relatie tot transporttijd vanuit Carobisch Nederland (x-as, in dagen)



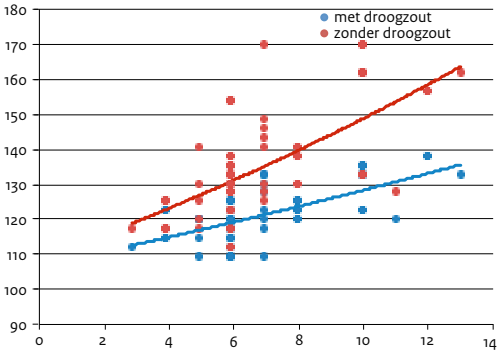
Figuur 2b: Concentratie TGAL, in relatie tot de transporttijd, als percentage van de concentratie in controlemetingen



Figuur 3a: Totale oppervlakte Hb – HPLC patroon (een maat voor intact Hb) als percentage van het oppervlak van controlemetingen, afgezet tegen de transporttijd vanuit Caribisch Nederland (x-as, in dagen).



Figuur 3b: Zogenaamde 'FAST'peak', als percentage van controlemetingen, afgezet tegen de transporttijd.



Bij de hemoglobinepatronen is de totale oppervlakte van de pieken lager en het percentage van de FAST piek hoger (Figuur 3a en b). Dit is een maat voor degradatie van hemoglobine en het effect was sterker wanneer er geen silicagel wordt gebruikt.

Vooral GALT en TGAL en de hemoglobinopathie-gerelateerde biomarkers zijn gevoelig voor ongunstige transport-omstandigheden (langere transporttijd, hoge luchtvochtigheid en temperatuur). Om de kwaliteit zo optimaal mogelijk te houden, wordt verzending op vrijdag afgeraden. Het is dan beter om de hielprik eerder af te nemen (rekening houdend met de toegestane termijnen) en op donderdag te verzenden, de hielprik op een later tijdstip af te nemen en op maandag verzenden óf de hielprik wel op dezelfde dag af te

nemen, maar gekoeld te bewaren en pas op maandag te verzenden. Omdat er ook relatief korte transporttijden zijn waargenomen (3-5 dagen) wordt geadviseerd nader onderzoek te doen naar volledige optimalisatie van de transportketen, waarbij alle bronnen van vertraging geïdentificeerd moeten worden.

Resultaten van dit pilot-onderzoek laten zien dat bij een transporttijd tot ongeveer 7 dagen de concentraties van de verschillende biomarkers nog redelijk onveranderd zijn. Voor sommige parameters geldt echter dat zij zeer kwetsbaar zijn bij ongunstige transport-omstandigheden.
Adam et al. meldden in 2011 grote invloed van verhoogde temperatuur en verhoogde/verlaagde luchtvochtigheid. Deze studie liet bijvoorbeeld zien dat T4 bij een hoge luchtvochtigheid een 10 keer hogere degradatie had dan bij een lage luchtvochtigheid. Succinylaceton, dat gebruikt wordt bij de screening op Tyrosinemie type I, is stabiel bij een lage luchtvochtigheid, maar bij hoge luchtvochtigheid gedurende 3 dagen werd nog maar 60% van de originele SA concentratie teruggevonden. Bij veroudering van het hielprikmateriaal degraderen GALT en hemoglobine. Ook in dit pilot-onderzoek is waargenomen dat de activiteit van GALT afneemt naarmate het materiaal ouder is. Hoge vochtigheid versnelt dit proces en aanwezigheid van silicagel remt deze versnelde degradatie. Figuur 2a: Recovery GALT activiteit in relatie tot transporttijd vanuit Caribisch Nederland (x-as, in dagen).

Parasitologie

Diagnostiek, trendanalyse en emerging infections

Auteur: Titia Kortbeek
Betrokkenen: Nahid Nozari, Lia van de Berg, Denise Hoek, Sietze Brandes, Elena Pinelli, Jeroen Roelfsema
Contactpersoon: Titia Kortbeek (titia.kortbeek@rivm.nl)

In het kader van het project Diagnostiek parasitaire infecties: trendanalyses en emerging infecties werd in 2012 onderzoek gedaan naar een aantal bijzondere parasitaire infecties met potentiële risico's voor de volksgezondheid.

Balamuthia mandrillaris

Deze vrijlevende amoebe kan overal in de wereld voorkomen in het milieu en kan een opportunistische verwekker van infecties zijn, vooral (maar niet uitsluitend) bij immuun gecompromitteerde patiënten. In februari 2012 werd in het signaleringsoverleg door arts-microbioloog Alewijn Ott van het Laboratorium voor Infectieziekten (LvI) in Groningen gemeld dat zij bij onderzoek *Balamuthia mandrillaris* DNA hadden aangetoond in hersenmateriaal van een overleden patiënt. De patiënt was een man uit de Noordoost polder die jaren daarvoor een niertransplantatie had ondergaan. Hij presenteerde zich met een encefalitis beeld en overleed ondanks therapie binnen 11 dagen na opname. Bij pathologisch anatomisch (PA) onderzoek bleken delen van de hersenen verweekt en vervloeid. In Europa is slechts bij drie andere patiënten een besmetting beschreven. In Nederland is het voor zover bekend de eerste keer dat deze infectie is vastgesteld.
De patiënt had de gewoonte om water uit zijn tropische aquarium in een slang te zuigen om te hevelen, waarbij hij water in zijn mond kreeg. Dit aquarium leek daarom een logische bron voor de infectie. Er werden door het LIS/IDS monsters genomen van het aquarium, maar daarin kon met PCR geen *Balamuthia* DNA worden aangetoond. Wel werd in de hevelslang *Acanthamoeba* DNA aangetoond.

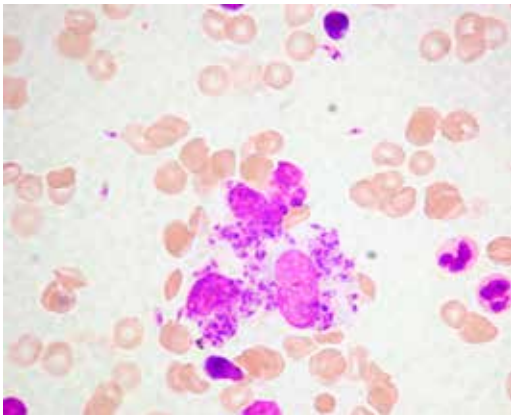
Acanthamoeba is een andere vrijlevende amoebe die o.a. infiltratieve oogafwijkingen kan veroorzaken en die niet reageert op antibiotica gericht tegen bacteriën.
Begin 2011 werd voor de detectie van *Acanthamoeba* DNA in lensvloeistof, cornea schraapsel etc. een *Acanthamoeba* PCR ontwikkeld en geïmplementeerd. Ook voor de zeer pathogene *Naegleria fowleri,* werd een PCR opgezet aan de hand van literatuur van het CDC. Deze vrijlevende amoebe heeft in het verleden in Frankrijk nog tot dodelijke infecties geleid. Er is nu een panel beschikbaar voor vrijlevende amoeben bestaande uit *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* en *Naegleria fowleri.*

Leishmaniasis

Bij een kindje van 2 jaar oud uit Brabant werd een viscerale Leishmania infectie vastgesteld, zonder dat dit kind in een endemisch gebied is geweest. Er werd onderzoek gedaan naar een mogelijke bron van infectie. Daarbij werd aandacht besteed aan honden als reservoir. Het kind woonde in de buurt van een militair vliegveld waar hondenbrigades naar Afghanistan werden ingevlogen (Hovius, E. et al., 2011). In samenwerking met dierenartsen van defensie werd van een aantal uit Afghanistan terug gekomen honden bloed en weefselbiopten afgenomen. Bloedonderzoek en PCR op de weefselbiopten toonden bij geen enkele hond Leishmaniasis aan. Ook bij de honden uit het gezin kon geen infectie worden vastgesteld. Er is geen bron voor de infectie gevonden. Het blijft onduidelijk of het een congenitale infectie betreft, of dat er sprake is geweest van lokale transmissie uit een nog onbekende bron. Voor zover

Figuur 1. Aquarium van Balamuthia patiënt.

Figuur 2. *Leishmania* amastigoten in een Giemsa gekleurde bloeduitstrijk, 1000x vergroot. De amastigoten lijken een dubbele kern te hebben. Dit is de kinetoplast die in deze kleuring net als de kern rood aankleurt.



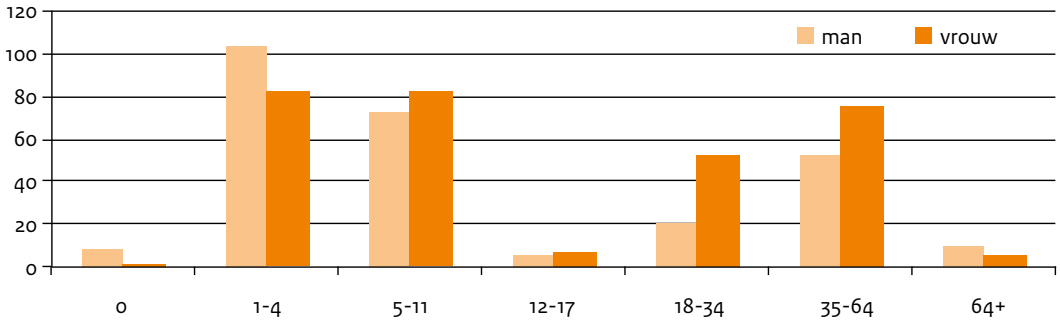
bekend is de vector - een zandmugje (*Phlebotomus* sp.) - in Nederland niet aanwezig, maar daar is geen onderzoek naar gedaan.

Cryptosporidium verheffing

In augustus 2012 werd door een arts-microbioloog uit Den Bosch, en later door verschillende microbiologen en GGD-en een toename gemeld van het aantal patiënten met een *Cryptosporidium*-infectie. Deze parasiet kan heftige diarree veroorzaken en er zijn geen medicijnen beschikbaar voor behandeling. Vooral bij immuun gecompromitteerde patiënten kan een infectie levensbedreigend zijn. Zwemmen (in natuurwater of zwembad) of direct mens-mens contact zijn de meest waarschijnlijke oorzaken. Er is geen landelijke surveillance voor *Cryptosporidium*. Bekend is dat *Cryptosporidium*-infecties vaker voorkomen in augustus en september. De verheffing bleek lang aan te houden, namelijk tot ver in oktober (Figuur 1). Door het CIb werd, samen met een aantal GGD-en, in kaart gebracht of er mogelijk een gemeenschappelijke bron was. Internationaal werd geïnformeerd of er ook in andere Europese landen een toename werd gevonden. Dit bleek in het Verenigd Koninkrijk het geval te zijn (Figuur 2). Door het opzetten en toepassen van een moleculaire typering werd duidelijk dat het om een *Cryptosporidium hominis* infectie ging van eenzelfde type. De feces en/of DNA materialen van de patiënten werden naar het LIS/IDS gestuurd voor nadere typering. Van 18 laboratoria werden in totaal 511 monsters ontvangen. Hiervan werden 195 getypeerd als IbA10G2 (38% van totaal aantal monsters; 82 % van alle typeerbare monsters); 43 behoren tot een ander type (8% van totaal aantal monsters; 18 % van alle typeerbare monsters). Het type IbA10G2 bleek ook in het Verenigd Koninkrijk het belangrijkste subtype te zijn.

C. hominis is een *Cryptosporidium* subspecies dat zich niet zoönotisch verspreidt. Uit de case control studie is geen duidelijke oorzaak van de verheffing naar voren gekomen. Door het samenvallen met de *Salmonella Thompson* uitbraak is het niet gelukt om een grootschalige case control studie op te zetten. De beperkte studie leverde geen duidelijke aanwijzing. De afdeling epidemiologie van het Centrum voor infectieziektebestrijding (CIb) startte in 2013 een aanvullend onderzoek. Er wordt gebruik gemaakt van

Figuur 1. Leeftijds en geslachts verdeling Cryptosporidium cases in NL week 31-48 2012



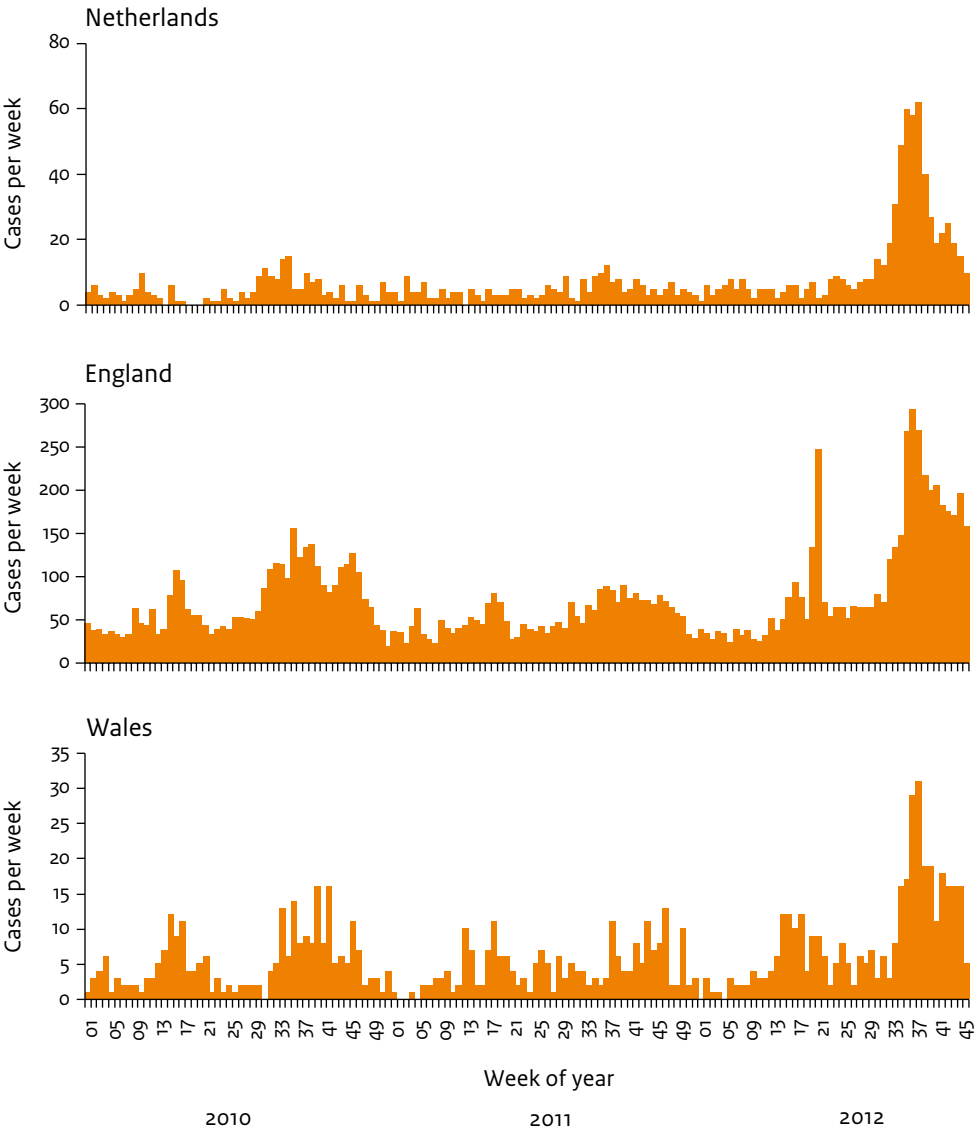
beschikbare gegevens van de laboratoria, daarnaast wordt aan de huisarts gevraagd een vragenlijst mee te geven aan een patiënt die positief is bevonden. Het laboratorium wordt gevraagd het positieve materiaal voor typering naar het CIb te sturen. Tijdens de verheffing bleek dat het beschikbare typeringssysteem arbeidsintensief en tijdrovend was. Ook al ontvingen wij reeds opgewerkt monstermateriaal van patiënten, er moest na een PCR nog een sequence reactie worden ingezet. Bovendien bleek dat meer dan de helft van de monsters niet te typeren was. Om in de toekomst sneller inzicht te hebben in welke subtypes van belang zijn, werd een andere methode opgezet die onderscheid maakt tussen een *C. hominis* en *C. parvum*. Daardoor kan bij de bestrijding bepaald worden wat de belangrijkste bron is: zoönotisch of mens- mens.

Publicaties

Hovius E, Pinelli E, Nijsse R, Poot J, and van der Giessen J. Introduction of Leishmania Species in the Netherlands from Dogs Who Are Returning from Military Missions and Vacations in Countries Where Leishmaniasis Is Endemic. *Tijdschr Diergeneeskd* 136, no. 5 (May 1 2011): 344-8.

Fournet N, Deege MP, Urbanus AT, Nichols G, Rosner BM, Chalmers RM, et al. Simultaneous Increase of Cryptosporidium Infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in Late Summer Season, 2012. *Euro Surveill* 18, no. 2 (2013).

Figuur 2. Aantal cases in NL en Verenigd Koninkrijk in 2010-2013



Virologie

Poliovirus exclusie en enterovirus surveillance

Auteur: Edin Jusic
Betrokkenen: Gökhan Uslu, Ron Altena, Kimberley Benschop, Harry Vennema, Erwin Duizer, Harrie van der Avoort
Contactpersoon: Harrie van der Avoort (harrie.van.der.avoort@rivm.nl)

In Nederland wordt enterovirus (EV) surveillance uitgevoerd om de aanwezigheid van poliovirus uit te sluiten in enterovirus-positieve patiëntmaterialen en in rioolmonsters. Daarnaast wordt enterovirus surveillance gebruikt om inzicht te krijgen in de circulerende enterovirus typen binnen Nederland (zie hiervoor ook het hoofdstuk 'Gastro-enteritis virus surveillance'). Op basis van een negatieve kweek op L20B cellen wordt poliovirus uitgesloten. L20B cellen zijn muizencellen, specifiek voor de groei van poliovirus. Als het materiaal niet te kweken is, wordt poliovirus uitgesloten met moleculaire EV typering. Deze moleculaire enterovirus typering bestaat uit de sequentie bepaling van een deel van het gen dat voor het VP1 capside eiwit codeert. De verkregen sequentie wordt vergeleken met een interne, maar openbaar toegankelijke enterovirus database (Enterovirus Genotyping Tool: http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool). Als de sequentie meer dan 85% homoloog is met sequenties van prototype stammen in de database, dan wordt een genotype toegekend dat overeenkomt met de bekende serotypering van enterovirussen.

In 2012 zijn bij LIS/IDS 519 aanvragen ontvangen voor uitsluiting van poliovirus infectie en/of enterovirus typering. Deze zijn ingestuurd door de 22 virologische laboratoria, vertegenwoordigd in de Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie. Het meest ingestuurde materiaal is feces (78% Tabel 1).

Van het totaal aantal ingezonden monsters zijn 424 monsters positief bevonden in de gebruikte semi-nested enterovirus detectie en typerings-PCR. Van deze monsters zijn er 403 getypeerd als enterovirus. In 15 monsters is poliovirus uitgesloten op basis van een negatieve kweek op L20B cellen, maar was het niet mogelijk om het enterovirus verder te typeren (gerapporteerde uitslag is dan NPEV (Non Polio Enterovirus)). Daarnaast is 1 maal een parechovirus gevonden en 5 maal een rhinovirus. Enterovirus groep B (EV-B) is in 2012 het meest aangetroffen, net als in het jaar 2011 (Figuur 1).
Rhinovirus werd in 3 van de 5 gevallen aangetroffen in fecesmonsters. Omdat deze virussen zuur gevoelig zijn vinden we nooit rhinovirus in feces bij kweek. Bij maag-passage verliezen de virussen hun effectiviteit, maar het Rhinovirus RNA kunnen we dan nog wel aantonen in de feces door middel van PCR detectie en typeringstechnieken.

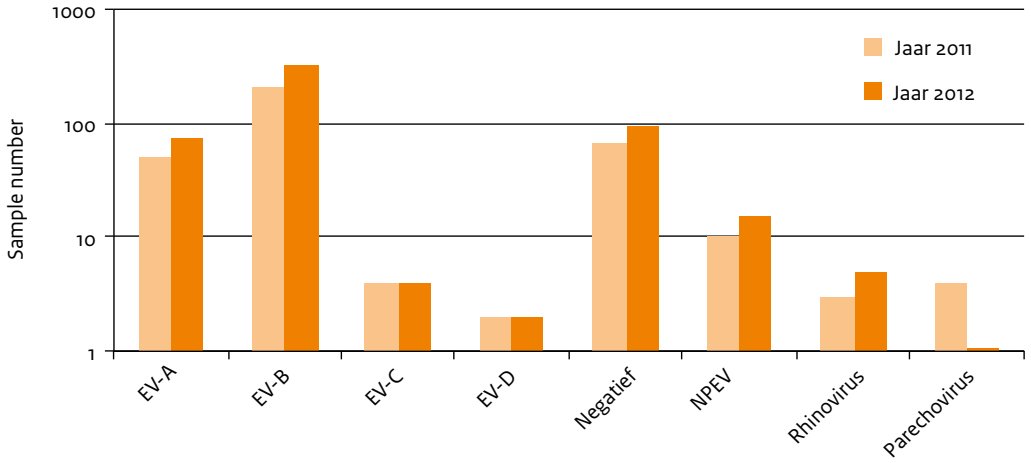
Naast klinische monsters worden ook rioolmonsters getest binnen de EV surveillance. Hiervoor worden rioolmonsters genomen bij 13 scholen met een relatief lage vaccinatie graad (lagere en middelbare scholen in de "BibleBelt"). In 2012 zijn in totaal 65 rioolmonsters van 1 liter verzameld voor uitsluiting van poliovirus. In geen enkel rioolmonster is poliovirus aangetroffen. Wel zijn 33 rioolmonsters positief bevonden voor 1 of meerdere enterovirussen. In zowel de rioolwatersurveillance als in de patiënten surveillance bleek Echovirus type 11 (35.4 %) het meest voorkomende enterovirus te zijn in 2012. In rioolwater zijn geen andere enterovirussen gevonden dan in de patiënten monsters. Uit de typeringsdata van EV surveillance en rioolwater surveillance bleken Echovirus 11 (18.5%), Echovirus 5 (14%) en Echovirus 9 (11.6%) de meest voorkomende enterovirussen in 2012 (Figuur 2). In 2011 prevaleerden voornamelijk Echovirus 25 (10.5%), Echovirus 7 (9%) en Coxsackie B3 virus (4%).

In 2012 is poliovirus gevonden in twee verlaat ingestuurde feces monsters uit 2011: een maal Poliovirus vaccin type 2 en een maal Poliovirus vaccin type 3. Het materiaal was afkomstig van kinderen van 4 en 4,5 maanden oud. Deze poliovirussen zijn niet meegenomen in tabel 1 en figuur 1 vanwege de afnamedatum in 2011, maar ze zijn wel weergegeven in figuur 2 in het HEV-C cluster.
Opmerkelijk is de detectie en sequencing van een enterovirus groep C virus (Figuur 2): het gaat hier zeer waarschijnlijk om een nieuw type enterovirus, want de sequentie is niet aan een bekend (geno)type toe te kennen op basis van clustering met bekende stammen. Verdere karakterisering van dit virus loopt nog.

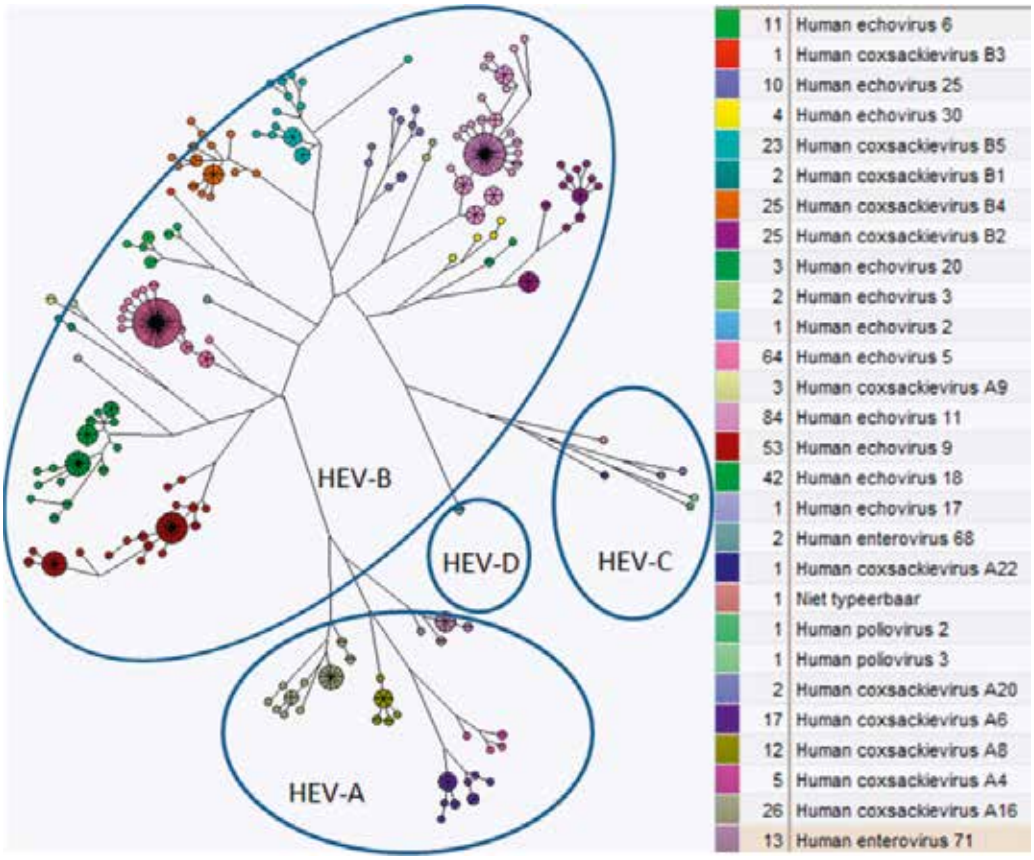
Tabel 1. Aanvragen voor uitsluiting poliovirus infectie en enterovirustypering in 2012.

Aard monster	Feces	Keeluitstrijk	Blaasvocht	Liquor	Totaal
Aantal monsters	405	33	10	71	519

Figuur 1. Resultaten van ingestuurde aanvragen voor EV surveillance weergegeven per EV groep; EV-A, B, C en D voor het jaar 2011 en 2012.



Figuur 2. Maximum parsimony tree van in 2012 op VP1 getypeerde Enterovirussen in Nederland.



Publicaties

Kroneman A, Vennema H, Deforche K, van der Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An Automated Genotyping Tool for Enteroviruses and Noroviruses. *J Clin Virol* 51, no. 2 (Jun 2011): 121-5.

Jaramillo-Gutierrez G, Benschop KS, Claas EC, de Jong AS, van Loon AM, Pas SD, et al. September through October 2010 Multi-Centre Study in the Netherlands Examining Laboratory Ability to Detect Enterovirus 68, an Emerging Respiratory Pathogen. *J Virol Methods* (Mar 1 2013).

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 Surveill* 18, no. 4 (2013): 20387.

Meijer A, van der Sanden S, Snijders BE, Jaramillo-Gutierrez G, Bont L, van der Ent CK, et al. Emergence and Epidemic Occurrence of Enterovirus 68 Respiratory Infections in the Netherlands in 2010. *Virology* 423, no. 1 (Feb 5 2012): 49-57.

Bijzondere virologische diagnostiek: zoönosen en zeldzame infecties.

Auteur: Johan Reimerink
Betrokkenen: Marjan Kuijer, Ngoc Hoa Chung, Jacinta Bakker, Sjoerd Kuijling, Ilse Zutt, Chantal Reusken, Gert-Jan Godeke, Hans Krul, Harry Vennema, Bas van der Veer, Anne-Marie van den Brandt, Erwin de Bruin, Marion Koopmans
Medische eindverantwoordelijkheid: Daan Notermans, Titia Kortbeek
Contactpersoon: Johan Reimerink (johan.reimerink@rivm.nl)

Binnen dit project wordt diagnostiek uitgevoerd voor zelden voorkomende ziekteverwekkers en waarvoor binnen de Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's) geen of onvoldoende goede alternatieven voorhanden zijn. Het is belangrijk om een landelijk dekkend diagnostisch netwerk beschikbaar te houden voor pathogenen waarvan we denken dat ze belangrijk zijn voor de volksgezondheid in Nederland. Dit om onder andere voorbereid te zijn op nieuwe bedreigingen.

In 2012 zijn meer aanvragen ontvangen ten opzichte van voorgaande jaren (Tabel 1). In de aanvragen worden wel verschuivingen waargenomen. In 2012 zijn t.o.v. voorgaande jaren minder sera getest in de arbovirus diagnostiek. Het meest opvallend is de afname van aanvragen voor dengue virus diagnostiek met 22%. Dit is waarschijnlijk te verklaren door de ingebruikname van de NS1 ELISA in enkele centra in Nederland. Wat ook opvalt, is het aantal aanvragen voor chikungunya virus. Dit is niet toegenomen in 2012, terwijl er meerdere uitbraken van dit virus worden gemeld, vooral in zuidoost Azië. Daarnaast is aangetoond dat er onder-diagnose is van deze infectie bij reizigers met koorts uit deze regio (Reusken et al. 2012). Er is een duidelijke toename in hantavirus diagnostiek, wat voor een deel veroorzaakt wordt door de uitbraak van Sin Nombre virus in Yosemite national park (VS).

Uitgelicht: Hepatitis E virus (HEV) diagnostiek

Er is een duidelijke toename in het aantal aanvragen voor HEV diagnostiek in 2012 (838) t.o.v. 2011 (695). Rond HEV is onrust ontstaan bij clinici nadat bij transplantatie patiënten chronische hepatitis werd geconstateerd. Hepatitis E is een acute, zelflimiterende ziekte die in Azië en Afrika endemisch is als humaan pathogeen, en als zoönose in overige delen van de wereld (Figuur 1). De ziekte werd voor het eerst geïdentificeerd bij een uitbraak in Kashmir, India. Een paar jaar later werd het virus ontdekt door middel van elektronen microscopie (EM) en daarna gekarakteriseerd. Het virus is de enige vertegenwoordiger van het genus *Hepevirus* binnen de familie *Hepeviridae.* Na fylogenetische analyse zijn vier genotypes (genotype 1-4) te onderscheiden. Virale hepatitis veroorzaakt door HEV is lang gezien als een reisgerelateerde hepatitis die wordt veroorzaakt door genotypes 1 en 2. Sinds medio jaren negentig worden sporadisch infecties gezien bij mensen die niet op reis zijn geweest. Hierbij gaat het om infecties met genotype 3 virussen, die nauw verwant zijn aan virussen die bij varkens gevonden worden. Ondanks de variaties in het genoom tussen de vier genotypes, wordt ervan uitgegaan dat er maar één serotype bestaat. Serologische tests zijn vooral gebaseerd op genotype 1 en 2 virussen, waardoor mogelijk het werkelijk aantal infecties wordt onderschat.

Tabel 1. Overzicht trends in aanvragen diagnostiek.

	2008	2009	2010	2011	2012
Dengue virus	263	246	346	337	264
West Nile virus	25	21	23	38	37
Tick-Born Encephalitis	26	18	24	26	36
Chikungunya virus	nvt	6	25	24	19
Totaal Arbovirussen	**314**	**292**	**418**	**425**	**355**
Hantaan virus	117	117	94	135	170
Puumala virus	129	119	96	137	168
Hantavirus PCR					14
Totaal Hantavirus	**246**	**236**	**190**	**272**	**338**
Hepatitis E ELISA	224	291	379	482	618
Hepatitis E IB	33	62	78	79	75
Hepatitis E PCR	53	104	123	134	145
Totaal Hepatitis E	**310**	**457**	**580**	**695**	**838**
Parapoxvirus PCR		5	23	11	18
Parapoxvirus typering		1	8	5	2
Herpesvirus PCR			3	1	1
Herpesvirus typering				1	1
Varicellavirus PCR			3		1
Orthopoxvirus crmB gen PCR		1			
Orthopoxvirus RDRP gen PCR		5			4
Orthopoxvirus typering		1			
Totaal Blaasjes diagnostiek	**nvt**	**13**	**37**	**18**	**27**
Totaal aanvragen	**870**	**998**	**1225**	**1410**	**1558**

Het klassieke ziektebeeld is een acute hepatitis. Daarnaast wordt sinds 2007 ook chronische infectie bij transplantatiepatiënten gezien. Grotere transplantatiecentra voeren daarom vaker de diagnostiek van HEV uit, waardoor het aantal diagnoses van (chronische) genotype 3 HEV-infecties toegenomen lijkt. Tijdens een deskundigenberaad in 2011 is dit besproken en hierbij zijn een aantal onderzoeksvragen geformuleerd ter verbetering van de diagnostiek.
Er zijn namelijk verschillende serologische tests beschikbaar, maar deze zijn onvoldoende gevalideerd voor een laag-endemisch gebied als Nederland. Uit een grondige validatie door Erasmus MC blijkt dat de beschikbare commerciële serologische tests verschillen in specificiteit en sensitiviteit.
De serologie is vanwege de tekortkomingen in vooral sensitiviteit niet afdoende bij transplantatie-patiënten en mogelijk ook bij overige immuun gecompromitteerden. Daarom wordt de diagnostiek aangevuld met RT-PCR.

Tabel 2. Positieve monsters in verschillende serologische testen en RT-PCR.

N = 150	MP-ELISA/blot	Wantai-ELISA	Beide	Totaal
IgM	7(4.7%)	7(4.7%)	6(4%)	8(5.3%)
IgG	14(9.3%)	54(36%)	13(8.7%)	55(36.7%)
PCR	5(33.3%)	5(33.3%)	5(33.3%)	5(33.3%)

De Wantai-ELISA kwam uit bovengenoemde testvergelijking als beste uit de validatie. De huidige serologische tests zijn hiermee vergeleken (Herremans et al. 2007). Hiervoor is een panel gebruikt van 150 sera die regulier zijn aangevraagd bij het RIVM voor HEV serologie. De resultaten staan weergegeven in tabel 2.

Uit deze vergelijking blijkt dat beide serologische tests voor de IgM uitslagen overeenkomstige resultaten geven. De PCR die is uitgevoerd op dit panel leverde niet meer positieve patiënten op dan de serologie, dus voor diagnostische doeleinden is de meeropbrengst gering.

Opvallend is wel dat bij de IgG respons in de Wantai test het percentage positieve sera veel hoger uitvalt dan bij de gecombineerde MP-ELISA/blot test. Dit komt overeen met het hoge percentage IgG positieve sera die gevonden zijn bij Sanquin, waar bloeddonoren getest zijn met de Wantai-ELISA. Dit percentage is veel hoger dan de seroprevalentie van 2% die wij vonden binnen de algemene populatie met behulp van de MP-ELISA en immunoblot (Verhoef et al. 2012). Dit kan betekenen dat HEV infecties vaker voorkomen dan gedacht, maar dat het dan meestal asymptomatische gevallen zijn.

Publicaties

Reusken C B, Bakker J, Reimerink J H, Zelena H, and Koopmans MG. Underdiagnosis of Chikungunya Virus Infections in Symptomatic Dutch Travelers Returning from the Indian Ocean Area. *J Travel Med* 20, no. 1 (Jan-Feb 2013): 44-6.

Herremans M, Bakker J, Duizer E, Vennema H, and Koopmans MP. Use of Serological Assays for Diagnosis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 3 Infections in a Setting of Low Endemicity. *Clin Vaccine Immunol* 14, no. 5 (May 2007): 562-8.

Verhoef L, Koopmans M, Duizer E, Bakker J, Reimerink J, and van Pelt W. Seroprevalence of Hepatitis E Antibodies and Risk Profile of Hev Seropositivity in the Netherlands, 2006-2007. Epidemiol Infect 140, no. 10 (Oct 2012): 1838-47

Figuur 1. Endemisch niveau van hepatitis E virus (bron www.cdc.gov)

Gastro-enteritis virus Surveillance

Auteur: Annemarie van den Brandt
Betrokkenen: Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Bas van der Veer, Janko van Beek, Harry Vennema, Wilfrid van Pelt, Marion Koopmans
Contactpersoon: Harry Vennema (harry.vennema@rivm.nl)

De diagnostiek van virale gastro-enteritis wordt tegenwoordig vooral verricht door MML's. Hier wordt in ieder geval getest voor norovirus (NoV) en rotavirus. Sinds enkele jaren verricht LIS/IDS de referentiediagnostiek voor de zeldzamere pathogenen. Voorbeelden hiervan zijn weinig voorkomende NoV typen, sapovirus en astrovirus (gastro-entritis virus -GEV studie) en de typering, bedoeld voor bronopsporing en transmissie onderzoek (NoroV). Een aantal MML's melden in de Virologische Weekstaten hoeveel monsters positief zijn bevonden voor norovirus en rotavirus.

Voor de GEV referentie diagnostiek zijn 603 feces monsters ingestuurd in 2012 .. In totaal is in ongeveer 24% (146) van deze monsters één of meerdere virussen gedetecteerd (11 dubbelinfecties). Van 456 aanvragen bleef de oorzaak van infectie onverklaard (Tabel 1). Dit betekent een stijging van 10% die we deels kunnen verklaren doordat de MML's beter testen op Noro- en Rotavirus. Hierdoor daalt het aantal norovirus en rotavirus positieven in de detectie. Het aantal ingezonden monsters voor de norovirus-typeringsstudie (NoroV) is daarom flink toegenomen.

Typering van Norovirus is voor 626 monsters aangevraagd in 2012. Dat is een opmerkelijke toename van 54 % ten opzichte van 2011, want het aantal NoV meldingen in de virologische weekstaten is voor beide jaren ongeveer gelijk (net onder de 3000 per jaar). Voor 535 (84%) monsters was het na confirmatie mogelijk om de typering in te zetten. Uiteindelijk zijn 334 monsters getypeerd. Norovirus typering bestaat uit amplificatie van een 330 bp lang gedeelte uit regio A (RNA dependent RNA polymerase).

Tabel 1. Overzicht detectie gastro-enteritis virussen in 2012 (abs = gevonden aantal; % is percentage van het aantal ingestuurde monsters)

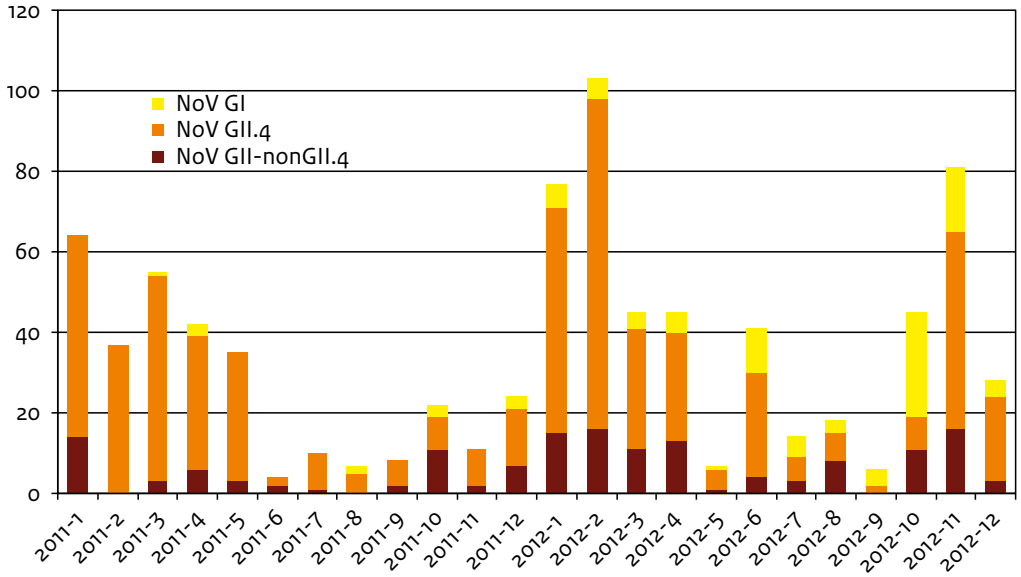
Project				
	GEV (n = 603)		NoroV (n = 626)	
gedetecteerd virus	abs	%	abs	%
Norovirus Genotype I	20	3,3	93	14,7
Norovirus Genotype II	45	7,5	418	65,7
Norovirus GII.4	14	2,3	293	46,8
Rotavirus	35	5,8	24	3,8
Sapovirus	14	2,3	niet getest	
Adenovirus	31	5,1	niet getest	
Astrovirus	12	2,0	niet getest	
Totaal virus	157	24	535	84
Geen	456	76	91	15

Daarna wordt dit amplificaat gesequencet en met behulp van de Norovirus Typing Tool op internet wordt het type bepaald (http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool). Daarnaast wordt van interessante NoV II.4 stammen de sequentie van regio C bepaald, zodat detectie van aminozuurmutaties in het capside mogelijk is.

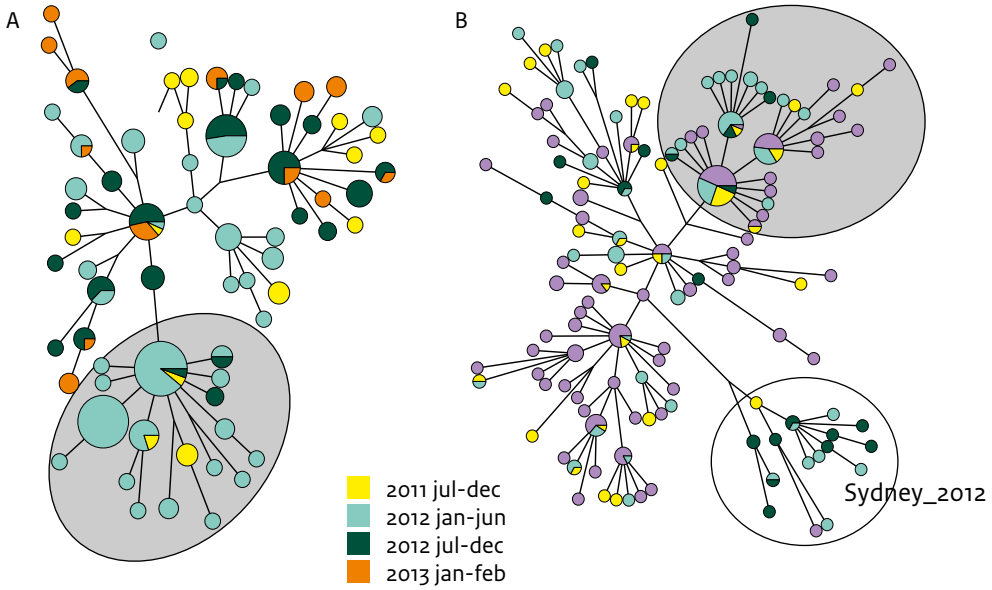
De resultaten van typering zijn weergegeven in figuur 1. Volgens verwachting ging het in ruim 70% van de gevallen om NoV genotype II.4 stammen. Hiervan was het grootste gedeelte GII.4-2010 (67%). Opmerkelijk is het aantal NoV GI detecties, wat steeg van 3,5% in 2011 naar 17.5% in 2012.

De NoroV-studie is onder andere bedoeld om vroegtijdig de opkomst van nieuwe, epidemische NoV GII.4 stammen op te sporen. In 2011 is een mutatie gevonden in regio C bij de GII.4-2010 variant. Deze mutatie bleek een aminozuurverandering tot gevolg te hebben. Dezelfde stam bleek een nieuw cluster te vormen in de regio A typering. Dit suggereerde de opkomst van een nieuwe variant met mogelijk epidemisch potentieel. In figuur 2 is de maximum parsimony tree van NoV GII.4 2010 weergegeven. Hierin is het cluster van deze variant grijs omcirkeld aangegeven. In 2012 is deze variant vooral in de eerste helft van het jaar gevonden, aangegeven in figuur 2 met een zeegroene kleur. Daarna wordt de variant nog maar een enkele keer aangetoond. Dit type heeft dus, tegen de verwachting in, niet de overhand gekregen in de NoV GII.4 2010 groep.
Een andere NoV GII.4 variant is waargenomen in het najaar van 2012. De moleculaire gegevens die gedeeld worden via het wereldwijde NoroNet, wezen op een relatie met een nieuwe NoV GII.4 variant en een stijging in het aantal NoV infecties in verschillende landen. De eerste keer dat deze variant werd gevonden was maart 2012 in Australië. Daarom werd de stam NoV GII.4- Sydney 2012 genoemd.

Figuur 1. Staafdiagram waarin aantal ingestuurde monsters per maand is weergegeven en de verdeling hiervan in Norovirus type GI, GII.4 en GII-nonGII4.



Figuur 2. Maximum parsimony tree van Norovirus GII.4 2010 varianten. A:ORF1 regio A uit Nederlandse monsters uit 2011-2012-2013. B: ORF2 regioC van sequenties uit de Noronet database van monsters uit 2011-2012.



In de maanden november en december van 2012 zijn in Nederland 15 monsters gevonden met deze nieuwe variant. In 4.5% van de NoV positieve monsters werd deze nieuwe variant gevonden die in Nederland, in tegenstelling tot in andere landen, (nog) niet de overhand heeft gekregen. Het cluster van de NoV GII.4- Sydney 2012 variant is in figuur 2B omcirkeld. In figuur 2A is deze variant niet weergegeven omdat Sydney varianten een recombinant genoom hebben en in regio A niet clusteren met GII.4.

Publicaties

van Beek J, Ambert-Balay K, Botteldoorn N, Eden JS, Fonager J, Hewitt J, et al. Indications for Worldwide Increased Norovirus Activity Associated with Emergence of a New Variant of Genotype Ii.4, Late 2012. *Euro Surveill* 18, no. 1 (2013): 8-9.

Verhoef L, Koopmans M, van Pelt W, Duizer E, Haagsma J, Werber D, et al. The Estimated Disease Burden of Norovirus in the Netherlands. *Epidemiol Infect* (May 17 2012): 1-1

Genotypering hepatitis A

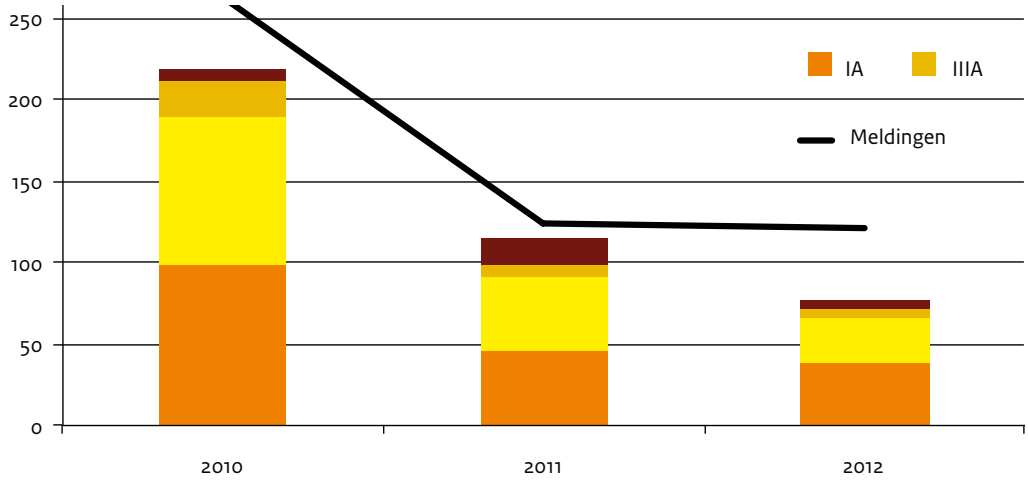
Auteur: Jeroen Cremer
Betrokkenen: Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Linda Verhoef, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt, Harry Vennema, Wilfrid van Pelt, Mariska Petrignani (GGD), Marion Koopmans
Contactpersoon: Harry Vennema (harry.vennema@rivm.nl)

De hepatitis A kiemsurveillance is een samenwerking van het LIS/IDS en de GGD 'en. Het beleid van de GGD voor hepatitis A bestrijding wordt ondersteund door genotypering van Hepatitis A virus (HAV).
De bestrijding bestaat uit twee delen:

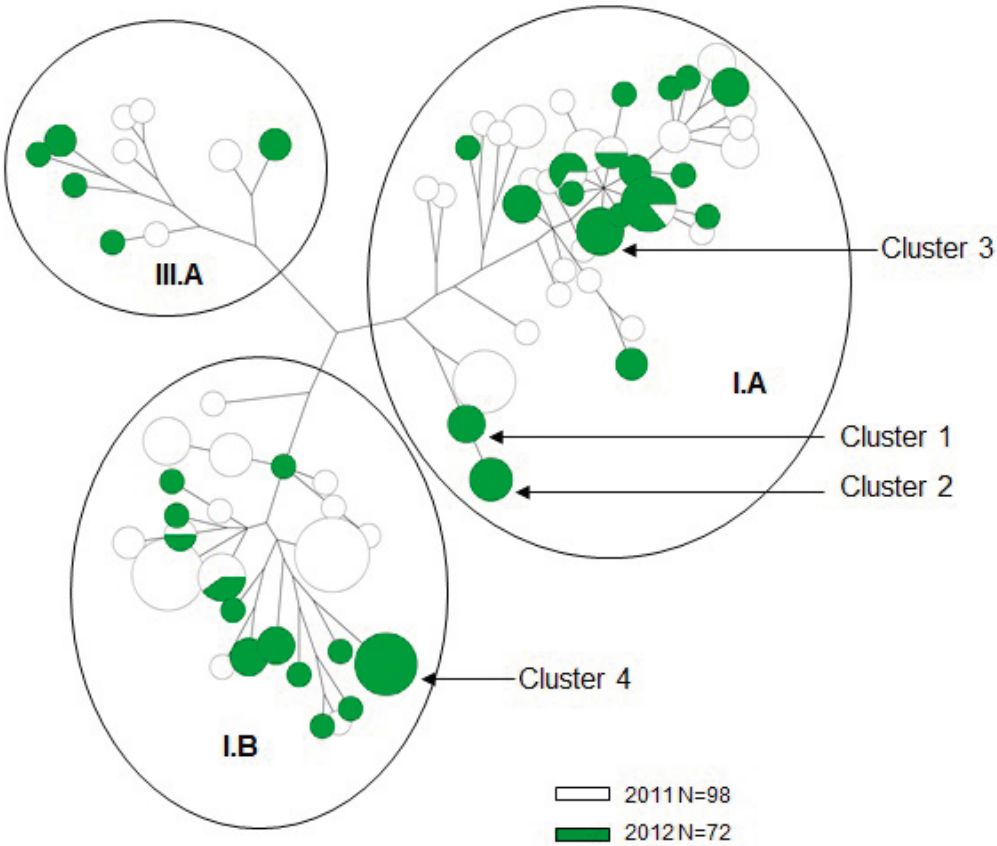
- Beperken van spreiding van het virus in een uitbraak d.m.v. vaccinatie beleid.
- Onderzoek naar de bronnen van HAV infecties.

Kinderen hebben vaak geen symptomen. Als er dus veel kinderen betrokken zijn bij een uitbraak, bestaat de kans op ongemerkte verspreiding. De bestrijding door beperking van spreiding in een uitbraak situatie kan ondersteund worden door middel van moleculaire diagnostiek. Daarvoor worden zowel in Nederland als in een aantal andere landen in Europa virussen van nieuw gediagnosticeerde hepatitis A patiënten getypeerd, zodat inzicht wordt verkregen in de verspreiding van HAV in Europa. Het LIS/IDS heeft in 2012 van 40 laboratoria en ziekenhuizen 147 monsters ontvangen voor typering. Dat aantal is lager dan de 295 monsters uit 2011. Dit is opmerkelijk omdat het aantal Osiris meldingen in beide jaren ongeveer gelijk is gebleven (123 meldingen in 2011 en 121 in 2012) (Figuur 1). Op het moment van bloedafname waren 76 van de 147 (52%) serum/ feces monsters positief in de detectie-PCR. Dat betekent dat deze sera op dat moment nog viremisch waren. Van 72 (95%) monsters was het mogelijk om ze te typeren. Hiervoor werd de sequentie bepaald van een 460 nucleotiden lang deel van de VP1/2A regio van het virus. Vanwege te lage virale loads was het niet mogelijk om van de overige 4 monsters (5%) een type te bepalen (d.w.z. Cp > 34 cycli).

Figuur 1. Aantal hepatitis A meldingen in Osiris en het aantal HAV typeringen over de laatste 3 jaar.



Figuur 2. Hepatitis A: Basic maximum parsimony tree van het VP1/2A gebied (460nt). Van Hepatitis A virussen van casussen uit 2011 en 2012. De kleinste bolletjes staan voor 1 unieke sequentie, hoe groter de bollen hoe meer identieke sequenties erbinnen vallen.



In 2012 zijn 36 unieke sequenties gevonden die in clusters van 1 tot 9 patiënten zijn weergegeven (Figuur 2). Sommige clusters komen in beide jaren voor, wat zichtbaar is door twee kleuren in één bol. Andere clusters komen alleen in 2011 of 2012 voor. De database met achtergrond sequenties bestaat uit sequenties die gedeeld worden tussen meerdere labs in Europa en gepubliceerde sequenties uit GenBank. Door te vergelijken met deze sequenties, kunnen de gevonden sequenties voor een groot deel geclusterd worden in een regio, land van herkomst of een risicogroep.

Toelichting van enkele grotere clusters uit 2012

Cluster 1 en 2: In 2012 vonden twee voedsel gerelateerde uitbraken plaats. Mosselen waren een mogelijke bron. Het gaat in beide clusters om genotype IA maar ze zijn redelijk aan elkaar verwant (slechts 1 nucleotide verschil in 460nt). Verder onderzoek is nodig om de bron te achterhalen.

Cluster 3: Dit cluster is waarschijnlijk ontstaan op een familie feest. Vijf bezoekers met een leeftijd tussen de 4 en 30 jaar zijn positief bevonden. Zij zijn mogelijk besmet door zelf bereid voedsel of voedsel dat besmet is gekocht

Cluster 4: Dit cluster geeft een uitbraak weer op een basisschool. Het gaat om acht kinderen tussen de 4 en 12 jaar en een volwassen persoon van 44 jaar. Binnen een periode van 2 maanden is het bloed afgenomen.

Hepatitis A typering kan dus inzicht geven in de bronnen van HAV infecties. Er zijn geen grote verschillen in genotypen prevalenties ten opzichte van 2011, maar opmerkelijk is dat een aantal voedsel gerelateerde clusters werd gevonden.

Publicaties

Verhoef L, Koopmans M. Hepatitis A infectie: een risico in Nederland? Infectieziekten Bulletin, oktober 2012

Suijkerbuijk AW, Lugner AK, van Pelt W, Wallinga J, Verhoef LP, de Melker HE, et al. Assessing Potential Introduction of Universal or Targeted Hepatitis a Vaccination in the Netherlands. *Vaccine* 30, no. 35 (Jul 27 2012): 5199-205.

Havelaar AH, Haagsma JA, Mangen MJ, Kemmeren JM, Verhoef LP, Vijgen SM, et al. Disease Burden of Foodborne Pathogens in the Netherlands, 2009. *Int J Food Microbiol* 156, no. 3 (Jun 1 2012): 231-8.

Fournet N, Baas D, van Pelt W, Swaan C, Ober H, Isken L, et al. Another Possible Food-Borne Outbreak of Hepatitis a in the Netherlands Indicated by Two Closely Related Molecular Sequences, July to October 2011. *Euro Surveill* 17, no. 6 (2012).

Verhoef L, Boot HJ, Koopmans M, Mollema L, Van Der Klis F, Reimerink J, et al. Changing Risk Profile of Hepatitis a in the Netherlands: A Comparison of Seroprevalence in 1995-1996 and 2006-2007. *Epidemiol Infect* 139, no. 8 (Aug 2011): 1172-80.

Emerging infections en ondersteuning bij grote/bijzondere uitbraken; Schmallenberg virus, Sin Nombre virus en humaan coronavirus-EMC.

Auteur: Chantal Reusken
Betrokkenen: Johan Reimerink, Gert-Jan Godeke, Ankje de Vries, Marjan Kuijer, Sjoerd Kuijling, Ngoc Hoa Chung, Ilse Zutt, Jacinta Bakker, Hans Krul, Adam Meijer, Marcel Jonges, Shireen Jenny, Piet Overduin, Bas van der Veer
Medische eindverantwoordelijkheid: Daan Notermans, Titia Kortbeek
Contactpersoon: Chantal Reusken (chantal.reusken@rivm.nl)

Het is inherent aan het thema "emerging infections"dat regelmatig acuut moeten worden ingesprongen op nieuwe ontwikkelingen. Voor de virologie zijn er vele voorbeelden. Van infecties die zich afspelen in (sub)tropische regio's en via reizigers kunnen worden geïmporteerd, tot plotseling opduikende infecties met nieuwe pathogenen in Nederland of in reizigersbestemmingen. In 2012 is onder andere laboratorium ondersteuning geboden bij drie uitbraak situaties.

Uitbraak met het nieuwe Schmallenbergvirus onder herkauwers in Nederland

In 2011 werd een nieuw virus ontdekt bij runderen die in de nazomer last hadden van diarree, koorts en verminderde melkgift. Dit virus kreeg de naam Schmallenbergvirus (SBV). Daarnaast kwam sinds december 2011 een ongewoon hoog aantal meldingen van misvormd geboren lammeren en kalveren binnen bij de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD). De meldingen kwamen uit heel Nederland. Het Centraal Veterinair Instituut stelde vast dat SBV de veroorzaker was van de problemen. SBV behoort tot het genus van de Orthobunyavirussen in de familie van de Bunyaviridae. Van een aantal van deze

Figuur 1. *Peromyscus maniculatis* (Hertmuis), de verspreider van het Sin Nombre hantavirus in de Verenigde Staten.

virussen is bekend dat zij typische congenitale afwijkingen veroorzaken als zij herkauwers tijdens de dracht infecteren. De orthobunyavirussen worden overgedragen door knutten en/of steekmuggen (Scholte et al., in press). Het CIb maakte in December 2011 een inschatting van de humane risico's van SBV (Reusken C., and Koopmans M., 2012). Op basis van de beschikbare gegevens werd een infectie van de mens met SBV niet uitgesloten.
Daarom is met spoed moleculaire diagnostiek voor SBV geïmplementeerd en een virus-neutralisatie test opgezet voor serologisch bepalingen. Hiermee is diagnostiek uitgevoerd en een serologische studie onder veehouders en dierenartsen om humane infecties met SBV uit te sluiten.
In 2012 zijn er in totaal 7 diagnostiek aanvragen geweest voor SBV, waarvan 2 uit het buitenland. Alle resultaten waren negatief. De serosurvey bij deze potentieel hoog blootgestelde groep gaf geen aanwijzingen voor een infectie ten gevolge van het virus. Met dit onderzoek werd aangetoond dat het zeer onwaarschijnlijk is dat het virus een infectie bij de mens veroorzaakt (Reusken C. et al., 2012).

Uitbraak met Sin Nombre hantavirus in Yosemite National Parc, VS

Eind Augustus 2012 meldde het Yosemite National Park in Californië (VS) een uitbraak van hantavirus pulmonair syndroom (HPS) onder zijn bezoekers. De infecties met het Sin Nombre hantavirus (SNV) waren gerelateerd aan een verblijf in de zogenaamde Signature Tent Cabins in Curry Village, Yosemite in de periode 10 juni - 24 augustus 2012.
SNV komt in Californië endemisch voor. Hertmuizen vormen het reservoir van dit virus. Vooral in kleine, matig geventileerde ruimten zoals tenten vindt overdracht plaats naar de mens . Dit komt door het inademen van aerosolen met ingedroogde muizenurine of – feces. Na de incubatieperiode (meestal 2 tot 4 weken), ontstaan eerst griepachtige verschijnselen (koorts, hoofdpijn, spierpijn, malaise, en ook misselijkheid, braken en buikpijn). Vervolgens kunnen 2-6 dagen na aanvang van deze verschijnselen respiratoire symptomen ontstaan (benauwdheid, hoesten). In sommige gevallen leidt dit tot het ernstige adult respiratory distress syndrome (ARDS) met pulmonaal oedeem en hartfalen. Dit is het hanta pulmonaire syndroom (HPS). HPS heeft een mortaliteit van circa 35%. In de zomer van 2012 zijn in totaal 10 Amerikaanse bezoekers van Yosemite getroffen door SNV. Hiervan zijn 3 mensen overleden.

Naar aanleiding van de eerste geïdentificeerde ziektegevallen zijn alle geregistreerde personen die in juni-augustus 2012 in Yosemite verbleven, door de parkautoriteiten geattendeerd op een mogelijke blootstelling aan SNV. Hieronder bevonden zich ook tientallen Nederlanders. Mensen die binnen 6 weken na hun verblijf in Yosemite griep-achtige verschijnselen ontwikkelden, kregen van het RIVM-CIb het advies om zich te melden bij hun GGD. Op basis van deze ontwikkelingen is met spoed SNV serologische diagnostiek geïmplementeerd en ingezet in combinatie met de al aanwezige moleculaire detectie methoden. In totaal zijn er 49 Nederlanderse bezoekers getest op een infectie met het SNV en de testresultaten waren allemaal negatief.

Opduiken nieuw humaan coronavirus in het Midden-Oosten

Eind september 2012 berichtten onderzoekers van het Erasmus MC over een nieuw humaan coronavirus dat geïdentificeerd werd in een overleden patient uit Saudi-Arabië met ARDS. Twee dagen later kwam de melding van Britse onderoekers over de aanwezigheid van dit zelfde virus in een patiënt uit Qatar. Deze werd voor identieke symptomen behandeld op een intensive care unit. Door deze meldingen ontstond een snelle gezamenlijke internationale laboratorium respons. Hierdoor waren binnen 1 week na de eerste melding moleculaire diagnostiek en referentie materialen beschikbaar en deze diagnostiek is geïmple-

menteerd bij het LIS/IDS. Bij zes personen is in 2012 moleculaire diagnostiek verricht voor het nieuwe coronavirus. Deze personen hadden (ernstige) respiratoire klachten die zich binnen 14 dagen na terugkeer uit het Midden-Oosten ontwikkelden. Alle testresultaten waren negatief.

Eind mei 2013 zijn er 44 bevestigde humane infecties met het virus gemeld waarvan 22 met een dodelijke afloop. Het bleek dat 15 patiënten blootgesteld zijn in het Midden-Oosten (Saudi-Arabië, Qatar, Jordanië, Abu Dhabi) en dat 2 Britse patiënten geïnfecteerd zijn na contact met een familielid dat ziek terugkeerde uit Saudi-Arabië. De klinische manifestiaties waren mild bij slechts twee van de bevestigde gevallen. Het is onduidelijk wat de omvang is van humane infecties met dit nieuwe coronavirus . Dit geldt ook voor het bijbehorende spectrum aan klinische manifestaties. Er zijn duidelijke aanwijzingen voor insectivore vleermuizen als bron voor dit nieuwe virus. Het is nog onduidelijk of mensen direct vanuit de vleermuizen worden geïnfecteerd, of via een tussengastheer zoals landbouwhuisdieren. Voor het vergroten van inzicht in de epidemiologie van dit virus zijn specifieke serologische tests nodig. Deze moeten in staat zijn om infecties met het nieuwe coronavirus te onderscheiden van infecties met de algemeen voorkomende humane coronavirussen. In samenwerking met de Universiteit Utrecht (UU), het ErasmusMC(EMC), Amsterdam Medical Centre (AMC) en de Universiteit van Bonn wordt gewerkt aan een dergelijke specifieke serologische assay.

Publicaties

Scholte EJ, Mars MH, Braks M, Den Hartog W, Ibanez-justicia A, Koopmans M, et.al. “No evidence for the persistence of Schmallenberg virus in overwintering mosquitoes (Diptera: Culicidae). Med. Vet. Ent. In press

Reusken C, van den Wijngaard C, van Beek P, Beer M, Bouwstra R, Godeke GJ, et al. Lack of Evidence for Zoonotic Transmission of Schmallenberg Virus. Emerg Infect Dis 18, no. 11 (Nov 2012): 1746-54.

Reusken C, Koopmans M. Human risk profile Schmallenberg virus. http://www.onehealthportal.nl/media/2815/risk%20profile%20humaan%20schmallenbergvirus%20def%20version%20211211.pdf

Humaan papillomavirus studies

Auteur: Elske van Logchem
Betrokkenen: Marion Koopmans, Audrey King, Hein Boot †, Elske van Logchem, Jason Mensah, Jan Sonsma, Madelief Mollers, Marianne van der Sande, Hester de Melker
Contactpersoon: Audrey King (audrey.king@rivm.nl)

Baarmoederhalskanker wordt veroorzaakt door het humaan papillomavirus (HPV). Van dit virus bestaan veel verschillende typen, waarvan de zogeheten hoog-risico typen kanker kunnen veroorzaken. HPV16 en HPV18 zijn verantwoordelijk voor 70% van alle gevallen van baarmoederhalskanker. Op advies van de Gezondheidsraad is HPV16/18-vaccinatie opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma (RVP). Meisjes van 12 jaar oud ontvangen het Cervarix® vaccin volgens een 0, 1 en 6 maanden schema. In 2009 is gestart met een inhaalcampagne voor meisjes geboren in 1993-1996 en vanaf 2010 kunnen 12-jarige meisjes zich via het RVP laten vaccineren tegen HPV.

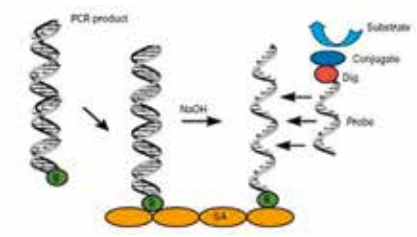
Het RIVM-CIb is verantwoordelijk voor de monitoring van het HPV vaccinatie programma. Met behulp van studies onder verschillende risicopopulaties kan de impact van de HPV-vaccinatie op het vóórkomen van HPV virussen in Nederland gevolgd worden (bv. jonge meisjes van 14-16 jaar (HAVANA studie), Soa poli bezoekers (m/v 16-24 jaar, vrouwen die mee doen met Chlamydia screening (v, 16-29 jr.) en mannen die seks hebben met mannen (≥18 jaar)).

De afdeling LIS/IDS is betrokken bij de coördinatie van deze studies en is verantwoordelijk voor HPV detectie en genotypering binnen deze studies. De HPV detectie en genotypering in deze studies wordt uitgevoerd door verschillende Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's) en het LIS/IDS. In alle betrokken laboratoria worden de bepalingen identiek uitgevoerd volgens een vaststaand protocol.

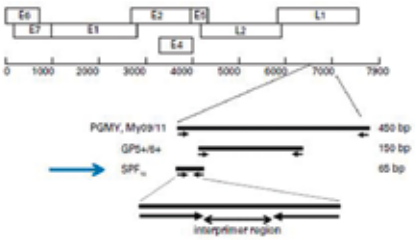
HPV detectie en genotypering

Uit de vaginale/peniele/anale swabs wordt het DNA geïsoleerd met behulp van de MagNa Pure (Roche). Met behulp van Short PCR Fragment 10 (SPF10) primers wordt een stuk van slechts 65 bp geamplificeerd. HPV-specifieke amplificaten worden gedetecteerd met een DNA Enzyme Immuno Assay (DEIA) (Figuur 1). De HPV positieve monsters worden getypeerd d.m.v. een Line Probe Assay (LiPA). Door de korte fragmenten is dit een gevoelige HPV-detectiemethode (Figuur 1)

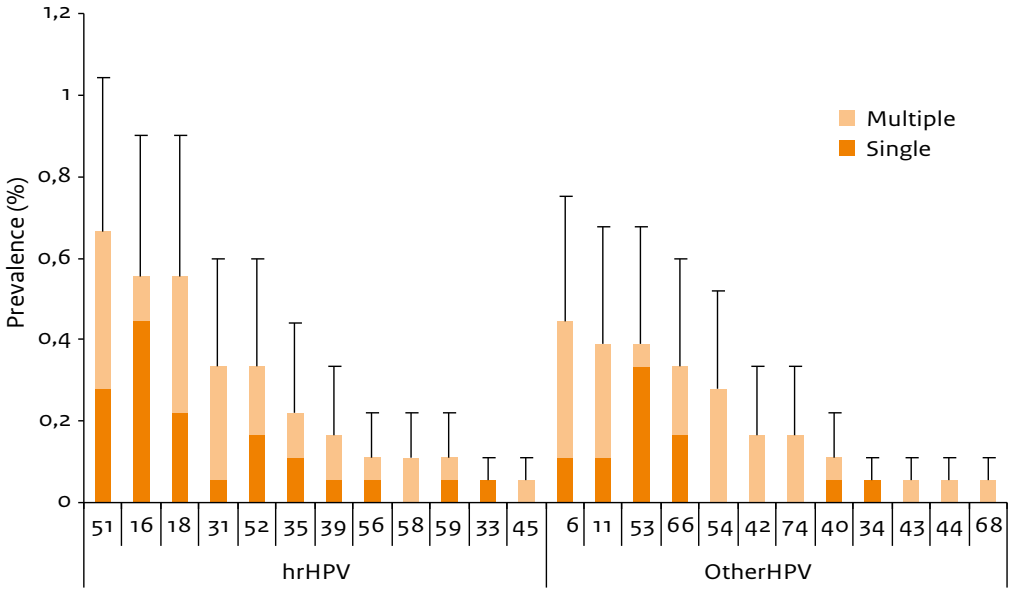
Figuur 1a. SPF10 PCR ontwikkeld door DDL diagnostic Laboratory.



Figuur 1b. DNA Enzyme Immuno Assay.



Figuur 2. Prevalentie van de verschillende HPV genotypes in het eerste jaar van de HAVANA studie (R0), verdeeld in hoog risico HPV types (hrHPV, links) en andere HPV types (rechts). In de grafiek is ook een onderverdeling in enkelvoudig positieve testen of meervoudig positieve testen te zien.



Kwaliteitscontrole

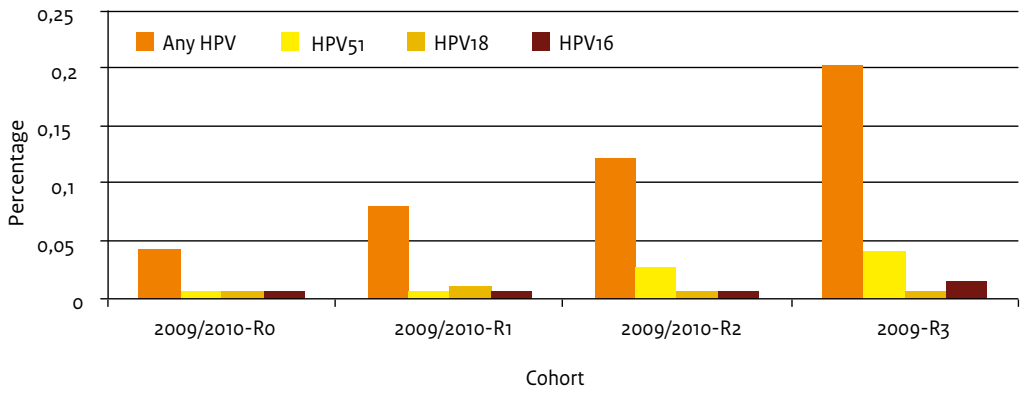
Om de kwaliteit van deze methode te waarborgen, voert het LIS/IDS jaarlijks verschillende kwaliteitscontroles uit in de vorm van HPV-DNA proficiency panels van de WHO en QCMD. De detectiescore van het QCMD panel 2012 was 100% op core-samples. Een her-test wordt uitgevoerd waarmee de variatie tussen de verschillende MML's bepaald kan worden. Hiervoor wordt 5% van alle monsters uit de verschillende studies her-test.

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

In 2012 zijn ca. 1350 monsters uit de HAVANA studie getest. Het doel van deze studie is type- specifieke HPV infecties monitoren vóór en kort na introductie van het vaccin. Voor deze studie hebben 1800 meisjes in de leeftijd van 14-16 jr. onder andere een vragenlijst ingevuld in 2009 (in 2 verschillende cohorten). Daarnaast hebben zij een vaginale zelf-swab afgenomen, waarin met bovenstaande methode de HPV-DNA status is bepaald. Van de deelnemende meisjes in 2009 was 55% gevaccineerd en 45% niet gevaccineerd. Sinds 2009/2010 worden deze meisjes jaarlijks gevolgd.

In het eerste jaar (2009/2010-R0) werd bij 4.4% van de meisjes type specifiek HPV-DNA gedetecteerd. Bij 2.7% van deze meisjes ging het om een hoog risico HPV type (hrHPV). De drie meest voorkomende types waren hrHPV type 16 (0.54%), 18 (0.54%) en 51 (0.66%). In figuur 2 is de prevalentie weergegeven van de verschillende hoog- en laag risico HPV types.

Figuur 3: Prevalentie van type specifieke HPV-DNA (any HPV), HPV16, HPV18 en HPV51. De resultaten van 2010-R3 zijn nog niet bekend.



In het vervolgjaar (2009/2010-R1) namen nog 1513 meisjes deel aan de studie. Bij 8% (n = 121) van deze meisjes is type specifiek HPV-DNA gedetecteerd, waarvan 0.59% (n = 9) HPV16, 0.99% (n = 15) HPV18 en 0.66% (n = 10) HPV51 positief waren. De lichte stijging in de percentages HPV16 en 18 positieven is deels te verklaren door het seksueel debuut van de meisjes. In het derde jaar (2009/2010-R2) was het aantal deelneemsters gedaald naar 1386. Bij 12.3% (n = 171) is type specifiek HPV-DNA gevonden. De HPV16, HPV18 en HPV51 positiviteit was gestegen naar respectievelijk 0.65% (n = 9), 0.58% (n = 8) en 2.7% (n = 37). Van het vierde jaar is een deel van de groep getest 2009-R3 (n = 808). Bij 20% (n = 164) is type specifiek HPV-DNA aangetroffen, waarvan 1.5% (n = 12) HPV16, 0.6% (n = 5) HPV18 en 4.2% (n = 34) HPV51 positief waren (Figuur 3). Persisterende/langdurige (2 jaar of meer) HPV16 en -18 infectie werd alleen gevonden in ongevaccineerde meisjes of meisjes die vóór vaccinatie al positief waren voor HPV16 en of -18.

Publicaties

Mollers M, Scherpenisse M, van der Klis FR, King AJ, van Rossum TG, van Logchem EM, et al. Prevalence of Genital Hpv Infections and Hpv Serology in Adolescent Girls, Prior to Vaccination. *Cancer Epidemiol* 36, no. 6 (Dec 2012): 519-24.

Genotypering hepatitis B virussen

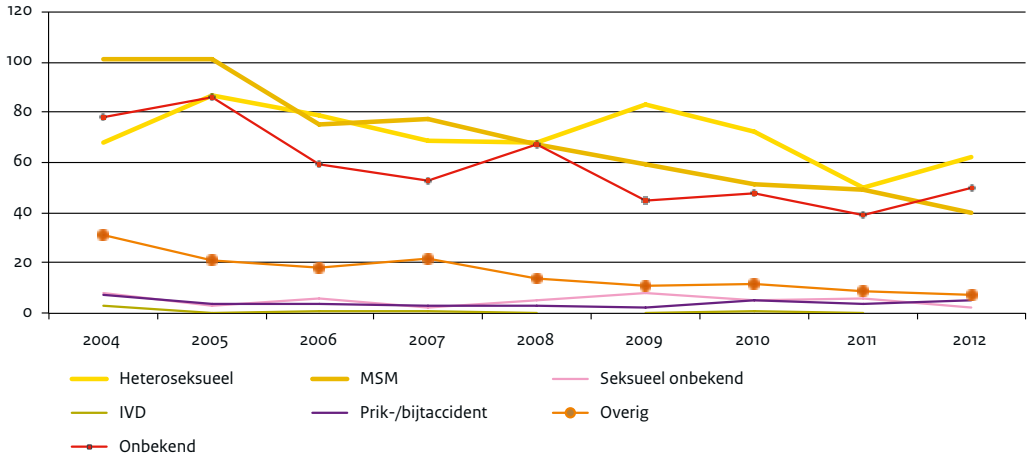
Auteur: Jeroen Cremer
Betrokkenen: Hein Boot †, Jeroen Cremer, Audrey King, Marion Koopmans, Susan Hahné, Femke Koedijk, Françoise van Heiningen en Loes Soetens
Contactpersoon: Audrey King (audrey.king@rivm.nl)

Aantal ingezonden hepatitis B positieve sera:
Acuut: 2012 = 150 [2011 = 93; 2010 = 85; 2009 = 122; 2008 = 136]
Chronisch: 2012 = 6 [2011 = 6; 2010 = 18]

Relevantie van genotypering:
Bron- en contactopsporing
Immuun-escape mutanten
Antivirale resistentie
Effectiviteit huidige vaccinatiecampagnes

Genotypering van hepatitis B wordt uitgevoerd om meer kennis te verkrijgen over de diversiteit van de hepatitis B virus-populatie in Nederland. Daarmee wordt de bestrijding ondersteund. In 2012 zijn 150 meldingen binnengekomen van acute hepatitis B in Nederland. Dit is ongeveer gelijk aan 2011 (153 meldingen). Ten opzichte van 2011 is het aantal meldingen onder mannen die seks hebben met mannen (MSM) in 2012 iets gedaald (Figuur 1). Daar tegenover staat het aantal meldingen waarbij heteroseksuele contacten de meest waarschijnlijke overdrachtsroute zijn voor acute HBV. Dat aantal is dit jaar toegenomen (Figuur 1). De monsters zijn getypeerd door de S- (656nt) en C-regio (655nt) van het hepatitis B virus te sequencen. We zien geen opvallende verschuiving in de verdeling over de verschillende genotypen.

Figuur 1a. De absolute bijdrage van hepatisis B transmissie route.

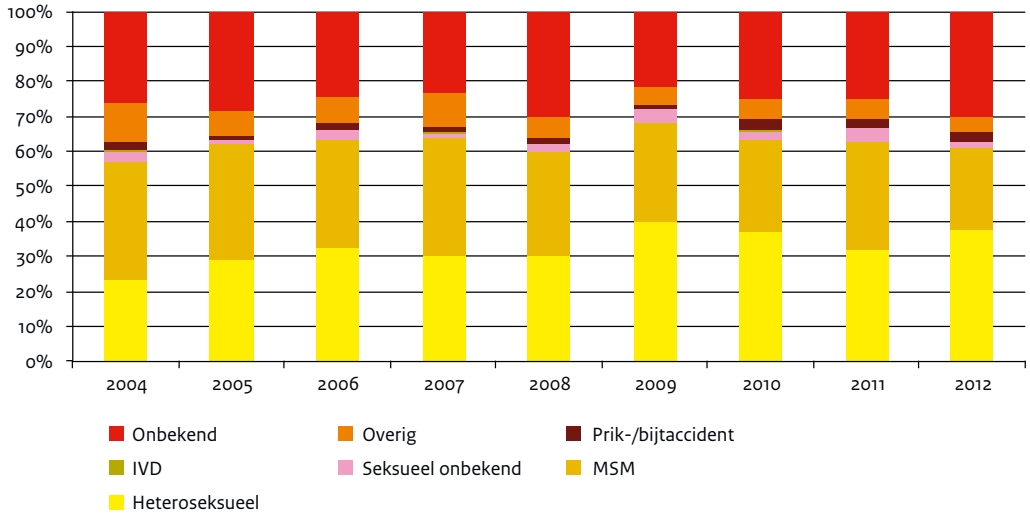


Het genotype A cluster 2 (Figuur 2) is wederom het grootste cluster (n = 34). Dit cluster werd in het verleden vooral geassocieerd met transmissie door homoseksuele contacten, maar voor deze stam neemt sinds enkele jaren het aandeel van MSM overdracht af. In 2012 zijn in dit cluster de drie grootste groepen de heteroseksuele contacten (n = 10), homoseksuele contacten (n = 9) en transmissie onbekend (n = 9). De toenemende trend van heteroseksuele contacten in dit cluster blijft zich voortzetten. Daarnaast wordt deze stam vaker gevonden bij vrouwen (data niet getoond).

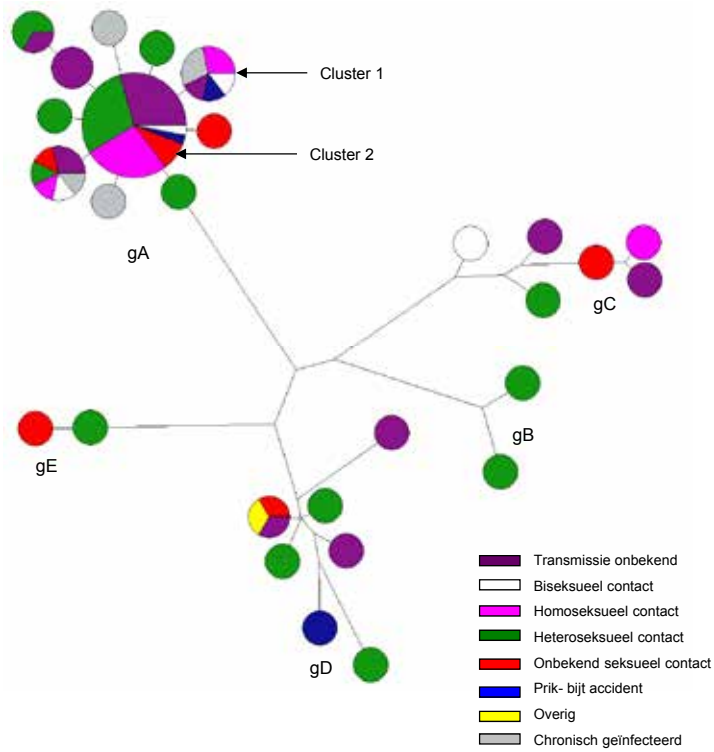
Cluster 1: In Oost Nederland is eind 2009 een variant geïdentificeerd van een genotype A virus wat nog niet eerder gevonden is in Nederland. Virussen met deze sequentie zijn ook niet eerder gerapporteerd in het buitenland (Figuur 2). In 2012 is een cluster waarneembaar van twintig gevallen binnen een kleine geografische regio. De verspreiding vindt plaats onder mannen tussen de zesenveertig en tachtig jaar. De besmettingsroute is voornamelijk via seksueel contact. Aanvankelijk ging het vooral om heteroseksueel contact maar later in de epidemie raakten ook MSM geïnfecteerd. Er zijn dit jaar wel twee mensen gevonden die chronisch geïnfecteerd zijn met deze stam.

Naast acute HBV isolaten worden ook isolaten van chronische HBV patiënten getypeerd die tot een gedrag gebonden risicogroep behoren en in aanmerking komen voor gratis HBV-vaccinatie. Dit jaar hebben we vijf stammen getypeerd die afkomstig zijn van chronische HBV patiënten (Figuur 2, weergegeven in grijs). Er zijn twee unieke stammen gevonden en drie stammen die clusteren met acute stammen (Figuur 2). Het aantal chronische HBV stammen is nog te klein om conclusies te trekken over de relatie met acute HBV-stammen.

Figuur 1b. De relatieve bijdrage van een bepaalde transmissie route.



Figuur 2. Basic maximum parsimony tree van hepatitis B virus sequenties van acute HBV (n = 73) en chronische HBV (n = 5) gevallen uit Nederland, 2012, onderverdeeld naar waarschijnlijke transmissieroute, gebaseerd op de sequentie van de S-regio.



Publicaties

Hahne SJ, de Melker HE, Kretzschmar M, Mollema L, van der Klis FR, van der Sande MA, et al. Prevalence of Hepatitis B Virus Infection in the Netherlands in 1996 and 2007. Epidemiol Infect 140, no. 8 (Aug 2012): 1469-80.

Zaaijer HL, Boot HJ, van Swieten P, Koppelman MH, and Cuypers HT. Hbsag-Negative Mono-Infection with Hepatitis B Virus Genotype G. *J Viral Hepat* 18, no. 11 (Nov 2011): 815-9.

van de Klundert MA, Cremer J, Kootstra NA, Boot HJ, and Zaaijer HL. Comparison of the Hepatitis B Virus Core, Surface and Polymerase Gene Substitution Rates in Chronically Infected Patients. *J Viral Hepat* 19, no. 2 (Feb 2012): e34-40.

Hahne S, van den Hoek A, Baayen D, van der Sande M, de Melker H, and Boot H. Prevention of Perinatal Hepatitis B Virus Transmission in the Netherlands, 2003-2007: Children of Chinese Mothers Are at Increased Risk of Breakthrough Infection. *Vaccine* 30, no. 9 (Feb 21 2012): 1715-20.

Koedijk FDH, van der Sande MAB, Hahné SJM. Aangifte acute hepatitis B in 2010.Infectieziekten Bulletin, No 22 (Dec 2011): 366-369

Hahné S. Epidemiology of Hepatitis B virus infection in the Netherlands and beyond. PhD thesis, (Dec 2012). download: http://igitur-archive.library.uu.nl/dissertations/2012-1129-200724/UUindex.html

Eerste evaluatie van TypeNed; Surveillance 2010 en 2011

Auteur: Kimberley Benschop
Betrokkenen: Marion Koopmans, Harry Vennema, Annelies Kroneman, Harrie van der Avoort, Eric Claas, Bert Niesters, Katja Wolthers, Kimberley Benschop, Martin Schutten, Rob Schuurman, Suzan Pas, Janette Raham-Langendoen
Contactpersoon: Kimberley Benschop (kimberley.benschop@rivm.nl)

TypeNed is een initiatief van een aantal Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's) en het LIS/IDS. Het doel is om typeringsmethoden op elkaar af te stemmen, afspraken te maken over referentielaboratorium functies en het delen van data. Met de gegevens van verschillende laboratoria kunnen zowel vraagstellingen op ziekenhuis- of patiëntniveau, als (inter)nationale vraagstellingen beter beantwoord worden.

Voor TypeNed virologie is een pilot gestart voor norovirus (NoV) en enterovirus (EV) door 4 MML's en het RIVM. Typeringsprotocollen zijn met elkaar vergeleken en er is een minimum dataset gedefinieerd, bestaande uit sequenties, patiënten data, klinische- en epidemiologische gegevens. Voor het delen van data en de analyse wordt gebruik gemaakt van het moleculair platform. Dit moleculaire platform is ontwikkeld op het RIVM. Binnen deze software zijn voorzieningen gemaakt voor toegangsbeheer, worden de sequenties automatisch getypeerd door de typing tool, en zijn enkele analyse- en visualisatie modules ontwikkeld.

De eerste evaluatie gaat over de EV data van 2010 en 2011 die zijn gesubmit in Typened. Hierbij is een vergelijking gemaakt met de reguliere EV surveillance in die jaren, die gebaseerd is op virale kweek en typering. Voor EV is er naast (inter)nationale moleculaire surveillance meestal ook een lokale vraagstelling voor typering, zoals uitsluiting van polio of andere diagnostiek. Omdat alle laboratoria in grote lijnen hetzelfde protocol gebruiken zijn de EV typeringsdata goed te vergelijken.

Van 624 patiënten werd de enterovirus stam geïsoleerd uit klinisch materiaal en de VP1 sequentie geüpload. De verdeling van de 4 EV species (A-D) over de EV stammen was vergelijkbaar met de reguliere surveillance. In 2010 werden zowel binnen Typened als in de surveillance rapporten CV-A9, EV71 en ECHO30 frequent waargenomen. In 2011 waren ECHO 7 en ECHO25 de dominante stammen. EV-B stammen werden het meest gerapporteerd (72%), gevolgd door EV-A stammen (25%). Binnen Typened werden ook de 3 vaccin stammen gevonden, die eerder gerapporteerd waren in de polio surveillance (2 OPV2 stammen en 1 OPV3 stam). Deze drie stammen zijn geïsoleerd uit kinderen uit de Antillen, waar nog steeds met OPV wordt gevaccineerd.

De gemiddelde leeftijd van de EV positieve patiënten was 3.4 jaar (mediaan 2 maanden). Patiënten met een EV-B stam waren gemiddeld 3.8 jaar oud (mediaan 2 maanden) en kinderen met een EV-A stam 2 jaar oud (mediaan 7 maanden) ($p<0.001$). Op basis van het deel van de data waarbij klinische gegevens werd gerapporteerd (30%) werden EV-B stammen vaak gevonden bij meningitis gevallen en EV-A stammen bij gevallen van Hand-Voet-en-Mond ziekte. Voor de analyse van meer type-specifieke ziektebeelden is volledige rapportage van de klinische data nodig. Hiermee kunnen eventuele veranderingen in de ernst van symptomen bij bepaalde typen in beeld worden gebracht.

De circulatie van bepaalde type stammen in een bepaalde periode kan gericht bekeken worden met behulp van de sequentie data. In de zomerpiek van 2010 circuleerden verschillende CV-A9 stammen, en de zomer-/herfstpiek in 2011 was verdeeld in ECHO7 (zomer) en E25 (herfst). Over deze data wordt een overzichtsartikel geschreven.

Laboratoria die belangstelling hebben voor deelname aan TypeNed kunnen contact opnemen via: noronet@rivm.nl

Diagnostiek en Surveillance van bof, mazelen, rodehond en parvo virus (parvo B19 virus)

Auteur: Daphne Gijselaar
Betrokkenen: Sigrid Gouma, Jeroen Kerkhof, Marion Koopmans en Rob van Binnendijk
Contactpersoon: Rob van Binnendijk (rob.van.binnendijk@rivm.nl)

Het LIS/IDS verricht diagnostiek en moleculaire typering bij mazelen, rodehond en bof voor het Rijksvaccinatieprogramma. Deze wordt aangevraagd door perifere laboratoria, of door de GGD en de huisartsenpraktijk bij melding van (een uitbraak van) exantheem. In de differentiële diagnostiek wordt ook parvo B19 meegenomen.

Mazelen

In 2012 zijn in totaal in Nederland 10 gevallen van mazelen gediagnosticeerd en gerapporteerd (Tabel 1). De beschikbare epidemiologische informatie en moleculaire typering geven aan dat het bij 8 van de 10 personen ging om geïmporteerde mazelen, bij één persoon om direct contact en bij één persoon was het niet mogelijk de bron te achterhalen. Voor het vaststellen van de mazelen eliminatiestatus tellen alleen deze laatste, endemische gevallen mee conform de nieuwe richtlijnen van de WHO/ECDC. Voor Nederland komt dit neer op minder dan 1 endemische transmissie per miljoen inwoners. De landen van herkomst van het mazelenvirus waren Thailand (genotype D8), Turkije en Afghanistan (B3) en Spanje (D4), Indonesië (geen materiaal voor typering), Uganda (geen materiaal voor typering) en Engeland (geen materiaal voor typering).

Rode hond

In 2012 is incidenteel een aanvraag voor rode hond ontvangen. Geen van de geteste monsters is positief bevonden in de IgM serologie en/of rode hond PCR.

Diagnostiek

In 2012 zijn door de GGD'en 31 personen onderzocht vanwege exantheem. In totaal zijn 83 klinische monsters getest, vooral vingerprikbloed en speeksel. Het speeksel is getest op de aanwezigheid van mazelen of rubella viraal RNA m.b.v. multiplex PCR, conform het exanthemen algoritme. Het vingerprikbloed is getest op parvo B19 IgM virus (Biotrin EIA). In een enkel geval is de vingerprikbloed afname ook getest op mazelen en/of rubella IgM. Vanuit de medisch microbiologische laboratoria zijn 29 klinische monsters aangeboden voor diagnostiek, meestal ging het om een keeluitstrijk of urine voor PCR diagnostiek (Tabel 1).

Bof

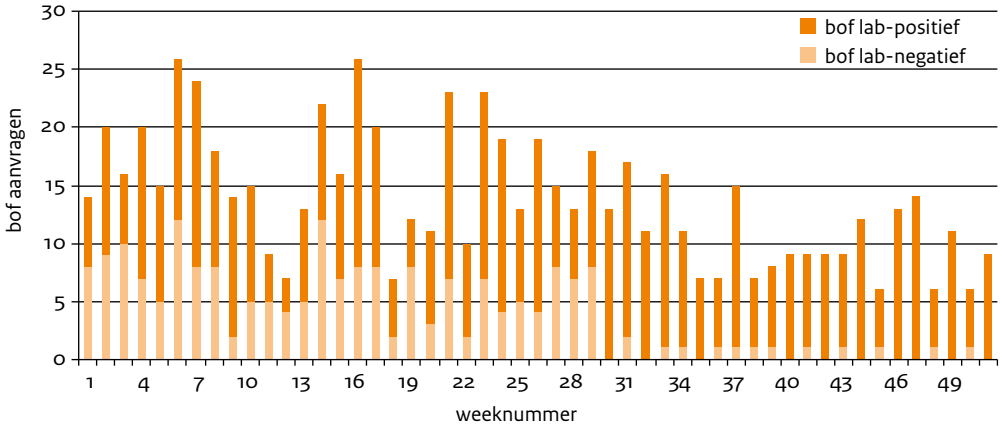
Begin 2010 werden de eerste uitbraken van bof gemeld onder gevaccineerde studenten in de regio's Utrecht, Delft en Leiden. De verspreiding onder studenten heeft zich landelijk voort gezet in 2011 en 2012, met een duidelijke seizoenspiek, gelegen tussen november en april. Eind 2012 is echter geen stijging in het aantal bofgevallen meer waargenomen.

Tabel 1. Overzicht van exantheem aanvragen in 2012

Monstertype		Test	Laboratorium inzendingen		GGD inzendingen	
			Aantal monsters	Positief (%)	Aantal monsters	Positief (%)
Vingerprikbloed	mazelen	IgM	5	1 (20 %)	5	0 (0%)
	rodehond	IgM	1	0 (0 %)	6	0 (0%)
	parvo B19	IgM	0	0 (0 %)	31	6 (20 %)
Speeksel	mazelen	PCR	5	1 (20%)	39	1 (2,6 %)
	rodehond	PCR	5	0 (0 %)	39	0 (0 %)
KN uitstrijk	mazelen	PCR	11	3 (33,3 %)	0	0 (0 %)
	rodehond	PCR	11	0 (%)	0	0 (%)
Urine	mazelen	PCR	10	1 (10 %)	7	2 (28,6 %)
	rodehond	PCR	10	0 (%)	7	0 (%)
Overig	mazelen	PCR	3	0 (0 %)	0	0 (0 %)
	rodehond	PCR	3	0 (0%)	0	0 (0%)

In 2012 zijn 1067 klinische monsters onderzocht, afkomstig van in totaal 712 personen met een klinische verdenking op bof. Hiervan zijn er 694 aangevraagd vanuit perifere laboratoria (538 personen) en 370 vanuit de GGD (191 personen). In totaal bleken 251 klinische monsters positief getest voor bof. Deze waren afkomstig van 202 personen. De laboratoria zonden meestal mond/keeluitstrijken in. De GGD'en gebruikten meestal de speciaal samengestelde afnamesets met speeksel- en urinebuis. De aangevraagde diagnostiek was in de meeste gevallen detectie van viraal RNA (Tabel 2).
Na week 29 van 2012 is er een opvallende daling te zien in het aantal bof positief geteste monsters. In de voorgaande 2 jaren is rond dezelfde periode een sterke daling zichtbaar, waarna het aantal bof positieve diagnoses weer stijgt rond week 40-45 (Figuur 1). In 2012 vindt deze stijging echter niet meer plaats, en ook begin 2013 is het aantal gediagnosticeerde (en gemelde) bofgevallen erg laag t.o.v. de 2 voorafgaande bof seizoenen.

Figuur 1. Aantal bof aanvragen per week

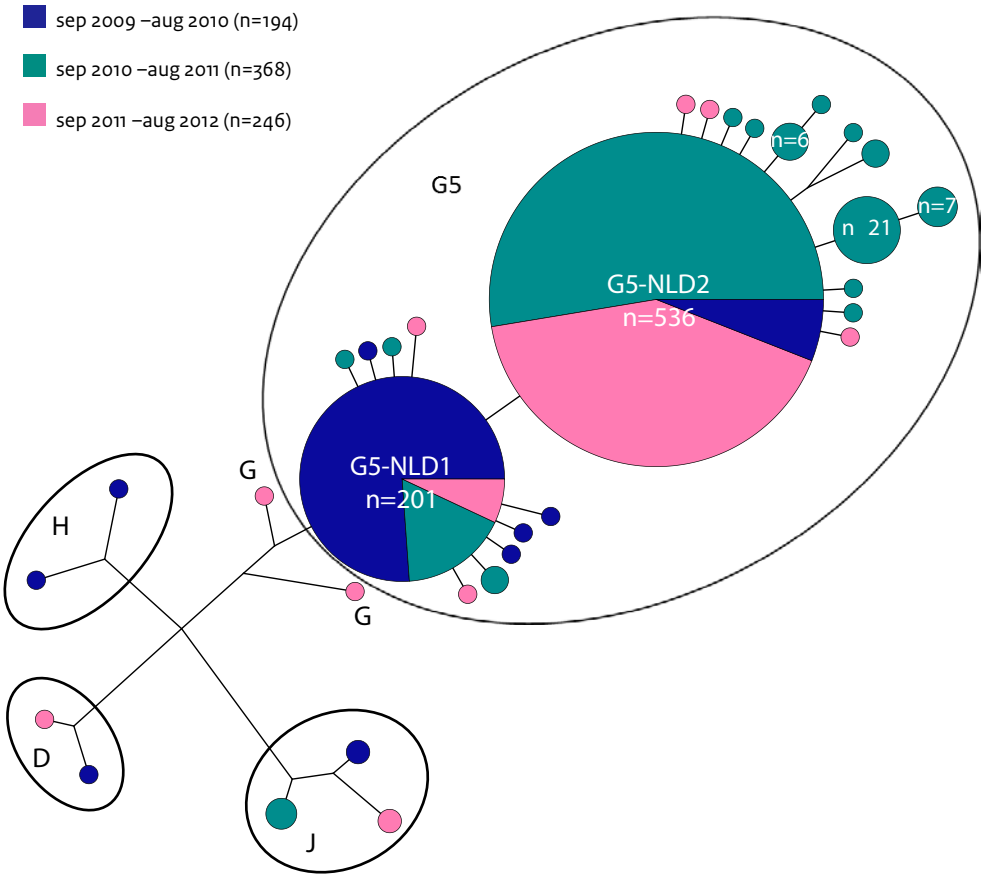


Tabel 2. Overzicht van bof aanvragen in 2012

Monstertype	Test	Laboratorium inzendingen		GGD inzendingen	
		Aantal monsters	Positief (%)	Aantal monsters	Positief (%)
Speeksel	PCR	52	9 (17,3 %)	193	84 (43,5)
Urine	PCR	180	25 (13,9 %)	201	26 (12,9)
KN uitstrijk	PCR	375	89 (23,7%)	2	0 (0 %)
Overig	PCR	26	12 (46,2%)	0	0 (0 %)
Serum	IgM	35	5 (14,3 %)	3	1 (33,3 %)
Totaal		668 (62,6 %)	140 (21,0 %)	399 (37.4%)	111 (27,8)

Sequentie-analyse van het niet-coderende SH-gen (316 nt) van het virus werd gebruikt voor genotypering van bof. Het begin van de uitbraak in 2010 werd gedomineerd door één stam (G5-NLD1), die op basis van de SH sequentie identiek is aan uitbraak stammen uit het Verenigd Koninkrijk en de VS. In april 2010 is een variant van de G5 stam ontdekt in de regio Groningen (G5-NLD2), die in 2011 en in 2012 de dominant circulerende G5 variant is. De oorspronkelijke G5-NLD1 is echter gedurende de hele uitbraak periode aanwezig. De verdeling van beide varianten en van enkele sub-varianten staat weergegeven in bijgaand fylogenetisch diagram. Tegen het eind van 2012 is er geen epidemische verheffing meer van bof, maar worden beide varianten nog wel gedetecteerd, samen met genotypen die hier niet meer aan verwant zijn (Figuur 1).

Figuur 3. Maximum parsimony tree van bofvirus varianten van seizoenen 2--9-2012 op basis van de SH gen sequenties (316nt)



Publicaties

Hahne S, Whelan J, van Binnendijk R, Swaan C, Fanoy E, Boot H, et al. Mumps Vaccine Effectiveness against Orchitis. *Emerg Infect Dis* 18, no. 1 (Jan 2012): 191-3.

Greenland K, Whelan J, Fanoy E, Borgert M, Hulshof K, Yap KB, et al. Mumps Outbreak among Vaccinated University Students Associated with a Large Party, the Netherlands, 2010. *Vaccine* 30, no. 31 (Jun 29 2012): 4676-80.

Gouma S, Boot H, van Binnendijk RS. Bof vaccinfalen bij studenten: wat zijn mogelijke oorzaken? Infectieziekten Bulletin, No 8 (2012)

Monitoring van antivirale gevoeligheid van influenzavirussen, seizoen 2011-2012

Auteur: Pieter Overduin
Betrokkenen: Adam Meijer, Marcel Jonges, Pieter Overduin, Shireen Jenny, Ton Marzec, Mariam Bagheri, Marion Koopmans, Wim van der Hoek, Marit de Lange, Fatmagül Kerpiclik, Yolanda van Weert, Anja Haenen, Marie-José Veldman, Marianne van der Sande, Gé Donker
Contactpersoon: Adam Meijer (adam.meijer@rivm.nl)

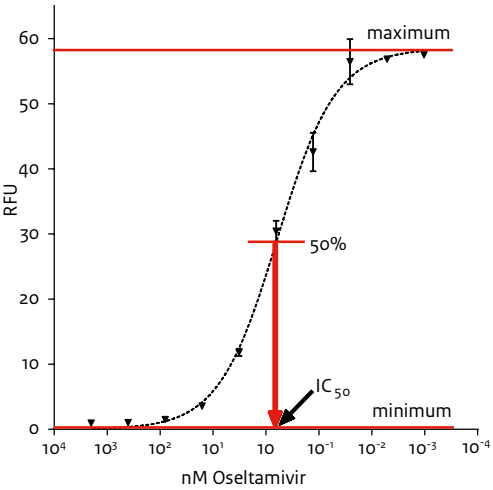
Antivirale middelen worden in Nederland voorgeschreven als profylaxe of therapie bij influenza bij ouderen, personen met verminderde afweer, en bij (verdenking op) vogelgriep (H5N1 of H7Nx). Door het gebruik van antivirale middelen kan soms resistentie tegen het middel ontstaan. Verspreiding van resistent virus kan tot een reductie in behandelmogelijkheden leiden en moet daarom zoveel mogelijk voorkomen worden. Daarom is de controle op het ontstaan van resistentie van groot belang.

Resistentie van influenzavirus tegen antivirale middelen wordt bepaald met behulp van een fenotypische test, detectie van specifieke nucleotide mutaties (SNP's) en sequencing.

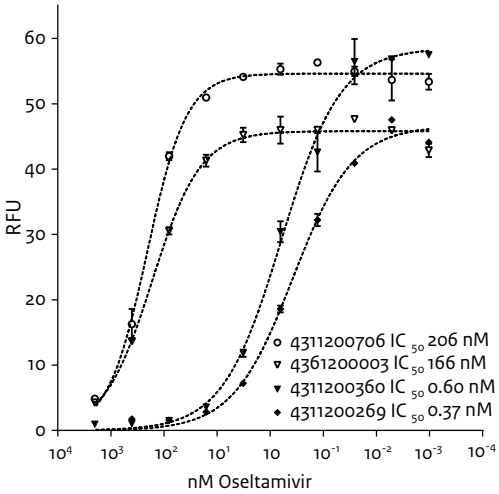
Fenotypische test

Het LIS/IDS test op de gevoeligheid voor zanamivir en oseltamivir. Niet alle influenzavirussen hebben eenzelfde neuraminidase activiteit (NA-activiteit) bij een standaard hoeveelheid virus, Daarom wordt eerst de NA-activiteit van het isolaat bepaald, zodat deze tot een standaard hoeveelheid NA activiteit per volume verdund kan worden. Vervolgens wordt in aanwezigheid van een artificieel substraat, 4-Mu-NANA, de NA activiteit gemeten in aanwezigheid van oplopende concentraties zanamivir of oseltamivir. De fluorescentie van het omgezette 4-Mu-NANA wordt daarna uitgezet tegen de concentratie van het antivirale middel. Als het virus verminderd gevoelig is, heeft het een hogere concentratie antiviraal middel nodig om de werking van het NA te remmen. De gevoeligheid voor neuraminidaseremmer wordt weergegeven in IC_{50}; de concentratie remmer waarbij de NA-activiteit 50% van de maximale activiteit is (Figuur 1). De fenotypische test is een universele test voor gevoeligheid voor neuraminidaseremmers, maar een beperking is dat deze alleen uitgevoerd kan worden op gekweekt virus.

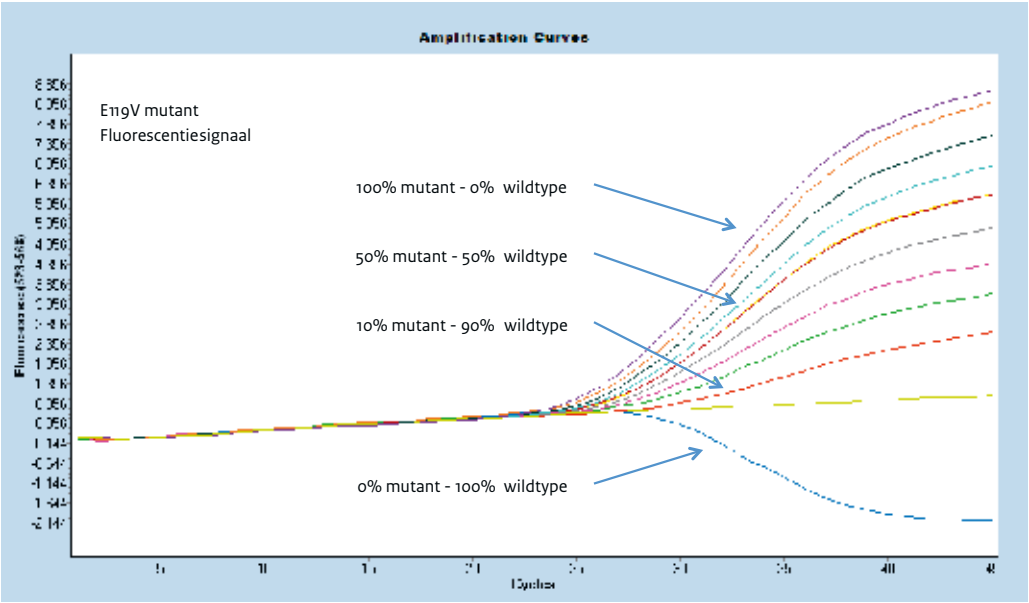
Figuur 1A. Voorbeeld van een oseltamivir fluorescentie curve en de bepaling van de IC50 waarde;



Figuur 1B. Fluorescentie curves van 2 oseltamivir gevoelige A(H1N1)pdm09 isolaten en twee oseltamivir resistente A(H1N1)pdm09 isolaten met de H275Y aminozuur substitutie.



Figuur 2. Detectie van de E119V osetamivir resistente A(H3N2) variant in een mix met wildtype virus.



SNP detectie
Verminderde gevoeligheid voor een antiviraal middel ontstaat door een aminozuursubstitutie. Deze wordt veroorzaakt door een mutatie van één enkel nucleotide (SNP) in het codon voor dat aminozuur. Detectie van een specifieke SNP met een real-time RT-qPCR is een snelle en zeer gevoelige test die direct op klinisch materiaal uitgevoerd kan worden. De SNP's die aanleiding geven tot de meest voorkomende aminozuursubstituties worden getest; H275Y in influenzavirus A(H1N1)pdm09 en E119V en R292K in influenzavirus A(H3N2). (van der Vries et al., 2010 ; van der Vries et al., 2013)

Deze SNP detectie testen zijn zeer gevoelig, waardoor ook monsters met lage virale loads nog getest kunnen worden op het ontstaan van deze specifieke SNP's, De beperking van de SNP test is dat andere mutaties, die ook tot een verminderde gevoeligheid leiden, niet opgespoord worden.

Sequencing
Sequencing met de Sanger methode geeft een compleet beeld van de mutaties in een gen segment. Hiervoor worden het haemagglutinine, neuraminidase en matrix gen gesequenced.

Bronnen van monsters

Voor de surveillance van influenza ontvangt het RIVM de meeste monsters vanuit de NIVEL continue morbiditeits surveillance. Gedurende het jaar sturen de huisartsenpeilstations keelwatten en neuswatten in van patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) of een andere acute respiratoire infectie (ARI). Uit het surveillance netwerk van verpleeghuizen (SNIV) worden keel- en neuswatten opgestuurd van ouderen met IAZ of ARI. Sinds 2009 wordt in een studie in verpleeghuizen de effectiviteit van post exposure profylaxe (PEpPiE) met oseltamivir bestudeerd (2,4). Monsters van patiënten waar vóór en na profylaxe IAZ bij optreedt én monsters van patiënten waarbij tijdens profylaxe en na oseltamivir therapie IAZ optreedt, worden getest op influenzavirus. Daarnaast worden monsters van bijzondere patiënten onderzocht, vooral als onderdeel van de (potentieel) resistente influenzavirussen melding. Influenzavirus positieve monsters worden verder getest. Bij voldoende virale load worden ze in kweek gebracht, en fenotypisch getest op antivirale gevoeligheid. Een deel van de klinische monsters met hoge virale load wordt gesequenced. Voor het 2011-2012 seizoen, dat gedomineerd werd door A(H3N2) influenzavirus, is de SNP detectie voor E119V en R292K geïntroduceerd en daarmee zijn alle monsters uit de PEpPiE studie getest.

Tabel 1. Overzicht van geteste monsters in seizoen 2011-2012*

Onderzoek	Totaal monsters getest	Influenza A positief	Influenza B positief	IC50	SNP PCR	Sequencing
NIVEL	1146	4 H1pdm09 66 H3 1 Hx	25	3 H1pdm09 29 H3 9 B	1 H1pdm09	3 H1pdm09 34 H3 6B
PEpPiE	115	47 H3	0	14 H3	47 H3	16 H3
SNIV	35	7 H3 1 H1pdm09	0	3 H3	Nd 1	Nd 1
Referentie	1	1 H1pdm09	0	1 H1pdm09	1 H1pdm09	1 H1pdm09

* *Het seizoen loopt van 1 Oktober 2011 t/m 31 september 2012; Nd = niet gedaan.*

Resultaten seizoen 2011-2012

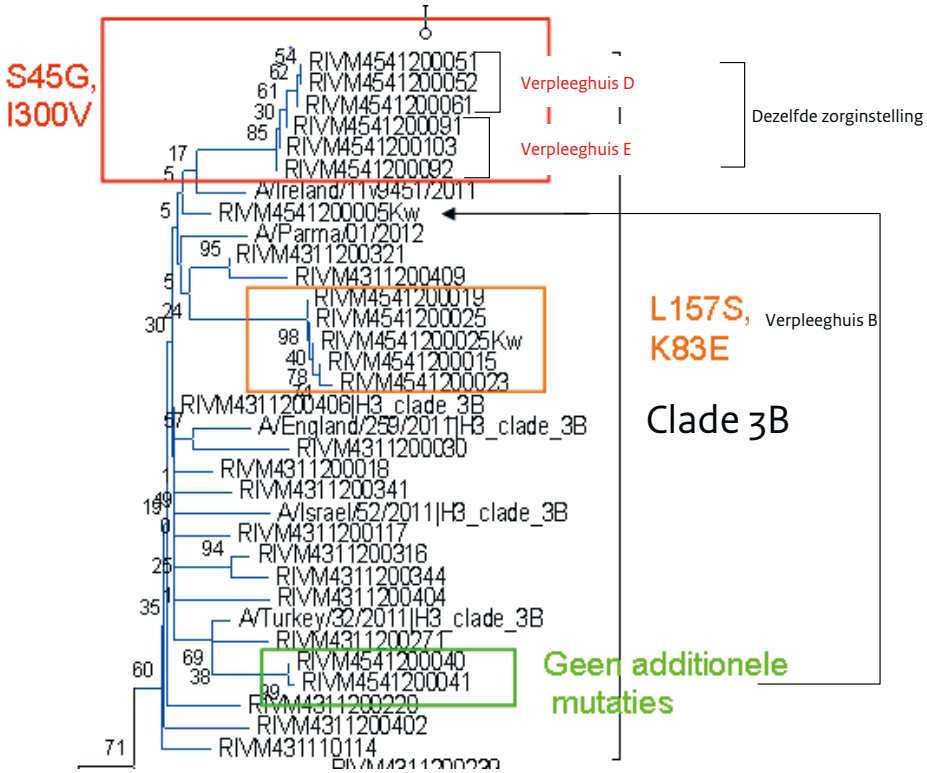
In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de geteste monsters voor het 2011-2012 seizoen dat loopt van 1 oktober 2011 tot 31 september 2012.

In augustus 2012 is tussen de NIVEL monsters éénmaal een influenzavirus A(H1N1)pdm09 aangetroffen dat resistent was voor oseltamivir. De IC_{50} waarde voor oseltamivir was 500x verhoogd vergeleken met de wildtype achtergrondwaarde. SNP PCR en sequence analyse toonden de H275Y aminozuursubstitutie aan. Op hetzelfde moment werd een monster aangeboden van een in het ziekenhuis opgenomen patiënt met A(H1N1)pdm09 influenza. Dit monster bleek hetzelfde profiel te hebben. (Figuur 1B). Nader onderzoek wees uit dat beide patiënten tijdens vakantie aan de Spaanse kust geïnfecteerd zijn, maar niet epidemiologisch aan elkaar verbonden waren (Meijer et.al., 2012). Beide virussen bleken identiek op basis van partiële HA, NA en M segment sequenties. Bovendien was geen van beiden blootgesteld aan oseltamivir. Het NA segment van de virussen bevat drie aminozuursubstituties die eerder geassocieerd waren met het gemakkelijker accepteren van de H275Y aminozuur substitutie en transmissie.

Eén influenza A(H3N2) virus uit de NIVEL huisartsenpeilstation surveillance had een 5x verhoogde IC_{50} waarde voor oseltamivir. In dit virus werden geen mutaties gevonden die voorheen geassocieerd zijn met verlaagde gevoeligheid voor neuraminidase remmers. Wel werd een aminozuur substitutie Q273H gevonden in het actieve centrum van het neuraminidase. Deze mutatie is in de literatuur niet beschreven, en of deze aminozuursubstitutie de verlaagde gevoeligheid veroorzaakt moet verder onderzocht worden.

In één van de A(H3N2) positieve PEpPiE monsters werd de R292K aminozuursubstitutie gevonden met behulp van de SNP RT-PCR. Vanwege de lage virale load kon dit virus niet gekweekt worden. Wel kon door gedeeltelijk sequencen van het NA segment de R292K aminozuur substitutie bevestigd worden. Daarnaast werden mutaties gevonden in een cluster virussen van patiënten uit één zorginstelling, maar van twee verschillende locaties, wat transmissie tussen beide locaties suggereert. Dat werd bevestigd door een aantal unieke aminozuur substituties in het HA segment; S45G en I300V (Figuur 3). Influenzavirussen van een uitbraak in een ander verpleeghuis werden ook gekarakteriseerd door unieke

Figuur 3. Deel van phylogenetische boom van HA segment van A(H3N2) virussen. Rode vierkant: virussen met unieke aminozuursubstituties afkomstig van twee verpleeghuizen binnen één zorginstelling. Oranje vierkant: virussen met unieke aminozuursubstituties afkomstig van één verpleeghuis.



aminozuur substituties in het HA segment; K83E en L157S (Figuur 3), wat een bewijs is voor nosocomiale transmissie.

Geen van de influenza B virussen die zijn getest hadden genetische of fenotypische kenmerken voor verlaagde gevoeligheid. Alle influenzavirussen A(H1N1)pdm09 en A(H3N2) waarvan het M segment is gesequencet bevatten de S31N aminozuur substitutie die kenmerkend is voor resistentie tegen amantadine.

Publicaties

van der Vries E, Jonges M, Herfst S, Maaskant J, Van der Linden A, Guldemeester J, et al. Evaluation of a Rapid Molecular Algorithm for Detection of Pandemic Influenza a (H1n1) 2009 Virus and Screening for a Key Oseltamivir Resistance (H275y) Substitution in Neuraminidase. *J Clin Virol* 47, no. 1 (Jan 2010): 34-7.

Enserink R, Meijer A, Dijkstra F, van Benthem B, van der Steen JT, Haenen A, et al. Absence of Influenza a(H1n1) During Seasonal and Pandemic Seasons in a Sentinel Nursing Home Surveillance Network in the Netherlands. *J Am Geriatr Soc* 59, no. 12 (Dec 2011): 2301-5.

Meijer A, Jonges M, van Beek P, Swaan CM, Osterhaus AD, Daniels RS, et al. Oseltamivir-Resistant Influenza a(H1n1)Pdm09 Virus in Dutch Travellers Returning from Spain, August 2012. *Euro Surveill* 17, no. 36 (2012): 20266.

van der Vries E, Anber J, van der Linden A, Wu Y, Maaskant J, Stadhouders R, et al. Molecular assaysfor quantitative and qualitative detection of influenza virus and oseltamivirresistance mutations. J Mol Diagn. 2013 May;15(3):347-54.

Websites

http://www.rivm.nl/Onderwerpen/Onderwerpen/S/SNIV

http://www.rivm.nl/Onderwerpen/Onderwerpen/S/SNIV/PEpPiE_Onderzoek

Publicatielijst LIS/IDS 2012

www.rivm.nl/publicatielijst_lis-ids_2012

Eindredactie
Marion Koopmans | Henk Bijlmer |
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

juni 2013

005367