



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



Cib-IDS

Cib-IDS rapportage 2013

rapportage

2013



Cib-IDS  
rapportage  
2013

## Colofon

### Eindredactie:

Berry Overbeek, Centrumhoofd Clb-IDS, berry.overbeek@rivm.nl; 030-2742867

Ellen Stobberingh, disciplinehoofd Bacteriologie en Parasitologie, ellen.stobberingh@rivm.nl;  
030-2742265

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

### Coverfoto:

RIVM beeldbank

©RIVM 2013

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 de jaarrapportage over 2013, van het centrum Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS), onderdeel van het Centrum voor Infectieziektebestrijding (Cib) van het RIVM. Het was een roerig jaar. Berry Overbeek vervulde vanaf januari 2013 ad interim de functie van centrumhoofd IDS. Daarmee is de vacature ingevuld, die in juni 2012 ontstond door de pensionering van Gerard Loeber. De afronding van de RIVM-brede reorganisatie kreeg zijn beslag; over de inpassing van diverse functies die eind 2012 zijn overgezet naar het FunctieGebouw Rijk (FGR) is op initiatief van Cib-IDS langdurig gediscussieerd (met een landelijke herziening van het FGR als resultaat). Daarnaast is op het gebied van de kwaliteits-accreditatie veel werk verzet. Met heuglijke, en onbegrijpelijke, gebeurtenissen in dat traject. Bij het schrijven van dit voorwoord loopt nog een door Cib-IDS ingesteld beroep tegen het niet verlengen van de CCKL-accreditatie per 1 december 2013. Dit nadat op 30 oktober 2013 de schorsing van accreditatie was opgeheven, die in juli 2013 was opgelegd door de Raad voor Accreditatie. Het opheffen van de schorsing was conform het advies van het auditteam, dat in oktober 2013 een herbeoordeling van het kwaliteitssysteem van IDS uitvoerde. Het Cib zag Roel Coutinho door pensionering vertrekken. Hij is als directeur opgevolgd door Jaap van Dissel. Dat maakte dat de voortgang van sommige processen binnen Cib-IDS langer duurde dan gebruikelijk. Henk Bijlmer verliet het Cib-IDS in september 2013. Marion Koopmans breidde in december haar werkzaamheden uit voor het Erasmus MC in Rotterdam, en verminderde haar aanstelling bij IDS tot 1 dag per week. Henk en Marion hebben twee jaar geleden het initiatief genomen om een jaarrapportage te maken volgens het model dat ook nu weer is gehanteerd. We hebben er positieve reacties op gekregen en het geeft een goed overzicht van onze actieve dossiers. Ellen Stobberingh is bereid gevonden om de positie van Henk Bijlmer binnen de discipline Bacteriologie/Parasitologie waar te nemen. Naast al deze bijkomende gebeurtenissen, die veel tijd en energie hebben gevraagd van onze medewerkers, zijn de reguliere werkzaamheden met veel enthousiasme uitgevoerd. Ook dit jaar is weer met veel plezier bijgaand overzicht samengesteld, om u een indruk van onze activiteiten te geven. Meer informatie over de diagnostiek die wij binnen Cib-IDS uitvoeren kunt u vinden op onze website. Scan de QR-code of gebruik de link:

[www.rivm.nl/diagnostischvademecum](http://www.rivm.nl/diagnostischvademecum).



We wensen u veel leesplezier. Suggesties voor verbetering blijven van harte welkom.

Berry Overbeek  
Ellen Stobberingh



## Inhoud

<b>Bacteriologie</b>	<b>9</b>
Identificatie van pathogene Gram-negatieve bacteriën met behulp van MALDI-TOF massa spectrometrie	10
Validatie van real-time PCR tests voor snelle en betrouwbare identificatie van pathogene bacteriën die gebruikt kunnen worden voor bioterrorisme	13
Mycobacteriën	16
Salmonellasurveillance	20
Antimicrobiële resistentie	23
Nieuwe methoden om pneumokokkeninfecties aan te tonen uit bloed en urine zonder kweek	27
Het gebruik van <i>omics</i> om de toename in kinkhoest te verklaren.	30
<b>Parasitologie</b>	<b>33</b>
Cryptosporidiumtypering	34
Toxoplasma: voorstel voor verbetering van communicatie	36
<b>Virologie</b>	<b>39</b>
Bijzondere virologische diagnostiek: zoönosen en zeldzame infecties.	40
Emerging infections en bijzondere diagnostiek: Middle-East Respiratory Syndrome coronavirus.	44
Gastro-enteritisvirus surveillance	46
Pandemische norovirussen: methode ontwikkeling voor blootstelling en immuniteit	49
Antivirale middelen tegen enterovirussen: de impact van antivirale resistentie voor de volksgezondheid	51
Type-Ned virologie; Enterovirus en humaan parechovirus surveillance	53
Poliovirus exclusie en Enterovirus surveillance in 2013	55
Genotypering Rotavirus	58
Genotypering hepatitis A virus	61
Genotypering hepatitis B virussen	65
Geografische tracing van hepatitis A virus door middel van moleculaire analyse	68
Humaan papillomavirus (HPV) surveillance en onderzoek	70
Influenza surveillance en genetische karakterisatie van virussen uit bijzondere aanvragen, respiratoir seizoen 2012-2013	72
Surveillance van acute respiratoire infecties in verpleeghuizen en huisartsen peilstationnetwerken, belang voor preventie en bestrijding	76
Toepassingen van influenzavirus sequentieanalyse	81
Bof, mazelen, rodehond (BMR) en vijfde ziekte: diagnostiek, surveillance en onderzoek	84
<b>Publicatielijst Cib-IDS 2013</b>	<b>92</b>





# Bacteriologie

## Identificatie van pathogene Gram-negatieve bacteriën met behulp van MALDI-TOF massa spectrometrie

**Auteur:** Amber Hendriks

**Betrokkenen:** Maaïke van den Beld, Airien Harpal, Evy Heerkens, Dieneke Hoeve, Maaïke de Vries, Frans Reubsaet

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

Voor zowel de individuele patiëntenzorg als de openbare gezondheidszorg is identificatie van hoog pathogene bacteriën belangrijk. Voorbeelden zijn *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, en *Brucella* species. Deze organismen komen niet endemisch voor in Nederland, maar importgevallen zijn wel mogelijk. De micro-organismen staan op de lijst van het Centre for Disease Control (CDC) als potentieel bioterroristische agentia.

Naast specifieke real-time PCR's voor hoogpathogene bacteriën kan matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight massaspectrometrie (MALDI-TOF MS) een techniek zijn voor snelle identificatie. Een snel resultaat maakt het mogelijk om adequaat te reageren op de situatie.

Sinds een aantal jaren is MALDI-TOF MS in de klinische microbiologie een populaire techniek voor de identificatie van micro-organismen. Veel laboratoria maken voor identificatie gebruik van de MALDI Biotyper database (Bruker Daltonics, Duitsland). Hoog pathogene bacteriën waarmee op biosafety level 3 (BSL 3) gewerkt moet worden, staan echter alleen in Brukers Security Relevant (SR) database. Niet alle laboratoria beschikken over deze extra database. We hebben onderzocht of MALDI-TOF MS bruikbaar is voor een snelle en betrouwbare identificatie van hoog pathogene Gram-negatieve bacteriën.

42 stammen van *Brucella* species, 10 *Burkholderia mallei*, 18 *Burkholderia pseudomallei*, 18 *Francisella tularensis* en 18 *Yersinia pestis* stammen zijn getest. Daarnaast zijn 93 genotypisch en/of fenotypisch verwante stammen van deze species gebruikt. Alle stammen zijn opgewerkt met de twee standaard opwerkmethode van Bruker. Dit zijn de zogenaamde 'formid acid extractie' en de 'direct transfer' methode. Na het opbrengen van de monsters op de MALDI-target en vóórdat de plaat de BSL 3 faciliteit verliet, werd gecontroleerd of het opgebrachte materiaal geen levensvatbare bacteriën meer bevat.

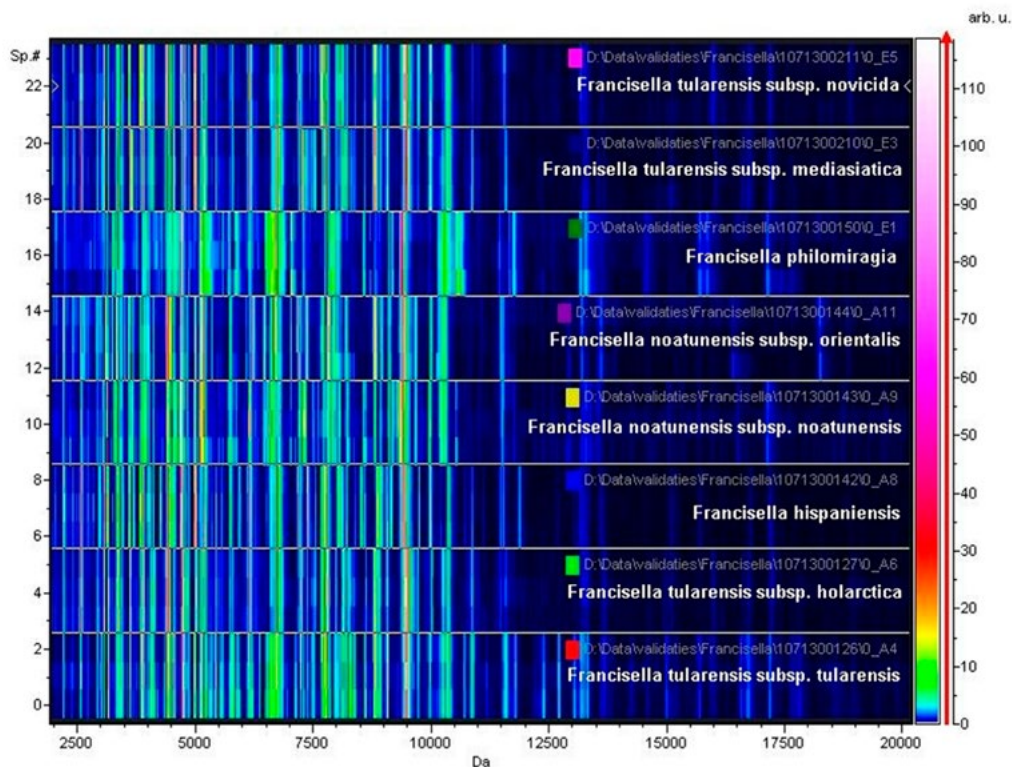
De resulterende spectra zijn vergeleken met de Biotyper-database en de SR-database. Met *Francisella* referentiestammen werd een in-house *Francisella* database gecreëerd (Figuur 1). Brukers FlexAnalysis software is gebruikt om de in literatuur beschreven biomarkers van verschillende species te bekijken.

Bij het vergelijken van de spectra met de standaard Biotyper database, zijn alle *Burkholderia mallei* en *B. pseudomallei* stammen geïdentificeerd als de niet pathogene *Burkholderia thailandensis* (score >2.000). Alle *Yersinia pestis* stammen zijn volgens de database *Yersinia pseudotuberculosis*, en alle *Brucella* species en *Francisella tularensis* stammen geven 'no reliable identification' (score <1.700).

Door gebruik van beide databases ontstaan andere resultaten voor sommige in dit onderzoek geteste stammen. Identificatie van *Yersinia pestis* resulteert in een aantal gevallen in *Yersinia pseudotuberculosis* en andersom. De verschillende *Brucella* species zijn allemaal geïdentificeerd als *Brucella melitensis*, de enige *Brucella* species die in de SR-database is opgenomen. De SR database bevat alleen *Francisella tularensis* zonder onderscheid te maken in subspecies. De gecreëerde in-house *Francisella* database maakt wel onderscheid, en bevat daarnaast meer *Francisella* species dan beide Bruker databases.

Bij gebruik van de Biotyper database alleen, kunnen *Burkholderia mallei* / *B. pseudomallei* of *Yersinia pestis* fout geïdentificeerd worden als respectievelijk *Burkholderia thailandensis* of *Yersinia pseudotuberculosis*. De combinatie van beide Bruker databases kan geen onderscheid maken tussen *Burkholderia mallei* en *B. pseudomallei*. Ook het onderscheid tussen *Yersinia pestis* en *Y. pseudotuberculosis* kan niet gemaakt worden. Met specifieke biomarkers is differentiatie tussen *Yersinia pestis* en *Y. pseudotuberculosis* wel mogelijk.

**Figuur 1.** Differentiatie tussen de verschillende spectra van *Francisella* referentiestammen gebruikt voor de in-house *Francisella* database.



De in-house *Francisella* database is meer uitgebreid voor *Francisella* species dan de beide databases van Bruker. Het is met deze *Francisella* database mogelijk om te identificeren tot subspecies niveau. De in-house database is een goede toevoeging aan de bestaande databases om beter te kunnen differentiëren tussen de verschillende *Francisella* species.

De combinatie van Brukers MALDI Biotyper database en de SR database met MALDI-TOF MS is een handige en snelle methode om een indicatie te krijgen van een stam. Sommige nauw verwante pathogene Gram-negatieve bacteriën zijn echter niet te onderscheiden, ondanks een groot verschil in virulentie. Hierdoor blijft voor deze bacteriën een real-time PCR nodig voor correcte identificatie.

# Validatie van real-time PCR tests voor snelle en betrouwbare identificatie van pathogene bacteriën die gebruikt kunnen worden voor bioterrorisme

**Auteur:** Maaïke de Vries

**Betrokkenen:** Amber Hendriks, Maaïke van den Beld, Airien Harpal, Evy Heerkens, Dienneke Hoeve, Frans Reubsaet.

**Contactpersoon:** Maaïke de Vries (Maaïke.de.Vries@rivm.nl)

De reële dreiging van bioterrorisme werd in 2001 duidelijk door de poederbrieven in de Verenigde Staten. Het CDC (Centre for Disease Control) heeft naar aanleiding daarvan een lijst opgesteld met bacteriën die mogelijk gebruikt worden als bioterroristische (BT) wapens. *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* en *Brucella* species zijn hier voorbeelden van.

Deze bacteriën zijn endemisch in verschillende delen van de wereld en komen af en toe voor in Nederland als importgevallen. Ook is introductie als zoönose mogelijk. Een voorbeeld hiervan is een patiënt met tularemie in 2011 (Maraha *et al.*, 2013, Coolen *et al.*, 2013). Met snelle en specifieke detectie, of door uitsluiting van de aanwezigheid van deze organismen zijn gerichte maatregelen mogelijk. Dit voorkomt extra kosten en onnodige maatschappelijke onrust.

MALDI-TOF MS en real-time PCR zijn hiervoor waarschijnlijk bruikbaar. In ons laboratorium zijn beide methoden uitgebreid gevalideerd voor de BT-bacteriën. In dit stuk wordt de validatie van de real-time PCR's beschreven.

Per organisme zijn meerdere PCR-targets geselecteerd op virulentiegenen of essentiële genen. De juistheid en specificiteit van de testen zijn *in silico* getest en gevalideerd. Hiervoor zijn wildtype stammen en stammen uit cultuurcollecties gebruikt. Ter bevestiging is van alle stammen de 16S rDNA sequentie bepaald. De wildtype stammen zijn ook met conventionele biochemische technieken en vetzuuranalyse geïdentificeerd.

Een aantal 16S rDNA sequenties van *Burkholderia thailandensis* in Genbank bleek niet te kloppen. Dit hebben we aangetoond met sequentieanalyse van het 16S rDNA-gen op dezelfde stammen (Figuur 1 en Tabel 1).

De specificiteit van de testen is bepaald met genetisch en fenotypisch gerelateerde stammen, waaronder stammen die fout-positieve resultaten geven in andere testen. Dit is gebaseerd op literatuur, eigen ervaring en *in silico*-analyse. In de afzonderlijke real-time PCR's zijn ook de andere BT-bacteriën meegenomen. Het aantal benodigde stammen om de specificiteit te bepalen was afhankelijk van hoe gerelateerd de bacterie was aan zijn fylogenetische "buren".

Voor *Brucella* species zijn 7 genetisch gerelateerde stammen getest, terwijl er 29 genetisch gerelateerde stammen gebruikt zijn om de specificiteit van *B. anthracis* te bevestigen. Er zijn

23 fenotypisch gerelateerde stammen getest voor *Brucella* en maar 2 fenotypisch gerelateerde stammen voor *B. anthracis*. *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* en de andere subspecies van *F. tularensis* zijn te onderscheiden door de grootte van de PCR-producten op agarose gel te bepalen. De inzet was om 100% specificiteit en 95% juistheid te behalen en dat is gelukt.

Om de robuustheid te verhogen zijn meerdere targets per micro-organisme gebruikt. Ter validatie van de robuustheid is gekeken hoe vaak een run afgekeurd is op de positieve controle. De methode wordt als robuust beschouwd bij een afkeuringspercentage lager dan 10%. Om de detectiegrens te bepalen is het target in 8 verschillende concentraties rond de concentratie van de detectiegrens verdund en de kwalitatieve uitkomst bepaald. De test is in achtvoud uitgevoerd en geanalyseerd met behulp van Probit regressie in SPSS. De detectiegrens moet lager zijn dan het aantal kopieën van het target dat in een lysaat gevonden wordt (ongeveer  $7 \times 10^8$  kopieën/reactie). Voor alle targets ligt de detectiegrens veel lager en daarmee voldoet de robuustheid.

Samengevat bevestigt uitgebreide validatie van de real-time PCR-testen dat deze geschikt zijn voor snelle en specifieke bevestiging van de aanwezigheid van DNA van *Bacillus anthracis*, *Burkholderia mallei*, *B. pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis* en *Brucella* species in lysaten van reinkweken. Voor zo ver dit mogelijk is worden deze testen in de toekomst gevalideerd op klinische monsters.

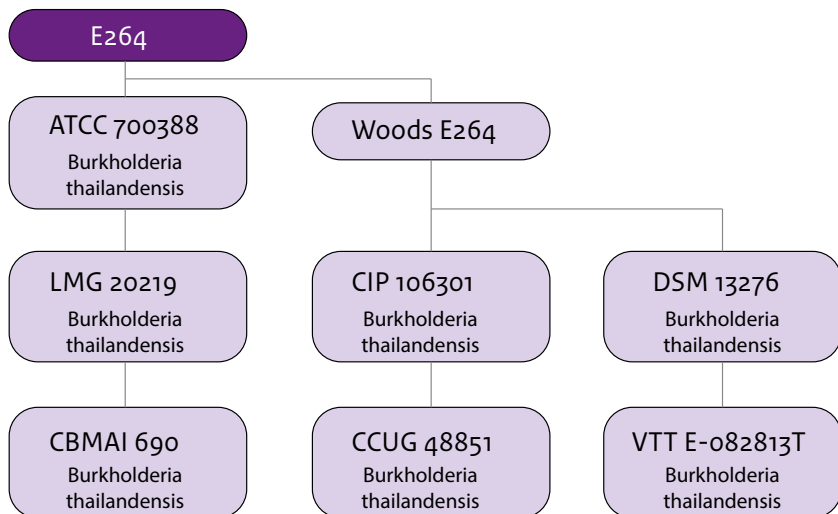
Verdere informatie over het aanvragen van deze testen is te vinden op [www.RIVM.nl/diagnostischvademeccum](http://www.RIVM.nl/diagnostischvademeccum).

### Publicaties en referenties

Maraha B, Hajer G, Sjodin A, Forsman M, Paauw A, Roeselers G, et.al. "Indigenous Infection with *Francisella Tularensis Holarctica* in the Netherlands." *Case Rep Infect Dis* 2013, (2013): 916985.

Coolen JP, Sjodin A, Maraha B, Hajer GF, Forsman M, Verspui E, et.al. "Draft Genome Sequence of *Francisella Tularensis* Subsp. *Holarctica* Bd11-00177." *Stand Genomic Sci* 8, no. 3 (2013): 539-47.

**Figuur 1.** De samenhang van de *B. thailandensis* tpeystam afentingen (www.straininfo.net)



**Tabel 1.** *B. thailandensis*: vergelijking van meerdere 16S rDNA sequenties met *Burkholderia thailandensis* E264 tpeystam

Stamnummer	Bronnummer	Accessionnummer	% homologie met E264 T
E264 T		U91838	100
ATCC 700588 T	E264 T	EF535235	99,9
BD10-00323 T	DSM 13276 T	KF444906	99,9
CIP 106301 T		EU024174	99,3
BD11-00022 T	CIP 106301 T	KF444904	99,9
CIP 105302		EU024173	99,3
BD11-00023	CIP 105302	KF444905	99,9

## Mycobacteriën

**Auteur:** Dick van Soolingen

**Betrokkenen:** Miranda Kamst, Tridia van der Laan, Mimount Enaimi, Arnout Mulder, Rina de Zwaan Carolien Reusen, Martien Borgdorff, Hanna Guimaeres, Sami Simons

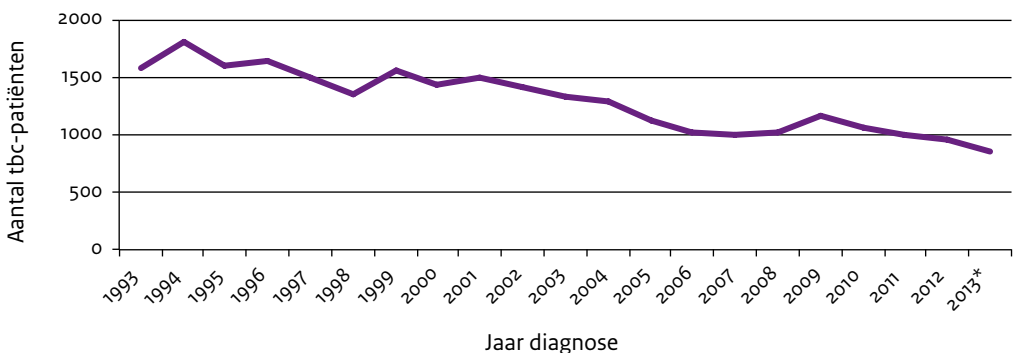
**Contactpersoon:** Dick van Soolingen (dick.van.soolingen@rivm.nl)

De incidentie van tuberculose (tbc) neemt af in ons land; in 2013 zijn ongeveer 850 nieuwe gevallen gerapporteerd (Figuur 1). In ongeveer 75% van de gevallen waren dit niet-Nederlanders. Het RIVM fungeert al tientallen jaren als referentielaboratorium voor de secundaire diagnostiek van tbc. In het bijzonder worden de identificatie, resistentiebepalingen en epidemiologische typeringen van *Mycobacterium tuberculosis*- en nontuberculeuze mycobacteriële (NTM)kweken door het RIVM uitgevoerd. Deze bepalingen ondersteunen de individuele therapie van de betreffende patiënten en het epidemiologische onderzoek van GGD'en. De resultaten worden ook gebruikt in het kader van surveillance en onderzoek.

### Resistentie

In 2013 is voor 453 *M. tuberculosis* kweken een resistentiebepaling voor eerstelijnsmiddelen uitgevoerd. Bij ruim 12% van deze kweken is een vorm van resistentie waargenomen, waarvan 2% gevallen van multidrug resistentie zijn. Voor 39 kweken is de resistentie tegen tweedelijnsmiddelen bepaald.

**Figuur 1.** Daling van het aantal tbc-patiënten in Nederland. \*Voorlopig cijfer





Ter ondersteuning van bronopsporings- en contactonderzoek zijn 689 moleculaire typeringen uitgevoerd waarvan de uitslagen aan GGD'en zijn doorgegeven. In totaal zijn 570 NTM isolaten ontvangen. Een uitgebreide resistentiebepaling is uitgevoerd voor 372 van deze kweken. Uit onderzoek blijkt dat de trend in resistentie van *M. tuberculosis* tegen anti-tuberculose-middelen in Nederland stijgt (1). Het afgelopen jaar is onderzoek uitgevoerd om de pyrazinamide resistentiebepaling te optimaliseren (2, 3).

Vanwege de groeiende resistentie van *M. tuberculosis* tegen antibiotica draagt het RIVM bij aan de zoektocht naar alternatieve antibiotica, zoals cotrimoxazole(4). Daarnaast wordt onderzoek verricht naar andere, modulerende stoffen, in het bijzonder effluxpompremmers zoals Thioridazine en SiLA421 (5). Deze twee stoffen zijn bekende medicijnen tegen andere aandoeningen, maar zijn ook veelbelovend voor de optimalisatie van tuberculose therapie. Effluxpompremmers verminderen de lozing van stoffen uit *M. tuberculosis* en zorgen voor de accumulatie van andere werkzame stoffen in het intra-mycobacteriële milieu.

### Moleculaire epidemiologie

DNA-fingerprinting, in het kader van de moleculaire epidemiologie, bleef in de afgelopen jaren een speerpunt in het onderzoek. Voor het ECDC is in 2013 opnieuw de wereldwijde kwaliteitscontrole van VNTR-typering georganiseerd. De intra- en interlaboratorium reproduceerbaarheid blijken aanzienlijk te zijn verbeterd (6), vooral als de typering wordt uitgevoerd met een in-house VNTR-methode. De internationale standaardisatie en optimalisatie van de VNTR-typering (6) bevordert de kwaliteit van de interpretatie van de moleculaire epidemiologie van tuberculose. Het RIVM heeft hieraan in belangrijke mate bijgedragen.

In samenwerking met GGD Amsterdam is ook een uitgebreide review geschreven over de bevindingen in de moleculaire epidemiologie van tuberculose tot nu toe (7).

Van bijna 4000 *M. tuberculosis*-isolaten in Nederland uit een periode van 5 jaar, is zowel RFLP-als VNTR-typering uitgevoerd. Op grond van de resultaten is geconcludeerd dat de laatstgenoemde methode beter spoort met epidemiologische bevindingen van GGD'en in de praktijk (8). Met Whole Genome Sequencing is vastgesteld dat het gemiddelde aantal mutaties per genoom per jaar maar ongeveer 0,36 bedraagt. Hiervoor zijn ongeveer 100 *M. tuberculosis* isolatenparen van cases met een epidemiologische link vergeleken (9). Deze informatie is belangrijk voor de invoering van deze techniek als epidemiologische marker.

In samenwerking met de Harvard University in Boston is een model ontwikkeld om de patiënt-gebonden risicofactoren in transmissie van tuberculose te scheiden van bacteriële componenten.

### Nederlandstalige Tuberculose Diagnostiek Dagen

Voor de zesde maal op rij zijn de Nederlandstalige Tuberculose Diagnostiek Dagen georganiseerd, ditmaal opnieuw bij het RIVM. De dagen zijn door ongeveer 150 deelnemers van diverse disciplines bezocht en worden zeer gewaardeerd. In 2014 worden deze dagen in Rotterdam georganiseerd.

## China

De ministeries van volksgezondheid in China en Nederland werken officieel samen op het gebied van o.a. tuberculose bestrijding. In dit kader zijn in april en oktober van 2013 workshops georganiseerd. De onderwerpen diagnostiek en behandeling van tbc kwamen aan bod in respectievelijk Beijing en Chengdu. Collega's van diverse organisaties in Nederland zijn uitgenodigd om presentaties te verzorgen over deze onderwerpen. In november is een delegatie Chinese collega's van het Chest hospital in Beijing ontvangen bij Longcentrum Dekkerswald en tbc-kliniek Beatrixoord in Haren. Hierbij zijn ervaringen uitgewisseld op het gebied van tbc-behandeling van MDR-TB. Naar verwachting wordt deze samenwerking in de komende jaren uitgebreid.

Bijdragen zijn geleverd aan de promotietrajecten van twee longartsen van het Radboud UMC die in 2013 promoveerden. Eén van de twee proefschriften beschrijft de klinische relevantie van non-tuberculeuze mycobacteriën. Het andere proefschrift beschrijft 'klinische en epidemiologische studies in een tbc centrum in Nederland' (proefschriften Wouter Hoefsloot en Cécile Magis-Escurra). In 2013 zijn in Vietnam ook een aantal studies afgerond door Mai Huyen (Huyen)(10-14). Zij promoveert op 3 februari 2014.

## Publicaties en referenties

- Simons SO, Mulder A, van Ingen J, Boeree MJ and van Soolingen D. "Role of Rpsa Gene Sequencing in Diagnosis of Pyrazinamide Resistance." *J Clin Microbiol* 51, no. 1 (2013): 382.
- Alsaad N, van Altena R, Pranger AD, van Soolingen D, de Lange WC, van der Werf TS, et.al. "Evaluation of Co-Trimoxazole in the Treatment of Multidrug-Resistant Tuberculosis." *Eur Respir J* 42, no. 2 (2013): 504-12.
- Simons SO, Kristiansen JE, Hajos G, van der Laan T, Molnar J, Boeree MJ, et.al. "Activity of the Efflux Pump Inhibitor Sila 421 against Drug-Resistant Tuberculosis." *Int J Antimicrob Agents* 41, no. 5 (2013): 488-9.
- Borgdorff M W. and van Soolingen D. "The Re-Emergence of Tuberculosis: What Have We Learnt from Molecular Epidemiology?" *Clin Microbiol Infect* 19, no. 10 (2013): 889-901.
- de Beer JL, van Ingen J, de Vries G, Erkens C, Sebek M, Mulder A, et.al. "Comparative Study of Is6110 Restriction Fragment Length Polymorphism and Variable-Number Tandem-Repeat Typing of Mycobacterium Tuberculosis Isolates in the Netherlands, Based on a 5-Year Nationwide Survey." *J Clin Microbiol* 51, no. 4 (2013): 1193-8.
- Bryant JM, Schurch AC, van Deutekom H, Harris SR, de Beer JL, de Jager V, et.al. "Inferring Patient to Patient Transmission of Mycobacterium Tuberculosis from Whole Genome Sequencing Data." *BMC Infect Dis* 13, no. 1 (2013): 110.
- Huyen MN, Tiemersma EW, Kremer K, de Haas P, Lan NT, Buu TN, et.al. "Characterisation of Mycobacterium Tuberculosis Isolates Lacking Is6110 in Viet Nam." *Int J Tuberc Lung Dis* 17, no. 11 (2013): 1479-85.
- Huyen MN, Kremer K, Lan NT, Buu TN, Cobelens FG, Tiemersma EW, et.al. "Clustering of Beijing Genotype Mycobacterium Tuberculosis Isolates from the Mekong Delta in Vietnam on the Basis of Variable Number of Tandem Repeat Versus Restriction Fragment Length Polymorphism Typing." *BMC Infect Dis* 13, (2013): 63.
- Huyen MN, Cobelens FG, Buu TN, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et.al. "Epidemiology of Isoniazid

Resistance Mutations and Their Effect on Tuberculosis Treatment Outcomes.” *Antimicrob Agents Chemother* 57, no. 8 (2013): 3620-7.

Huyen MN, Buu TN, Tiemersma E, Lan NT, Dung NH, Kremer K, et.al. “Tuberculosis Relapse in Vietnam Is Significantly Associated with Mycobacterium Tuberculosis Beijing Genotype Infections.” *J Infect Dis* 207, no. 10 (2013): 1516-24.

## Salmonellasurveillance

**Auteur:** Max Heck

**Betrokkenen:** Henny Maas, Sjoerd Kuiling, Anjo Verbruggen, Chantal Herrebrugh

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

De salmonellabacterie is nog steeds een belangrijke verwekker van gastro-enteritis. In Nederland raken jaarlijks ongeveer 65000 mensen besmet, waarvan ongeveer 10% bij de huisarts komt met klachten. Bij ongeveer de helft daarvan zijn de klachten zo ernstig, dat laboratoriumonderzoek wordt aangevraagd en een salmonella-infectie bevestigd (Figuur 1). Een deel van de medisch microbiologische laboratoria sturen salmonella stammen op naar het Clb-IDS in het kader van een surveillanceprogramma. Wij typeren de stammen verder en brengen daarmee de salmonellatypen in Nederland in kaart.

### Typering

Uitzonderlijke epidemiologische verheffingen van salmonella zijn in 2013 niet voorgevallen. Dit in tegenstelling tot 2012, waarin we de grootste epidemie beschreven die ooit in Nederland plaatsvond en die werd veroorzaakt door besmette zalm. In 2013 zijn 2934 salmonellastammen getypeerd. Dit houdt in dat het serotype is bepaald met behulp van agglutinerende antisera die gericht zijn tegen de oppervlakte- en flagellaire antigenen. Zowel non-profit als commerciële instellingen stuurden salmonellastammen in, afkomstig van humane en niet-humane bronnen (Tabel 1).

In 2013 zijn 196 serotypen gevonden. Het aantal en de variëteit verschilden niet veel van de voorgaande jaren (afgezien van het effect van de ‘zalmuitbraak’ in 2012, veroorzaakt door *Salmonella* Thompson). (Tabel 2).

Omdat de pulsed field gelelectrophoresis (PFGE) voor salmonella nog steeds als “gouden standaard” geldt voor subtypering van serotypen, houden we deze operationeel. Hiervoor is deelgenomen aan rondzendingen die het SSI in Denemarken organiseerde.

De Salmonellastammen die behoren tot de frequent voorkomende serovars Typhimurium en Enteritidis zijn verder getypeerd m.b.v. MLVA ( Multiple Locus Variable number of tandem repeat Analysis). Deze subtypering gebeurt volgens een standaard protocol dat in meerdere Europese landen wordt gebruikt. De MLVA-typeerdata worden verzameld in een moleculaire data base van het ECDC: TESSy (The European Surveillance System). Het Clb-IDS nam deel aan de pilot om MLVA-data rechtstreeks vanuit de Clb-IDS BioNumerics-database naar TESSy te transporteren. We hebben in november een “Investigators Meeting” van deze pilot bezocht.

**Tabel 1.** Ingezonden salmonellastammen voor typering

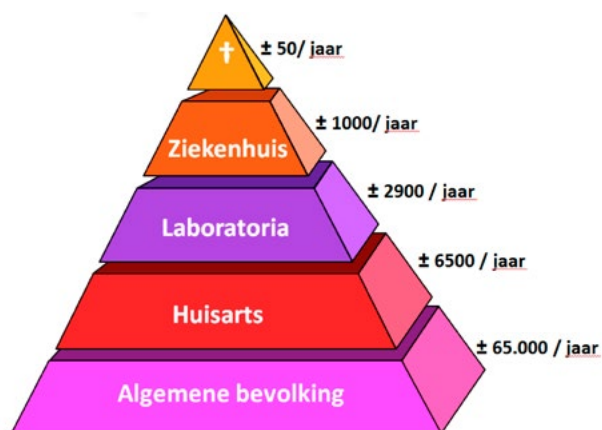
	Non-profit laboratoria*	Totaal
humane oorsprong	1297	1299
niet humane oorsprong	845	1635

\* 'preferred' partners: MML's, Clb-Z&O, NVWA, CVI/WUR, Gezondheidsdienst voor Dieren

**Tabel 2.** "Top 10" serotypen salmonella 2013 -2010

2013	2012	2011	2010
Enteritidis	Thompson	Typhimurium	Enteritidis
Typhimurium	Enteritidis	Enteritidis	Typhimurium
1,4,5,12:i:-	Typhimurium	4,[5],12:i:-	4,[5],12:i:-
Infantis	4,5,12:i:-	Paratyphi B variantie Java	Cubana
Paratyphi B variantie Java	Infantis	1,3,19:i:-	Infantis
Heidelberg	Paratyphi B variantie Java	Cubana	Worthington
Livingstone	4,12:i:-	Infantis	Paratyphi B variantie Java
Anatum	Derby	Derby	Senftenberg
Derby	Montevideo	Worthington	Livingstone
4,12:i:-	Livingstone	Livingstone	Derby

**Figuur 1.** Salmonella piramide. Aantal gevallen per jaar.



Op innovatief gebied is een project afgerond waarin de voorscreening voor serotypering door een moleculaire techniek wordt vervangen. We hebben een veelbelovende, op PCR gebaseerde methode ontwikkeld die sinds september 2013 is ingezet naast de traditionele methode. Evaluatie vindt plaats in 2014.

Naast het typen van Salmonella is in samenwerking met Clb-Z&O/EURL (European Union Reference Laboratory) de rondzending voor serotypering voor NRL's (National Reference Laboratories) opgezet. Daarnaast was het Clb-IDS in mei 2013 vertegenwoordigd op de EURL-workshop in St. Malo.

In november verscheen het rapport van de Onderzoeksraad voor de Veiligheid. Voor dit rapport zijn Daan Notermans en Max Heck geïnterviewd vanwege hun rol in het microbiologisch onderzoek bij de Salmonella Thompson uitbraak.(1)

#### **Publicaties en referenties**

Rapport Salmonella in gerookte zalm

<http://www.onderzoeksraad.nl/nl/onderzoek/1467/salmonella-in-gerookte-zalm>

European Union Reference laboratory (Eurl) for Salmonella

<http://www.eurlsalmonella.eu/>

Onderzoeksraad voor veiligheid

<http://www.onderzoeksraad.nl/>

## Antimicrobiële resistentie

**Auteur:** Ellen Stobberingh, Leo Schouls

**Betrokkenen:** Leo Schouls, Hester Bootsma, Kim van der Zwaluw, Thijs Bosch, Corrie Schot, Sandra Witteveen, Marga van Santen, Max Heck, Carla Nijhuis, Fabian Landman, Angela de Haan, Stephanie Natsch, Henny Maas

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

Antimicrobiële resistentie was ook in 2013 een belangrijke activiteit voor het Clb-IDS: Type-Ned, SAEMEN en SARAH zijn gecontinueerd of opgestart.

### Type-Ned

Type-Ned is in 2008 gestart als initiatief van een aantal medisch microbiologische laboratoria en het Clb (Centrum Infectieziektebestrijding), om vragen over verspreiding van micro-organismen sneller te kunnen beantwoorden.

Het Typeringsnetwerk-Nederland (Type-Ned) is een laboratoriumnetwerk dat gegevens rond mogelijk ziekteverwekkende micro-organismen uitwisselt via het internet. Op DNA-niveau wordt het type bepaald van de gevonden micro-organismen. Het systeem geeft daarmee inzicht in hoe vaak en waar deze mogelijke ziekteverwekkers in Nederland voorkomen en hoe zij zich verspreiden.

Type-Ned wordt gebruikt voor nationale surveillance, waarbij gekeken wordt hoe vaak en waar ziekteverwekkers voorkomen in Nederland. Daarnaast wordt Type-Ned gebruikt om uitbraken vast te stellen. Het systeem laat dus zien of, en zo ja waar, een bepaald type micro-organisme zich verspreidt binnen een zorginstelling of in Nederland.

Typeerresultaten en epidemiologische gegevens (data) zijn snel en eenvoudig beschikbaar voor de medisch microbiologische laboratoria (MML's). Dit maakt snellere en adequatere bestrijding mogelijk en geeft inzicht in de landelijke ontwikkelingen. Het laboratoriumnetwerk maakt gebruik van gestandaardiseerde typeringsmethoden en een web-applicatie. De deelnemers kunnen statistieken inzien van hun eigen data en deze spiegelen aan landelijke data. Daarnaast zijn er verschillende mogelijkheden voor data-analyse beschikbaar. Virologische en bacteriologische Type-Ned systemen zijn gebouwd op het moleculaire platform (MPF); de ICT-structuur van het RIVM. De systemen zijn verschillend opgezet.

### Type-Ned Virologie

Veel medisch microbiologische laboratoria voeren zelf de typering uit. De typeerdata worden per virus in één centrale database geplaatst. De medisch microbiologische laboratoria hebben toegang tot hun eigen data en die van de andere laboratoria. Met behulp van de beschikbare analyse en visualisatietools kunnen de data gecombineerd en vergeleken worden. In deze rapportage is ook de Type-Ned Enterovirus en humaan parechovirus-surveillance beschreven.

### Type-Ned Bacteriologie

De typeringen worden uitgevoerd door Clb-IDS. De data worden vervolgens beschikbaar gesteld voor de medisch microbiologische laboratoria in de centrale databases.

Het doel van Type-Ned Bacteriologie is landelijke trends van verspreiding van bacteriën in kaart te brengen. Daarnaast is het mogelijk om de toename van infecties die deze bacteriën veroorzaken in zorginstellingen vroegtijdig waar te nemen. Typeerdata en epidemiologische gegevens zijn snel beschikbaar voor het insturende MML (Medisch microbiologisch laboratorium) en voor de betrokken zorginstelling door gebruik te maken van de web-applicatie.

### Principe van Type-Ned Bacteriologie

De MML's melden isolaten van mogelijk pathogene bacteriën aan in een centrale database via de web-applicatie. Ieder isolaat krijgt hierdoor een uniek nummer. Nadat het unieke nummer is aangemaakt, sturen de MML's hun isolaten naar Clb-IDS voor typering. De verkregen isolaten worden in de centrale database geplaatst. Via de web-applicatie worden de bij het isolaat horende epidemiologische gegevens ook in de centrale database geplaatst. Dit wordt gedaan door personen die verantwoordelijk zijn voor infectiepreventie van de zorginstellingen. De databases zijn besloten en kunnen alleen via een inlognaam en wachtwoord benaderd worden.

De Type-Ned databasestructuur en de analysemodules zijn zo opgezet dat zij onafhankelijk zijn van typeermethode en bacteriesoort. Inzenders kunnen via de web-applicatie de database resultaten opvragen en verwerken in een Geo-module. Daarnaast kunnen zij met eenvoudige statistieken de relevantie bepalen van de gevonden resultaten.

### Type-Ned MRSA

Als eerste is de nationale MRSA-surveillance omgezet naar een Type-Ned systeem. In 2013 is een pilot gestart in enkele laboratoria. De planning is deze in 2014 verder uit te breiden naar 120 laboratoria. Type-Ned MRSA dient als blauwdruk voor Type-Ned systemen voor andere bacteriesoorten. Er wordt gewerkt aan Type-Ned systemen voor andere bijzonder resistente micro-organismen.

De Type-Ned MRSA-database wordt gevuld met de gegevens die verzameld worden in het kader van de nationale MRSA-surveillance. De besloten Type-Ned MRSA-database bevat data van alle MRSA (meticilline resistente *Staphylococcus aureus*)-isolaten die het RIVM sinds 1 januari 2008 voor de MRSA-surveillance ontvangen heeft. Elk medisch microbiologisch laboratorium kan alleen de eigen data zien en niet die van andere laboratoria.

In Type-Ned MRSA worden MRSA isolaten getypeerd met twee moleculaire typeermethoden: spa-typering en MLVA (multiple locus variable number of tandem repeat analysis) Naast de typering wordt de aanwezigheid bepaald van de genen die verantwoordelijk zijn voor meticilline-resistentie, namelijk het *mecA* of het *mecC* gen. Verder worden de MRSA-isolaten onderzocht op aanwezigheid van het gen *lukF*, dat betrokken is bij de vorming van het toxine Panton-Valentine leukocidine (PVL).

Het medisch microbiologisch laboratorium levert bij het aanmelden in de database ook beperkte, anonieme gegevens van de patiënt en van het materiaal waaruit de MRSA geïsoleerd



werd. Daarnaast wordt de database gevuld met relevante epidemiologische gegevens zoals gedefinieerd door de Werkgroep Infectie Preventie (WIP).

### **SARAH (Surveillance of Antibiotic ResistAncE in nursing Homes)**

Deze surveillancestudie is onderdeel van de surveillance van extra-murale antibioticaresistentie van de SWAB. Tot 2013 werd deze surveillance in het Maastricht Universitair Medisch Centrum, afdeling Medische Microbiologie uitgevoerd. Vanaf medio 2013 is het project overgegaan naar het Cib-IDS.

Verpleeghuizen worden over het algemeen beschouwd als een belangrijk reservoir van antibioticaresistente micro-organismen. De data die voor de Nederlandse situatie beschikbaar zijn, laten echter een grote variatie in prevalentie zien. De prevalentie van *Escherichia coli* die een Extended beta-lactamase produceert (ESBL) varieert bijvoorbeeld van 0% - 20%. Enerzijds is dit te verklaren door mogelijk regionale verschillen, anderzijds was de onderzoekspopulatie vaak relatief beperkt.

Het doel van SARAH is om het resistentieprobleem in verpleeghuizen in Nederland in kaart te brengen. Onderzocht wordt de prevalentie van antibioticaresistente/ ESBL producerende *E. coli* in de urine of het incontinentiemateriaal, én van meticilline resistente *Staphylococcus aureus* in de neus. Ook registreren we het antibioticagebruik (als de belangrijkste risicofactor voor antibioticaresistentie) en enkele algemene kenmerken van het huis (grootte, aantal specialisten, deskundigen infectiepreventie, zorgzwaarte van de bewoners en dergelijke)

Verpleeghuizen met meer dan 50 bewoners zijn benaderd voor deelname. De deelnemende verpleeghuizen zijn verspreid over het hele land, zodat we ook inzicht krijgen in mogelijke regionale verschillen. Tot nu toe zijn van >4000 bewoners uit 93 locaties en 33 zorggroepen de kweken afgenomen. Van de geïsoleerde *E. coli* en *S. aureus* wordt de resistentie tegen verschillende relevante antibiotica bepaald. Daarnaast onderzoeken we of de *E. coli* een Extended Spectrum beta-lactamase produceert, en of de *S. aureus* de *mecA* en *mecC* genen bezit, die verantwoordelijk zijn voor meticillineresistentie. Naast Cib-IDS werken Cib-EPI en het Universitair Medisch Centrum Nijmegen mee aan het onderzoek.

Vanaf 2014 wordt SARAH onderdeel van SNIV; het surveillance netwerk van infecties in verpleeghuizen.

### **SAEMEN**

Binnen het Cib zijn meerdere centra bezig met antibioticaresistentie, zowel vanuit de humane als veterinaire sector. Op veterinair gebied voert het Centrum Z&O (Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie) onderzoek uit naar het voorkomen van resistente *Escherichia coli* (ESBL-producerende stammen) bij dieren en in het milieu ( oppervlakte en afval water) en de verspreiding naar de mens. Het LCI (Landelijk Coördinatiecentrum Infectieziekten) houdt zich bezig met het opstellen van richtlijnen: hoe om te gaan met resistente micro-organismen buiten het ziekenhuis. Centrum EPI (Epidemiologie en Surveillance van Infectieziekten) is de projectleider van de landelijke surveillance van antibioticaresistentie, te weten ISIS-AR, en

centrum IDS (Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening) verricht (laboratorium) onderzoek naar de mechanismen en verspreiding van antibioticaresistente micro-organismen ten behoeve van de Openbare gezondheidszorg.

SAEMEN is gestart om de activiteiten op het gebied van antibioticaresistentie goed op elkaar af te stemmen. Daarnaast voorkomen we hiermee dat dubbel werk wordt gedaan of dat er 'witte vlekken' ontstaan door niet uitgevoerd onderzoek.

Regelmatig komen de vertegenwoordigers uit de verschillende centra bij elkaar en informeren elkaar over de lopende zaken. Daarnaast bespreken zij gezamenlijk het beleid van het Clb over antibioticaresistentie, en wordt dit voorbereid voor de directeur en het MT van het Clb.

SAEMEN is een acroniem voor de vertegenwoordigers: **S**: Sabine de Greeff (Clb-EPI), **A**: Aura Timen (Clb-LCI), **E**: Engeline van Duijkeren (Clb-Z&O), **M**: Mariken van der Lubben, coördinator antimicrobiële resistentie, **EN**: Ellen Stobberingh (Clb-IDS). Het secretariaat wordt gevoerd voor J Geraedts (Clb-SBI)

# Nieuwe methoden om pneumokokkeninfecties aan te tonen uit bloed en urine zonder kweek

**Auteur:** Karin Elberse

**Betrokkenen:** Gerlinde Pluister, Leo Schouls, Ingrid van de Pol

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

Vaccinatie tegen pneumokokkenziekten is in Nederland in 2006 geïntroduceerd als onderdeel van het Rijkvaccinatieprogramma (RVP). In 2006 is het 7-valente vaccin (Prevenar, PCV7) in Nederland geïntroduceerd en is in 2011 vervangen door het 10-valente vaccin (Synflorix, PCV10). De serotypen waar het vaccin tegen beschermt, veroorzaakten vóór de invoering van het vaccin ongeveer 60% van alle invasieve pneumokokkenziekten in Nederland.

Door de invoering van het vaccin in 2006 is in Nederland de door PCV7 serotypen veroorzaakte invasieve pneumokokkenziekten (IPD)-incidentie sterk gedaald in kinderen <5 jaar. In 2010 was er zelfs geen enkel geval van IPD door vaccin-serotypen. Ook komen bij niet-gevaccineerde personen minder IPD-gevallen voor die door vaccin-serotypen worden veroorzaakt. Dat komt door zogenaamde kudde-immuniteit. Echter, er worden juist meer IPD-gevallen veroorzaakt door sommige andere serotypen, die niet in het gebruikte vaccin zitten. Dit wordt 'serotype replacement' genoemd en is belangrijk, omdat hierdoor de effectiviteit van het vaccin om IPD te voorkomen in gevaar komt.

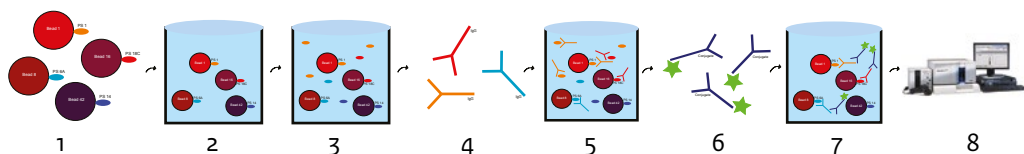
## Multiplex inhibitie assay (IMIA)

Om het serotype van een isolaat te bepalen, is een gekweekte stam nodig. Op een serologische wijze wordt vervolgens het serotype afgeleid. Een kweek is echter niet altijd voorhanden. Daarom hebben wij 2 methoden opgezet om pneumokokken direct uit bloed en urine te detecteren en te serotyperen.

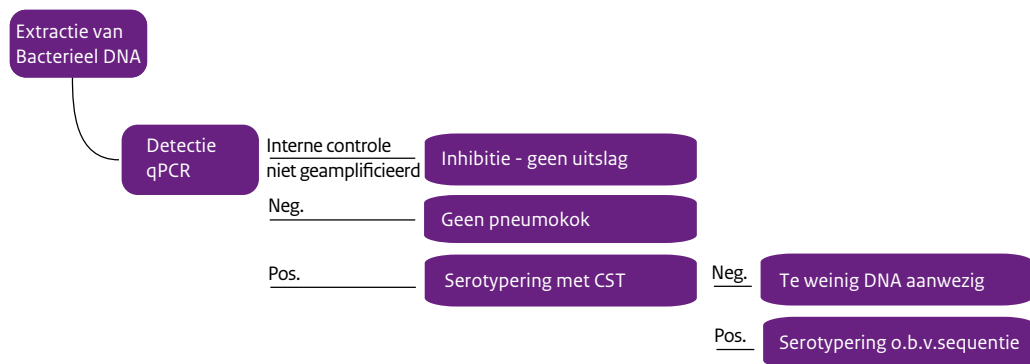
---

### Figuur 1. Overzicht van de inhibitie multiplex immunoassay (IMIA)

1: serotype specifieke polysacchariden koppelen aan beads (Pickering et al. 2002), 2: Beads toevoegen aan de well, 3: Polysacchariden toevoegen aan de well, 4: Serotype specifiek IgG toevoegen aan reactie, 5: Specifiek IgG bindt aan polysacchariden, 6: R-phycoerythrine geconjugeerd geit-anti-humaan IgG toevoegen, 7: Geconjugeerd IgG bindt aan serotype specifiek gebonden IgG, 8: Meting van fluorescentie beads, fluorescentie conjugaat -> serotype specifiek [IgG]



**Figuur 2.** Flowchart voor de werkwijze van de detectie PCR en Capsular Sequence typing (CST) uit bloed.



De eerste methode is de multiplex inhibitie assay (IMIA). Dit is een serotype-specifieke antigeentest waarbij gebruik wordt gemaakt van Luminex-technologie (Figuur 1). Met deze test kunnen we direct uit urine het serotype bepalen van de pneumokok die de infectie veroorzaakt. Dit is mogelijk doordat pneumokokken-polysachariden tijdens een infectie worden uitgescheiden in de urine. Met deze methode kunnen op dit moment 14 verschillende serotypen worden aangetoond.

### Capsular sequence typing

DNA van pneumokokken geïsoleerd uit bloed van een patiënt kan worden gebruikt voor moleculaire detectie en serotypering (Figuur 2). Door middel van een real time PCR (qPCR) wordt eerst het DNA van de pneumokok gedetecteerd. De monsters die positief zijn voor een pneumokokkeninfectie, worden vervolgens getest met de capsular sequence typing. Met deze methode wordt op een moleculaire wijze het ‘serotype’ van een stam bepaald. Het wzh-gen is een regulatiegen uit het kapselgenencluster. Bij de CST-methode wordt een gedeelte van dit gen geamplificeerd en gesequencet. Met deze methode is een groot aantal serotypen van elkaar te onderscheiden. Voordeel van deze moleculaire typering is dat het kweken van een stam uit bloed overbodig wordt.

### In de praktijk

De nieuwe methoden zijn getest in samenwerking met het Sint Antonius Ziekenhuis Nieuwegein. Het gebruikte materiaal is afkomstig is van een studie naar verwekkers van ‘community acquired pneumonia’. Van de materialen die positief zijn bevonden door de detectie PCR (n=16 van de 211 getest) en/of de IMIA (n=39 van de 223 getest), kon in 78% (n=37) van de gevallen een serotype worden toegekend aan de pneumokok die de infectie veroorzaakte. Door gebruik van deze methoden kan in de toekomst ook zonder kweek een serotype toegekend worden aan een pneumokok.

### **Internationale samenwerking op gebied van pneumokokken**

Het RIVM maakt actief onderdeel uit van het 'Laboratory surveillance Network of Invasive Bacterial Diseases (IBD-LabNet)'. Dit is een Europees consortium dat wordt gefinancierd door het ECDC. Het zet zich in om surveillance van pneumokokken en andere verwekkers van invasieve ziekten op te zetten en uit te breiden. Het consortium wil dit doen door meer landen te betrekken, die nu niet of nauwelijks aan surveillance doen. Zij faciliteert deze landen in het opzetten van methoden om pneumokokken te typeren.

De afgelopen periode is het rapport over harmonisering en standaardisering van de typering van pneumokokken afgerond; een mijlpaal. De belangrijkste conclusie uit het rapport is de aanbeveling om de Capsular Sequence Typing (CST) en de Multilocus Sequence Typing (MLST) te gebruiken voor kiemsurveillance van de pneumokok. De CST wordt gebruikt om het serotype te bepalen en de MLST om de genetische achtergrond van het isolaat te bepalen. In februari 2014 is daarom op het RIVM een training georganiseerd voor het praktisch uitvoeren en analyseren van data van de CST. Deze 2-daagse workshop is begeleid door het Cib-IDS en gevolgd door 6 Europese gasten. Zij hebben deze workshop positief beoordeeld en met succes een aantal pneumokokken-isolaten getypeerd en geanalyseerd.

## Het gebruik van omics om de toename in kinkhoest te verklaren.

**Auteur:** Frits R. Mooi

**Betrokkenen:** Marjolein van Gent, Marieke Bart, Anne Zeddeman, Han van der Heide, Kees Heuvelman en Nicoline van der Maas.

**Contactpersoon:** Frits R. Mooi (frits.mooi@rivm.nl)

Ondanks vaccinatie neemt kinkhoest toe. Door een combinatie van genomics en transcriptomics (gezamenlijk ook wel aangeduid als “omics”) is inzicht verkregen in de mechanismen waarmee de kinkhoestbacterie, *Bordetella pertussis*, epidemieën veroorzaakt. De verkregen inzichten kunnen vertaald worden in beleidsadviezen, keuze en aanpassing van vaccins en zijn ook van belang voor andere pathogenen waartegen wordt gevaccineerd.

Hoewel kinkhoest al jaren toeneemt, zijn er vooral in de laatste 3 jaren verrassend grote epidemieën geweest in Nederland, Groot Brittannië, Australië en de Verenigde Staten. De toename van kinkhoest berust op een aantal oorzaken waarvan het belang kan verschillen tussen landen (1). Twee oorzaken springen eruit, en worden ook door onderzoek gestaafd; de omschakeling van hele-cel vaccins (HCV's) naar acellulaire vaccins (ACV's) en pathogeenadaptatie. Wat betreft eerstgenoemde: verschillende studies hebben aangetoond dat op langere termijn (5-10 jaar) de HCV-geïnduceerde immuniteit superieur is, hoewel HCV's en ACV's op korte termijn weinig verschillen in effectiviteit. Daartegenover staat, dat ACV's minder bijwerkingen hebben dan HCV's.

Het sneller wegebben van immuniteit geïnduceerd door HCV's, wordt versterkt door adaptaties in de kinkhoestbacterie. In samenwerking met het Sanger Instituut (Cambridge) is hierin meer inzicht verkregen door de genomsequenties te bepalen van een wereldwijde collectie van (343) *B. pertussis* stammen (2). Een opvallend resultaat is dat er niet of nauwelijks sprake is van geografische clustering. Dit impliceert dat nieuwe, succesvolle, stammen zich snel over de wereld verspreiden. Het RIVM-Sanger project maakte het mogelijk de veranderingen in genen in de tijd te volgen. Het onderzoek richtte zich op genen die coderen voor de vaccincomponenten pertussis toxine (*ptxA*), pertactine (*prn*), serotype 2 (*fim2*) en 3 (*fim3*) fimbriae (Figuur 1). Hieraan is ook de promotor voor Ptx toegevoegd, omdat RIVM-onderzoek heeft aangetoond dat stammen met een bepaalde Ptx promotorvariant (*ptxP3*) geassocieerd zijn met uitbraken. Uit de analyse van de wereldwijde collectie blijkt dat mutaties in genen van vaccincomponenten ontstaan zijn na de introductie van vaccinatie, met uitzondering van *ptxA* en *prn*. Alle mutaties resulteren in divergentie met vaccinstammen. Hoewel “niet-vaccintypen” van *ptxA* en *prn* circuleerden vóór de introductie van vaccinatie, trad pas expansie van deze typen op nadat vaccinatie al een tijd was toegepast. Het is dus aannemelijk dat vaccinatie één van de drijvende krachten is, die geleid hebben tot verschuivingen in de *B. pertussis* populatie. In een diermodel is bovendien aangetoond dat sommige van deze veranderingen de vaccineffectiviteit verminderen.

De toename van kinkhoest in Nederland is vooral geassocieerd met de opkomst van stammen die een nieuwe variant van de Ptx-promotor bevatten; *ptxP3*. De *ptxP3* stammen hebben in Nederland in ongeveer 10 jaar de bestaande *ptxP1*-populatie geheel verdreven. Uit het RIVM-

Sanger onderzoek blijkt dat dit een wereldwijd fenomeen is. Daarom rijst de vraag welke eigenschappen de *ptxP3* zo bijzonder “fit” maken. Inzicht hierin is verkregen door een *ptxP3* en een *ptxP1* stam te vergelijken met transcriptomics. Met deze techniek, opgezet in samenwerking met het Radboudumc, kon de expressie van 80% van de 3,400 *B. pertussis* genen gekwantificeerd worden. We vonden dat 30 virulentie-geassocieerde eiwitten hoger tot expressie komen in de *ptxP3* stam (3). Tot deze 30 eiwitten behoren twee toxinen (waaronder Ptx) en drie eiwitten die betrokken zijn bij complement-resistentie. Adaptaties leggen zwakke plekken bloot in de afweer van de bacterie en de gevonden eiwitten zijn daarom interessante vaccinkandidaten. Van de 30 eiwitten zit alleen Ptx in ACV's. In een muismodel is aangetoond dat één van de 30 eiwitten, dat betrokken is bij complement resistentie, zeer goed beschermt tegen infectie.

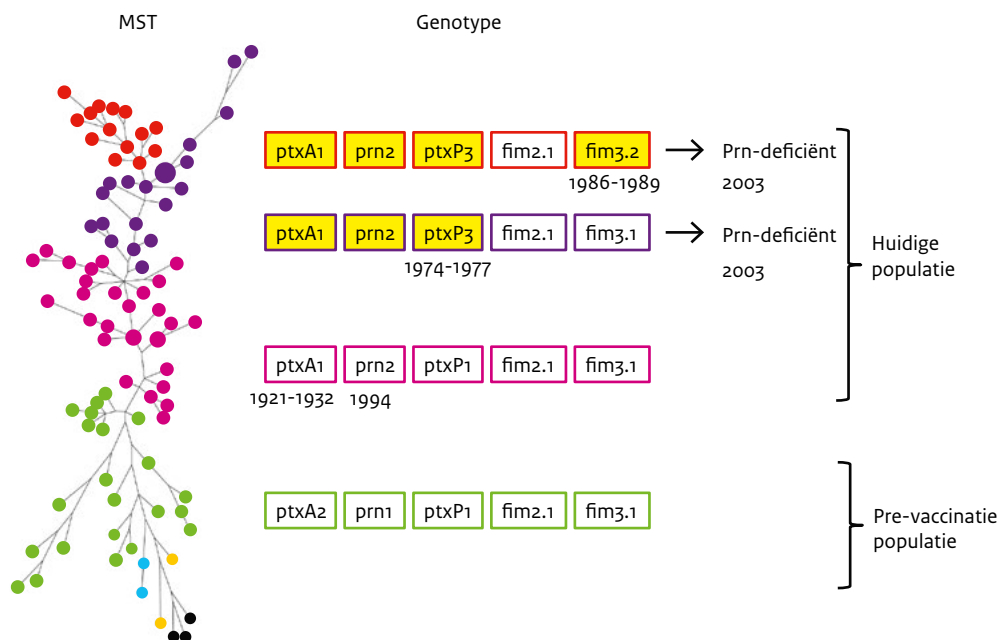
De volgende vraag die rijst, is op welke genetische loci de unieke eigenschappen van de *ptxP3* stam berusten. Daarom is de genomesequentie van een aantal *ptxP3* stammen bepaald en vergeleken met de *ptxP1*-stam. Opvallend is dat de genomen relatief weinig verschillen vertonen. Echter, de twee stammen verschillen in de aan- of afwezigheid van 35 genen. Nader onderzoek met een grotere collectie stammen moet uitwijzen of deze genen bijdragen aan de wereldwijde verspreiding van de *ptxP3*, en zo ja, hoe.

Een verontrustende, recente ontwikkeling betreft het opkomen van stammen die één van de vaccincomponenten (Prn) niet meer produceren. In de VS bestaat ongeveer 50% van de *B. pertussis*-populatie uit Prn-deficiënte stammen. Uit ons onderzoek blijkt dat de Prn-deficiënte stammen vooral zijn ontstaan uit de *ptxP3*-familie (4) (Figuur 1). In samenwerking met Europese partners, is door ons vastgesteld dat het percentage Prn-deficiënte stammen in veel Europese landen, waaronder Nederland, nog laag is (ongeveer 5%)(5). Uitzonderingen zijn Frankrijk (17%) en Noorwegen (25%). Samen met het Radboudumc wordt nu onderzocht in hoeverre de effectiviteit van ACV's wordt beïnvloed als stammen geen Prn produceren.

Ons onderzoek resulteert in een aantal adviezen en inzichten. De hogere productie van Ptx door *ptxP3*-stammen, onderstreept het belang van Ptx-neutraliserende antilichamen. Huidige vaccins verschillen in Ptx-gehalte en ons onderzoek pleit voor de keuze van vaccins met een hoog gehalte aan Ptx. Een volgende conclusie uit ons onderzoek is dat complement een belangrijke rol speelt bij de afweer tegen kinkhoest. Mogelijk kunnen kinkhoestvaccins verbeterd worden door bacterieproducten toe te voegen die de werking van complement hinderen. Een van deze producten is door ons getest in een muismodel en blijkt zeer effectief. De opkomst van stammen die geen Prn produceren, pleit voor vaccins die een brede immuniteit induceren en dus meerdere componenten bevatten. Deze aanname is nogal speculatief en door de opkomst van escapemutanten in landen te volgen die verschillende vaccins gebruiken, hopen wij meer bewijs voor deze stelling te verzamelen.

**Figuur 1.** Adaptaties in de wereldwijde *Bordetella pertussis* populatie.

Links, een “Minimum Spanning Tree” (MST) die de relatie weergeeft tussen wereldwijd circulerende stammen. De boom is gebaseerd op 343 genoomsequenties. De oudste stammen worden (veelal) onder aangetroffen en de jongste takken boven. Rechts van de MST zijn de genvarianten van de vaccincomponenten weergegeven, in dezelfde kleuren als de takken van de MST (FHA is niet weergegeven). Niet-vaccintypen zijn geel gekleurd. De periode waarop mutaties zijn ontstaan (*ptxA1*, *ptxP3* en *fim3.2*) of voor het eerst in significante frequenties zijn waargenomen (*prn2* en Prn-deficiënte stammen) zijn aangegeven. Details kunnen verschillen tussen landen.



### Publicaties en referenties

- Mooi FR, van der Maas NA and de Melker HE. “Pertussis Resurgence: Waning Immunity and Pathogen Adaptation - Two Sides of the Same Coin.” *Epidemiol Infect* 142, no. 4 (2014): 685-94.
- Bart MJ, Harris SR, Advani A, Arakawa Y, Bottero D, Bouchez V, et.al. “Global population structure and evolution of *Bordetella pertussis* and their relationship with vaccination”. Accepted, *mBio* 2014.
- de Gouw D, Hermans PW, Bootsma HJ, Zomer A, Heuvelman K, Diavatopoulos DA, et.al. “Differentially Expressed Genes in *Bordetella Pertussis* Strains Belonging to a Lineage Which Recently Spread Globally.” *PLoS One* 9, no. 1 (2014): e84523.
- Zeddeman A, van Gent M, Heuvelman CJ, van der Heide HGJ, Bart M, Advani A, et al. Investigations into the emergence of pertactin -deficient *Bordetella pertussis* isolates in Europe. *Eurosurveillance*. 2014.



# Parasitologie

## Cryptosporidiumtypering

**Auteur:** Titia Kortbeek

**Betrokkenen:** Nahid Nozari, Denise Hoek, Sietze Brandes, Jeroen Roelfsema, Wilfrid van Pelt, Barbara Schimmer

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

In de nazomer van 2012 was er sprake van een verheffing van het aantal *Cryptosporidium*-infecties in bijna heel Nederland. Ondanks een case-control studie van het Clb in samenwerking met een aantal GGD'en is hiervoor helaas geen bron gevonden (1). *Cryptosporidium* is een parasiet die vooral bij jonge kinderen heftige, waterdunne diarree veroorzaakt. In de nazomer wordt vaak een toename gezien. Er zijn geen medicijnen beschikbaar voor behandeling. Vooral bij immuun-gecompromiteerde patiënten kan een infectie levensbedreigend zijn. De transmissieroutes zijn mens-mens, dier-mens (kalveren, biggen en geiten), voedsel en water. Besmetting via water kan plaatsvinden door te zwemmen in natuurwater of zwembad, of door het drinken van gecontamineerd oppervlaktewater. *Cryptosporidium* kent twee voor de mens belangrijke types: *Cryptosporidium hominis* en *Cryptosporidium parvum*. De laatste kan een zoönose zijn.

Om meer inzicht te krijgen in de epidemiologie van *Cryptosporidium* in Nederland, is een 2-jarig project gestart door het Clb. Hierin speelt ook de moleculaire typering van *Cryptosporidium* een belangrijke rol.

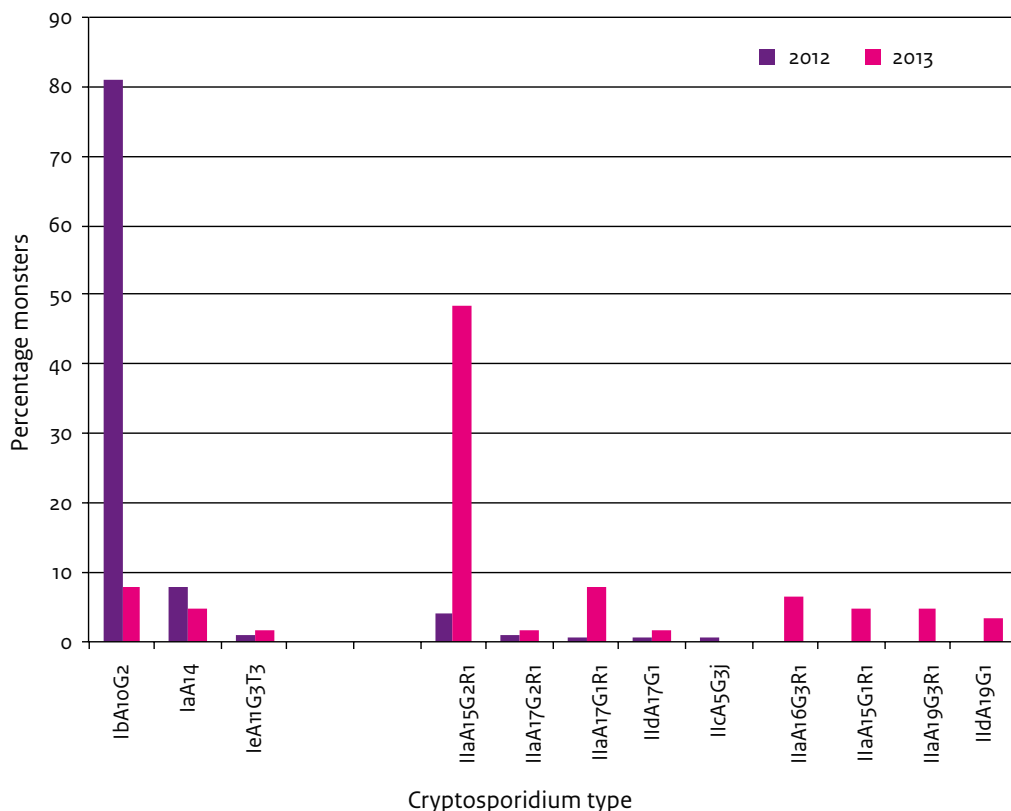
Nadat een moleculaire typering is opgezet, bleek uit de resultaten dat het in 2012 ging om een infectie met *Cryptosporidium hominis* van eenzelfde type. Van alle typeerbare monsters is 82% getypeerd als IbA10G2. Dit type bleek ook in het Verenigd Koninkrijk het belangrijkste subtype te zijn. *C. hominis* is een *Cryptosporidium* subspecies dat zich niet zoönotisch verspreidt.

In de zomer van 2013 bleek opnieuw sprake te zijn van een groter aantal *Cryptosporidium* positieve monsters in de medisch microbiologische laboratoria. In deze monsters werd echter vooral *C. parvum* gevonden.

Ongeveer de helft van de monsters die de verheffing veroorzaakten in 2012 zijn geanalyseerd met sequentie-analyse op een hoog informatieve marker; GP60. Daarnaast is ook een PCR ontwikkeld waarmee we specifiek *C. parvum* en *C. hominis* van elkaar kunnen onderscheiden op een snellere manier (multiplex PCR, lightcycler). Deze PCR is gebruikt om alle monsters uit 2012 te testen en is nu operationeel bij het lopende onderzoek. De sequentie-analyse op GP60 is ook uitgevoerd op een steekproef van 77 monsters uit 2013. Daaruit blijkt niet alleen dat *C. parvum* in 2013 de meest voorkomende soort is, maar het valt ook op dat we meer verschillende typen vinden in 2013. In de 77 monsters uit 2013 zijn negentien verschillende genotypen gevonden, tegenover vijftien verschillende genotypen in 268 getypeerde monsters uit 2012. In figuur 1 zijn de verschillen tussen beide jaren met de meest voorkomende genotypen geïllustreerd.

**Figuur 1.** Vergelijking van de frequenties van de meest voorkomende GP60 genotypen uit 2012 en 2013.

Duidelijk zichtbaar is de sterke daling van het dominante IbA10G2 genotype in 2013. Ook is zichtbaar dat in 2013 *C. parvum* het meest voorkomt, vooral genotype IIaA15G2, maar dat dit genotype niet zo dominant is als IbA10G2 in 2012.



**Publicaties en referenties:**

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.* 2013 Jan 10;18(2).

## Toxoplasma: voorstel voor verbetering van communicatie

**Auteur:** Titia Kortbeek

**Betrokkenen:** Hella Smit, Remco Hogenbirk

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



In 2012 heeft het Clb-IDS een beleidsadvies opgesteld met betrekking tot de bestrijding van toxoplasmose in Nederland(1). De directie Publieke Gezondheid van het ministerie van VWS vroeg om dit advies, waarmee zij kan afwegen of een intensievere bestrijding nodig is van toxoplasmose. Naar aanleiding van dit beleidsadvies is het Clb gevraagd om met een voorstel te komen hoe de communicatie rond toxoplasmose verbeterd kan worden.

Toxoplasmose is een ziekte, veroorzaakt door een eencellige parasiet. De ziekte heeft verschillende verschijningsvormen en ernst van ziektebeelden. Er wordt onderscheid gemaakt tussen verworven en aangeboren toxoplasmose. Als iemand eenmaal geïnfecteerd is, dan blijft de parasiet levenslang aanwezig. Bij gezonde personen verloopt verworven toxoplasmose meestal zonder symptomen, of het veroorzaakt weinig-specifieke klachten zoals langdurige vermoeidheid. Bij een minderheid kunnen oogafwijkingen met schade aan het oog (oculaire toxoplasmose) en lymfklierzwellingen optreden. Incidenteel ontstaan ernstiger verschijnselen. Bij immuungestoorden kan een oude infectie opvlammen en ernstige schade aanrichten, vooral in de hersenen.

Als een zwangere tijdens haar zwangerschap voor het eerst met de parasiet in aanraking komt en geïnfecteerd raakt, kan dat congenitale infecties veroorzaken. Als dit vroeg in de zwangerschap gebeurt, is de kans op ernstige schade aan het kind groot. Hoe later in de zwangerschap de infectie plaatsvindt, hoe groter de kans dat het kind geïnfecteerd raakt. Bij geboorte hebben deze kinderen echter meestal geen uiterlijke tekenen van infectie, waardoor ze niet herkend en behandeld worden. Zij ontwikkelen echter wel symptomen, vooral aan de ogen, wat vaak pas na jaren wordt opgemerkt. Uit de berekening van de ziektelast van toxoplasmose, bleek deze ziekte hoog te scoren op het aantal DALY's (Daily Adjusted Life Years: aantal verloren levensjaren), vergeleken met andere voedseloverdraagbare infecties in Nederland (2). Uit een pilotonderzoek van neonataal hielprikbloed van 2006 is gebleken dat in Nederland relatief veel congenitale toxoplasmose voorkomt, namelijk 2 per 1000 levendgeborenen (3). Toxoplasmose scoort bovendien hoog in de zogeheten Emzoo lijst: een lijst met emergentia zoönosen, die is opgesteld in opdracht van het ministerie van Landbouw in 2010 (4).

In 2013 is gewerkt aan een advies voor verbetering van de voorlichting, vooral gericht op congenitale toxoplasmose.



Verbetering van de voorlichting over congenitale Toxoplasma-infecties is mogelijk door:

1. De voorlichting aan **zwangere vrouwen** te verbeteren. Het doel is hun gedrag te veranderen, waardoor blootstelling aan Toxoplasma wordt verminderd. In het beleidsadvies geven we aan dat dit mogelijk is door rekening te houden met specifieke doelgroepen, bijvoorbeeld allochtone vrouwen. Daarnaast moeten de communicatiemiddelen beter aansluiten op deze doelgroepen, mogelijk door andere, moderne communicatiemiddelen te gebruiken.
2. Het kennisniveau te verhogen van de **betrokken medische beroepsgroepen** die tijdens de zwangerschap en geboorte, of in een later stadium met kinderen te maken krijgen die congenitaal zijn geïnfecteerd. Enerzijds moet dit leiden tot betere preventie doordat de betrokken medici voorlichting geven aan zwangere vrouwen. Anderzijds moet dit leiden tot betere herkenning van het ziektebeeld en betere kennis van de behandeling.

De manier waarop de voorlichting voor deze twee groepen wordt uitgevoerd, is nader toegelicht in het rapport aan het ministerie.

### Publicaties en referenties

M.Opsteegh| L.M. Kortbeek| J.W.B. van der Giessen Beleidsadvies met betrekking tot de bestrijding van toxoplasmose in Nederland RIVM briefrapport 330061001/2011

<http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:182239&type=org&disposition=inline>

Havelaar AH, Haagsma JA, Mangen MJ, Kemmeren JM, Verhoef LP, Vijgen SM, Wilson M, Friesema IH, Kortbeek LM, van Duynhoven YT, van Pelt W. Disease burden of foodborne pathogens in the Netherlands, 2009. *Int J Food Microbiol.* 2012 Jun 1;156(3):231-8

Kortbeek LM, Hofhuis A, Nijhuis CD, Havelaar AH. Congenital toxoplasmosis and DALYs in the Netherlands. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 Mar;104(2):370-3.

RIVM rapport 330214002 Emerging zoonoses: early warning and surveillance in the Netherlands; <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330214002.pdf>



# Virologie

## Bijzondere virologische diagnostiek: zoönosen en zeldzame infecties

**Auteur:** Johan Reimerink

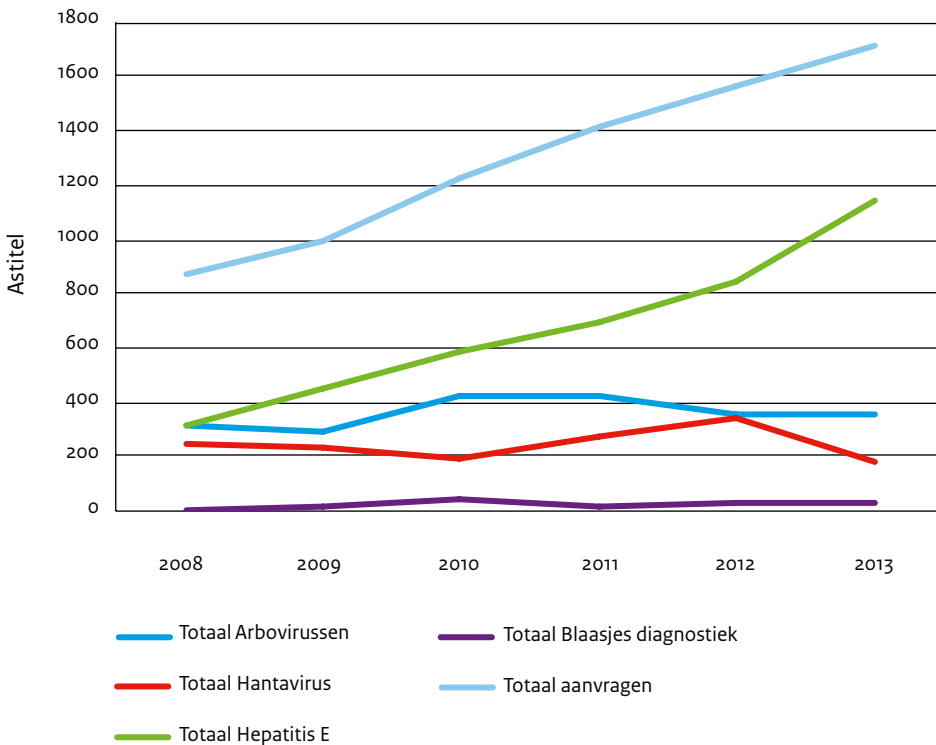
**Betrokkenen:** Marjan Kuijer, Ngoc Hoa Chung, Jacinta Bakker, Ilse Zutt, Chantal Reusken, Gert-Jan Godeke, Ankje de Vries, Hans Krul, Harry Vennema, Bas van der Veer, Anne-Marie van den Brandt, Jeroen Cremer, Sharon van den Brink, Erwin de Bruin, Marion Koopmans.

**Medische eindverantwoordelijkheid:** Daan Notermans, Titia Kortbeek

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

Het RIVM voert bepalingen uit voor zeldzame infectieziekten waarvoor in Nederlandse medisch microbiologische laboratoria geen of onvoldoende diagnostische bepalingen voorhanden zijn. Daarnaast is het belangrijk om een landelijk dekkend diagnostisch netwerk beschikbaar te houden voor pathogenen die van belang worden geacht voor de volksgezondheid in Nederland, onder andere om voorbereid te zijn op nieuwe bedreigingen. De diagnostiek die binnen dit project wordt uitgevoerd is hier een voorbeeld van. Het pakket is beschreven in het diagnostisch vademecum.

**Figuur 1.** Trends in aanvragen diagnostiek





**Tabel 1.** Overzicht in aanvragen diagnostiek

	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Dengue virus	263	246	346	337	264	276
West Nile virus	25	21	23	38	37	24
Tick-Born Encephalitis	26	18	24	26	36	32
Chikungunya virus	nvt	6	25	24	19	26
Totaal Arbovirussen	314	292	418	425	355	358
Hantaan virus	117	117	94	135	170	89
Puumala virus	129	119	96	137	168	92
Hantavirus PCR					14	0
Totaal Hantavirus	246	236	190	272	338	181
Hepatitis E ELISA	224	291	379	482	618	859
Hepatitis E IB	33	62	78	79	75	113
Hepatitis E PCR	53	104	123	134	145	168
Totaal Hepatitis E	310	457	580	695	838	1140
Parapoxvirus PCR		5	23	11	18	20
Parapoxvirus typering		1	8	5	2	8
Herpesvirus PCR			3	1	1	2
Herpesvirus typering				1	1	
Varicellavirus PCR			3		1	
Orthopoxvirus crmB gen PCR		1				
Orthopoxvirus RDRP gen PCR		5			4	1
Orthopoxvirus typering		1				
Totaal Blaasjes diagnostiek	nvt	13	37	18	27	31
Totaal aanvragen	870	998	1225	1410	1558	1710

In 2013 zijn er weer meer aanvragen voor bijzondere virologische diagnostiek binnen gekomen ten opzichte van voorgaande jaren. Met 1558 aanvragen in 2012 en 1710 in 2013 zet deze stijgende trend zich voort (Figuur 1 en Tabel 1). Het totaal aantal aanvragen voor arbovirus-diagnostiek is stabiel gebleven en de verdeling over de verschillende virussen is onveranderd. De meeste aanvragen zijn voor denguevirus-diagnostiek. Door de wereldwijde toename in de verspreiding van chikungunyavirus in gebieden waar ook denguevirus endemisch voorkomt, is de kans steeds groter dat reizigers terugkomen met een chikungunyavirusinfectie. Zoals we al eerder hebben laten zien is er onderdiagnose van deze infectieziekte en daarom hebben we

**Figuur 2.** *Aedes aegypti* (l) en *Aedes albopictus* (r).

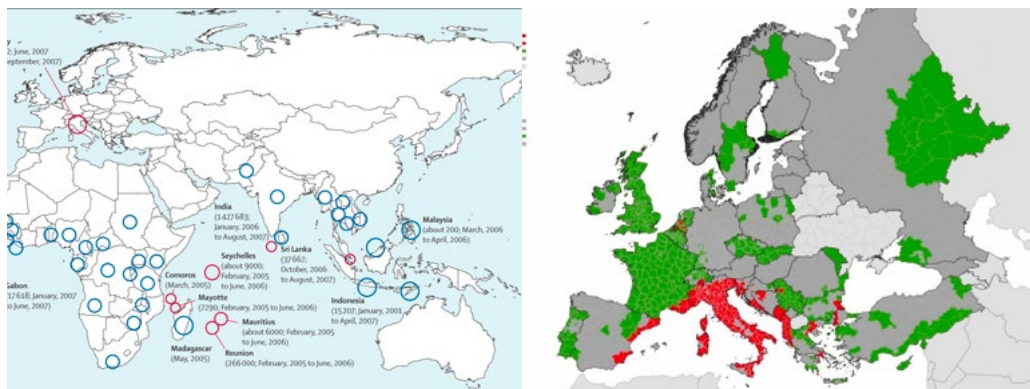


besloten de diagnostiek aan te passen. We bieden een multiplex-IFA aan, waarbij we parallel antistoffen tegen denguevirus, chikungunyavirus en Japanse encefalitisvirus aantonen. Hantavirusdiagnostiek is weer terug op het niveau van vóór 2012. Dat was ook een uitzonderlijk jaar door de uitbraak van Sin Nombre virus in Yosemite national park in de VS. Naar aanleiding van deze uitbraak én signalen uit de ons omringende landen dat het Seoulvirus opruikt, is het diagnostiepakket hantavirussen uitgebreid. Een viertal virussen zijn toegevoegd aan Hantavirus en Puumala virus, namelijk Seoulvirus, Dobrovavirus, Sin Nombre virus en Saarema virus. Het aantal hepatitis E diagnostieaanvragen blijft toenemen. Dit komt doordat dit in veel centra in toenemende mate onderdeel is gaan uitmaken van de differentiaaldiagnose bij een geval van hepatitisvirusinfectie.

#### **Uitgelicht: Chikungunyauitbraak Caribisch gebied**

Chikungunya virus (CHIKV) is een door muggen overdraagbaar arbovirus van het genus *Alphavirus* in de familie *Togaviridae*, dat milde koorts en gewrichtspijnen veroorzaakt. De benaming is afkomstig van het Makonde-woord voor “wat krombuigt”. Daarmee verwijst het naar de artritis-symptomen. Het virus werd voor het eerst vastgesteld in 1955 in het tegenwoordige Tanzania, naar aanleiding van een uitbraak van het virus in 1952/1953. Het genus bestaat uit verschillende serocomplexen die gebaseerd zijn op antigene eigenschappen, waarbij CHIKV behoort tot het Semlike Forest serocomplex. De belangrijkste vectoren zijn muggen uit de *Aedes* familie, die voorkomen in tropische gebieden en subtropische gebieden. Ook in delen van Europa hebben zij zich gevestigd. Het virus kwam vooral voor in Afrika, zuid en zuidoost Azië en eilanden in de Indische oceaan zoals aangegeven in figuur 3. Doordat de vector zich verspreidt, bestaat nu de mogelijkheid dat het virus ook meer voorkomt in andere geografische gebieden.

**Figuur 3.** Wereldwijde distributie van Chikungunya virus (Burt et al. 2011 Lancet; 379: 662-71) en verspreiding van de vectoren in Europa.



### Uitbraak

Het French National Reference Centre for arboviruses in Marseille rapporteerde op 5 december 2013 een aantal geconfirmeerde, autochtone gevallen van chikungunya op het Franse eiland Saint Martin. Op 20 december werden 50 gevallen gerapporteerd op het eiland Martinique en in januari volgden er meerdere eilanden; Guadeloupe, Saint Barthelemy, de Dominicaanse republiek en de Britse maagdeneilanden. Het eerste geval op het Nederlandse deel van St. Maarten is geconfirmeerd op 22 december in Marseille. De eerste ziekte dag was 6 december. Vanaf januari is het RIVM gevraagd de diagnostiek voor chikungunyavirus op zich te nemen en worden er regelmatig sera opgestuurd. Het algoritme dat gebruikt wordt is als volgt: eerst wordt een PCR uitgevoerd op de sera. Vervolgens wordt op de PCR-negatieve monsters serologie uitgevoerd met behulp van een IFA van Euroimmun, omdat de viremische fase na een infectie kort is (ongeveer 5 dagen). Op 27 februari is het totaal aantal geconfirmeerde gevallen voor het Nederlandse deel van St. Maarten 123, maar dit zal zeker nog toenemen. Er zijn nog geen gevallen gemeld op de andere bovenwindse eilanden uit het Nederlands koninkrijk, Saba en St. Eustatius, en op de benedenwindse eilanden. Uitzondering is Aruba, waar een importgeval is gemeld van een persoon die St. Maarten heeft bezocht. Het is zeer aannemelijk dat het virus zich ook naar andere eilanden in het Caribisch gebied verspreid. Door de wereldwijde toename van Chikungunya virus neemt ook de kans toe dat er meer reizigers terugkomen met een CHIKV infectie. Daarnaast heeft de vector zich al in de zuidelijke landen van Europa gevestigd, waardoor de kans bestaat dat het virus in Europa geïntroduceerd wordt. In 2007 gebeurde dit bijvoorbeeld in Italië. Een viremische reiziger introduceerde het virus in een gebied waar *Aedes albopictus* muggen gevestigd waren. Het resultaat was een uitbraak waarbij 160-200 mensen besmet raakten. Daarnaast duiken exotische muggen steeds opnieuw op, onder andere door import van banden en planten. Beiden zijn een reden voor permanente waakzaamheid.

## Emerging infections en bijzondere diagnostiek: Middle-East Respiratory Syndrome coronavirus

**Auteur:** Chantal Reusken

**Betrokkenen:** Gert-Jan Godeke, Ilse Zutt, Rita De Sousa, Adam Meijer, Marcel Jonges, Piet Overduin, Bas van der Veer, Jeroen Cremer.

**Projectleider:** Marion Koopmans (marion.koopmans@rivm.nl; m.koopmans@erasmusmc.nl)

**Contactpersoon:** Chantal Reusken (c.reusken@erasmusmc.nl)



Bij een thema als ‘emerging infections’ hoort acuut inspringen op nieuwe ontwikkelingen. Vaak gaat het om infecties die zich afspelen in het (verre) buitenland, maar die geïmporteerd kunnen worden door reizigers. Ter ondersteuning van de laboratorium respons- en diagnostiekfunctie van IDS, wordt onderzoek verricht aan verschillende nieuwe virussen.

### MERS-coronavirus

In 2012 dook een nieuw humaan coronavirus op op het Arabische Schiereiland; het Middle-East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). Eind september 2012 berichtten onderzoekers van het Erasmus Medisch Centrum (EMC) over een nieuw humaan coronavirus dat was geïdentificeerd in een overleden patient uit Saudi-Arabië met ARDS (acute respiratory distress syndrome). Deze melding leidde tot een snelle gezamenlijke internationale laboratorium respons. Hierdoor waren moleculaire diagnostiek en referentiematerialen beschikbaar binnen 1 week na de eerste melding. Deze diagnostiek is direct geïmplementeerd bij het Clb. In 2013 is bij 32 personen diagnostiek verricht naar MERS-CoV. Deze personen hadden (ernstige) respiratoire klachten die zich ontwikkelden binnen 14 dagen na terugkeer uit het Midden-Oosten. Alle patiënten testten negatief, zowel bij Clb-IDS als bij paralleltesten in het Erasmus Medisch Centrum.

### Onderscheid coronavirussen

Om het inzicht in de epidemiologie van het nieuwe virus te vergroten zijn bij IDS specifieke serologische testen ontwikkeld, in samenwerking met de Universiteit Utrecht (UU), het Erasmus Medisch Centrum (EMC), het Amsterdam Medical Centre (AMC) en de Universiteit van Bonn (UB). Deze testen kunnen onderscheid maken tussen infecties met het nieuwe coronavirus en infecties met de algemeen voorkomende humane coronavirussen (1). Serologie is essentieel als aanvulling op PCR-based diagnostiek. Dit omdat de PCR-based diagnostiek sterk afhankelijk is van het afnametijdstip en het type monster dat is afgenomen (2). De ontwikkelde serologische test wordt sindsdien ingezet voor patiëntendiagnostiek en onderzoeksdoeleinden.

### Bronopsporing

In 2013 is in internationaal verband onderzoek verricht naar het dierreservoir voor humane infecties van MERS-CoV. In een samenwerkingsproject met UB, Naturalis Biodiversity Centre Leiden en het Schmalhausen Institute of Zoology, Kiev, is bewijs gevonden dat MERS-CoV

oorspronkelijk uit vleermuizen afkomstig is. Voorouders van het virus zijn gevonden in vleermuizen in Ghana en Europa (3). Met behulp van de ontwikkelde serologische test is gezocht naar mogelijke dierreservoirs voor directe overdracht van MERS-CoV naar de mens. In dromedarissen op de Canarische eilanden en in Oman zijn antilichamen aangetroffen, specifiek gericht tegen MERS-CoV (4). Deze bevindingen geven aan dat MERS-CoV of een zeer nauw verwant virus in dromedarissen circuleert. Het was de eerste aanwijzing voor een mogelijke rol van dromedarissen in de epidemiologie van MERS-CoV en dat kreeg veel aandacht van de internationale pers.

### Circulatie in dromedarissen

In samenwerking met de veterinaire faculteit in Irbid, Jordanië, het EMC en UB is een serologische studie uitgevoerd in dromedarissen, schapen, geiten en koeien in een gebied in Jordanië waar ook humane gevallen voorkwamen. Dit onderzoek bevestigde het vóórkomen van antistoffen in dromedarissen. Voor circulatie van MERS-CoV of een nauw verwant virus in andere landbouwhuisdieren die van belang zijn voor de regio, werden geen aanwijzingen gevonden (5). Het definitieve bewijs dat MERS-CoV circuleert in dromedarissen is voortgekomen uit een samenwerkingsverband met EMC en het ministerie van Volksgezondheid in Qatar. Het MERS-CoV is aangetroffen bij 3 dromedarissen op een boerderij in Qatar waar 2 humane gevallen geïdentificeerd zijn. Alle 14 dromedarissen waren bovendien serologisch positief (6). Deze studie heeft internationaal veel aandacht gekregen. Om vast te stellen dat de mens daadwerkelijk vanuit dromedarissen met MERS-CoV geïnfecteerd worden is echter nader onderzoek noodzakelijk. In 2014 wordt een uitgebreide epidemiologische studie uitgevoerd om de risicofactoren voor besmetting van de mens in kaart te brengen. Deze studie is een samenwerking met het EMC en de overheid van Qatar.

### Publicaties en referenties

- Reusken C, Mou H, Godeke GJ, van der Hoek L, Meyer B, Muller MA, et.al. "Specific Serology for Emerging Human Coronaviruses by Protein Microarray." *Euro Surveill* 18, no. 14 (2013): 20441.
- de Sousa R, Reusken C and Koopmans M. "MERS Coronavirus: Data Gaps for Laboratory Preparedness." *J Clin Virol* 59, no. 1 (2014): 4-11.
- Annan A, Baldwin HJ, Corman VM, Klose SM, Owusu M, Nkrumah EE, et.al. "Human Betacoronavirus 2c Emc/2012-Related Viruses in Bats, Ghana and Europe." *Emerg Infect Dis* 19, no. 3 (2013): 456-9.
- Reusken CB, Haagmans BL, Muller MA, Gutierrez C, Godeke GJ, Meyer B, et.al. "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Neutralising Serum Antibodies in Dromedary Camels: A Comparative Serological Study." *Lancet Infect Dis* 13, no. 10 (2013): 859-66.
- Reusken CB, Ababneh M, Raj VS, Meyer B, Eljarah A, Abutarbush S, et.al. "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (Mers-Cov) Serology in Major Livestock Species in an Affected Region in Jordan, June to September 2013." *Euro Surveill* 18, no. 50 (2013): 20662.
- Haagmans BL, Al Dhahiry SH, Reusken CB, Raj VS, Galiano M, Myers R, et.al. "Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Dromedary Camels: An Outbreak Investigation." *Lancet Infect Dis* 14, no. 2 (2014): 140-5.

## Gastro-enteritisvirus surveillance

**Auteur:** Annemarie van den Brandt.

**Betrokkenen:** Marion Koopmans, Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Bas van der Veer, Jeroen Cremer, Janko van Beek, Wilfrid van Pelt

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

MML's verrichten in de meeste gevallen zelf de diagnostiek van virale gastro-enteritis. Zij testen in ieder geval voor norovirus en rotavirus. De referentiediagnostiek voor de zeldzamere pathogenen wordt sinds enkele jaren verricht door Clb-IDS. Hiervoor wordt een multiplex-PCR gebruikt voor norovirus (inclusief zeldzame typen), sapovirus, adenovirus en astrovirus (gastro-enteritis virus (GEV) studie). Clb-IDS verricht ook de norovirustypering, bedoeld voor bronopsporing en onderzoek naar transmissie (norovirus studie). Een aantal MML's melden in de Virologische Weekstaten hoeveel monsters zij positief vinden voor norovirus en rotavirus.

### Referentiediagnostiek

In 2013 zijn 286 fecesmonsters ingestuurd voor de GEV referentiediagnostiek. In vergelijking met 2012 is dit een afname van 53%. In ongeveer 21% (60) van deze monsters zijn één of meerdere virussen gedetecteerd (3 dubbelinfecties). Van 226 aanvragen is geen oorzaak gevonden voor de infectie (Tabel 1). In 2012 was het percentage norovirus- en rotavirus-positieve monsters respectievelijk 10,8% en 5,8%. In 2013 zijn deze percentages afgenomen tot respectievelijk 5,5% en 3,8%. Net als in 2012 is de afname van het aantal ingestuurde monsters te verklaren doordat de MML's steeds meer zelf testen op norovirus en rotavirus.

Een groot aantal bepalingen in de GEV studie is negatief. Dit kan een aanleiding zijn om het te testen viruspanel aan te passen of uit te breiden met bijvoorbeeld Aichivirus en enterovirussen. Daarvoor moet echter eerst bekend zijn of gelijktijdig bacteriële of parasitaire bepalingen worden aangevraagd. Voor deze informatie wordt een aantal grotere inzenders benaderd.

### Typering

Typering van norovirus is voor 647 monsters aangevraagd in 2013. Met 3,4 % is dat een lichte toename ten opzichte van 2012. Het aantal norovirusmeldingen in de virologische weekstaten is voor beide jaren ongeveer gelijk gebleven (net onder de 3000 per jaar). Van de 647 monsters die zijn ingezonden voor norovirus, blijken er 492 positief in onze detectie-PCR's voor norovirus en rotavirus. Voor de positieve monsters werd de typering-PCR ingezet. Norovirustypering bestaat uit amplificatie van een 330 bp lang deel uit regio A (RNA dependent RNA polymerase). 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 de interessante norovirus GI.4-stammen de sequentie van regio C bepaald. Dit maakt het mogelijk om aminozuurveranderingen in het capsid te detecteren. Van de 492 norovirus positieve monsters verkregen we uiteindelijk van 220 monsters een goede sequentie. Het grote aantal uitvallers is deels te verklaren door een lage virale load en/of remming in de monsters.

**Tabel 1.** Overzicht detectie gastro-enteritis virussen in 2013

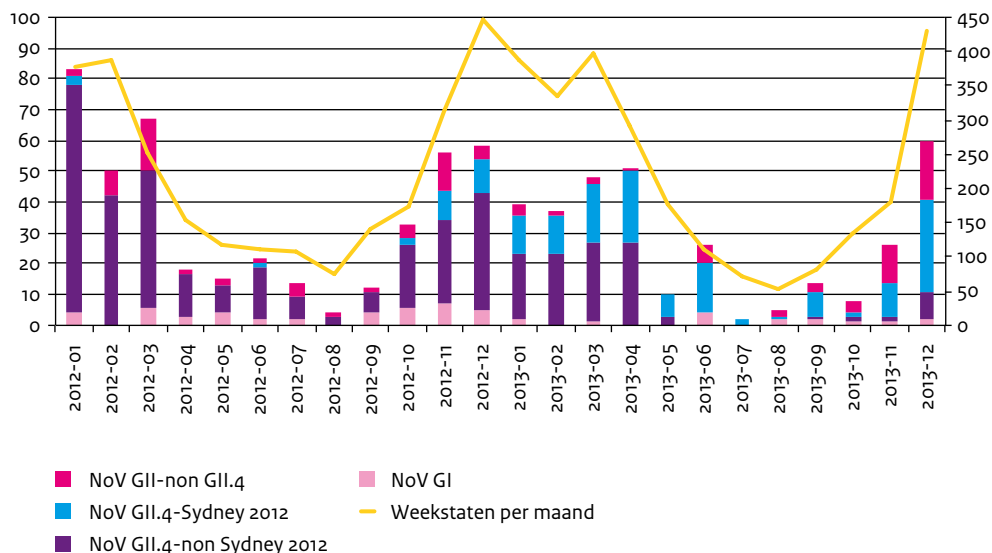
(abs = gevonden aantal; % is percentage van het aantal ingestuurde monsters).

	project GEV (n=286)		project NoroV (n=647)	
	abs	%	abs	%
Gedetecteerd virus				
Norovirus Genotype I	7	2.4	47	7.3
Norovirus Genotype II	9	3.1	410	63.4
Norovirus GII.4	8	2.8	346	53.5
Rotavirus	11	3.8	35	5.4
Sapovirus	10	3.5	niet getest	
Adenovirus	9	3.1	niet getest	
Astrovirus	6	2.1	niet getest	
Totaal virus	60	21	492	76
Geen	226	79	155	24

Een ander deel van de niet gelukte typeringen is te verklaren doordat de typering-PCR faalt. Als de PCR niet werkt is dat van belang voor de type-verdeling, want sequentieveranderingen in de primerbindingsplaatsen hangen vaak samen met bepaalde genotypes. Deze kunnen geheel gemist worden als primers niet meer aanhechten. In 2013 is gewerkt aan een nieuwe opzet voor de typering-PCR. Deze beslaat nu een groter gedeelte van het norovirusgenoom. In plaats van regio A wordt regio A t/m C geamplificeerd in een nested PCR. De primers zijn ontworpen volgens het CODEHOP-principe. Hierdoor is het risico veel kleiner geworden dat specifieke types met sequentieveranderingen in de primerbindingsplaatsen gemist worden. Op dit moment wordt deze methode gevalideerd en in 2014 wordt deze nieuwe opzet in gebruik genomen.

De typeerresultaten zijn weergegeven in figuur 1. Zoals verwacht is meer dan 80% van de gevallen een norovirus G II.4-stam. Binnen deze groep heeft wel een opmerkelijke verschuiving plaatsgevonden. In 2012 was GII.4-2010(67%) de meest gevonden variant. In 2013 is dit de nieuwe variant; GII.4-2012-Sydney(56%). Vooral in de tweede helft van het jaar kreeg deze de overhand. In figuur 1 is deze variant in groen weergegeven. De norovirus GII.4-2012-Sydney variant is al waargenomen in het najaar van 2012. Daarnaast zagen we eind 2012 een stijging in het aantal norovirusinfecties in verschillende landen in het wereldwijde NoroNet. Deze stijging van norovirusinfecties is in 2013 niet waargenomen in Nederland, zoals te zien is aan de weekstaten per maand in figuur 1.

**Figuur 1.** Staafdiagram waarin het aantal ingestuurde monsters per maand is weergegeven en de verdeling hiervan in Norovirus type GI, GII.4, GII-nonGII4 en de nieuwe GII.4 variant: GII.4-Sydney 2012.



We bedanken de NVMM en de rapporterende labs voor gegevens uit de virologische weekstaten.

### Publicaties en referenties

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* 141, no. 3 (2013): 496-506.



# Pandemische norovirussen: methode ontwikkeling voor blootstelling en immuniteit

**Auteur:** Janko van Beek

**Betrokkenen:** Harry Vennema, Marion Koopmans

**Contactpersoon:** Janko van Beek (Janko.van.Beek@rivm.nl)

Norovirus is wereldwijd de meest voorkomende virale verwekker van acute gastro-enteritis (AGE). Het genus *Norovirus* is genetisch zeer divers en is onderverdeeld in zes genogroepen, die weer verder zijn onderverdeeld in ongeveer veertig genotypes. De verschillende norovirus genotypen verschillen in virulentie en manier van transmissie. Het genotype GII.4 is op dit moment wereldwijd het meest voorkomende genotype; het veroorzaakt ongeveer 75% van de norovirusuitbraken. Sinds 2002 ontstaat iedere twee tot drie jaar een nieuwe variant van GII.4 door mutaties. Deze mutaties hebben effect op de antigeniciteit van het virus en binding van het virus aan de cel.

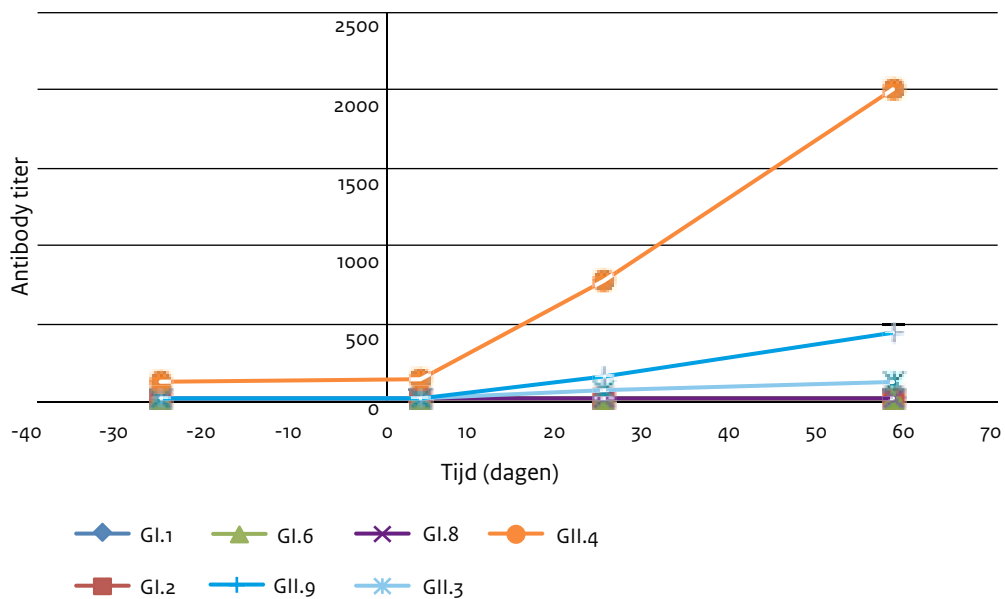
Norovirus is zeer besmettelijk. Introducties van nieuwe GII.4-varianten veroorzaken veel uitbraken in o.a. ziekenhuizen, verzorgingstehuizen, scholen en op cruiseschepen. Deze toename in uitbraken is in verband gebracht met een stijging in het aantal AGE-gerelateerde huisartsbezoeken, ziekenhuisbezoeken en verhoogde mortaliteit onder ouderen. De effecten van norovirus op de volksgezondheid lijken tot nu toe flink onderschat.

Het doel van dit onderzoeksproject is om de effecten te meten van zowel snelle virale evolutie als recombinatie op de impact van norovirusinfecties in de populatie. Er bestaat geen kweekmodel voor norovirus, dus neutralisatietesten kunnen niet ontwikkeld worden. Als alternatief zijn ELISA-tests ontwikkeld met recombinant geproduceerde antigenen. Deze tests tonen echter veel kruisreactie, waardoor interpretatie van de resultaten lastig is.

In dit project zijn methodes ontwikkeld om antistoffen te kunnen meten tegen meerdere norovirus genotypes tegelijk. Dit is gedaan met behulp van een eiwitarray-techniek. We kunnen hiermee incidenties vergelijken op populatie niveau, en de omvang kwantificeren van verspreiding van nieuwe pandemische varianten.

Afgelopen jaar is deze methode ontwikkeld en is de specificiteit en sensitiviteit van de test bepaald. Hiervoor is gebruik gemaakt van B-cell supernatanten met enkele epitoopecificiteit van een cohort klinische patiënten en van een cohort kinderen van <1-10 jaar oud. Figuur 1 geeft het serumantistoffenprofiel weer van een klinische patiënt met een PCR-bewezen norovirus GII.4-infectie. Deze patiënt laat zien dat het mogelijk is om met de eiwitarray-techniek genotypespecifiek te meten. Het homologe GII.4-antigeen laat tussen dag 0 en dag 60 na de eerste ziektedag een meer dan 4-voudige titerstijging zien, met relatief lage kruisreactie op de overige twee GII antigenen.

**Figuur 1.** Norovirus antistoffenprofiel van een patiënt geïnfecteerd met norovirus GI.4. t = 0 geeft de eerste ziektedag van de patiënt weer.



Komend jaar wordt de ontwikkelde serologische test gebruikt om de incidentie van norovirus in de Nederlandse bevolking te meten vóór en na de introductie van een nieuwe pandemische GI.4-variant. Daarnaast wordt de incidentie vergeleken van verschillende genotypes tussen een historisch en recent serum cohort.

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

**Auteur:** Kimberley Benschop.

**Betrokkenen:** Marion Koopmans, Harrie van der Avoort, Erwin Duizer.

**Contactpersoon:** Kimberley Benschop (kim.benschop@rivm.nl)

De ontwikkeling van antivirale middelen tegen enterovirussen (EV's) en humane rhinovirussen (HRV's) gaat vrij snel. Voor de behandeling van HRV-infecties en ernstige EV-infecties bij kinderen en immuun-gecomprimeerde patiënten was Pleconaril het eerste klinisch geëvalueerde EV-middel (fase III). Het middel wordt nu opnieuw geëvalueerd, dit keer voor de behandeling van neonatale sepsis en HRV-geïnduceerde complicaties bij patiënten met astma of COPD. Enkele andere middelen in ontwikkeling zijn BTA-798, AG7404 en V-073. Het RIVM is betrokken bij de klinische evaluatie van V-073 ten behoeve van de polioviruseradicatie.

De keerzijde van de snelle ontwikkeling van middelen tegen deze RNA virussen is dat antivirale resistentie ontwikkeling onontkoombaar is. Resistente virussen kunnen in hoge concentraties in het milieu terecht komen en onbehandelde mensenpopulatie infecteren. Dit gaat zeker een rol spelen bij grootschalig of ongecontroleerd gebruik (off-label of over-the-counter). De mens is dan niet te behandelen met de middelen die op dat moment beschikbaar zijn. Dit is een scenario dat maar al te bekend is in de antimicrobiële wereld en het is dus belangrijk om te onderzoeken in hoeverre antivirale resistentie een probleem wordt. Daarvoor moeten we eerst bepalen of er al natuurlijke resistentie is, en zo ja wat het niveau is van natuurlijke resistentie onder de EV-populatie (populatie resistentie).

Sinds kort zijn er publicaties die suggereren dat EV-replicatie ook geremd kan worden door middelen die al op de markt zijn. Dit zijn bijvoorbeeld fluoxetine/prozac (depressie), amantadine (Parkinson en voorheen influenza A-infecties), en ribavirine (RBV) (chronische HCV infecties). Deze middelen worden voornamelijk bij volwassen patiënten gebruikt, hoewel EV-geassocieerde ziekte bijna niet voorkomt bij volwassenen. Dat wil echter niet zeggen dat zij geen EV-infectie doorlopen. Vaak verloopt de infectie mild of asymptomatisch. Als genoemde middelen gebruikt worden door EV-patiënten met asymptomatische infecties, kunnen EV-resistente virussen geselecteerd worden en gaan circuleren. Deze medicijnen hebben dezelfde aangrijpingspunten als enkele EV-medicijnen in ontwikkeling. Daardoor kan deze ongecontroleerde resistentie negatieve gevolgen hebben voor de ontwikkeling en licentie van EV-specifieke middelen. Het is daarom belangrijk om te bepalen in hoeverre deze middelen al effect hebben gehad op resistentieontwikkeling.

Op het RIVM hebben we een fenotypische resistentieassay ontwikkeld om EV- en non-EV-middelen te testen. De assay is gebaseerd op de 50% remmende dosis (IC<sub>50</sub>). Op dit moment wordt een panel van endemisch circulerende EV-typen getest. Hierbij is gekeken naar de activiteit van het poliovirusmedicijn V-073, en de drie non-EV middelen op de markt waarvan

gesuggereerd wordt dat zij EV replicatie inhiberen: amantadine, fluoxetine en RBV. Daarnaast hebben we Guanidine HCL (GHCL) gebruikt als remmingscontrole, omdat het de replicatie van alle EV's kan remmen. De virussen worden op verschillende cellijnen getest, omdat de IC<sub>50</sub> per cellijn kan verschillen.

Op dit moment is een panel van 7 EV-B typen (Coxsackie virus (CV)A9, CVB3, CVB4, Echovirus 7, 9, 11 en 30) en 1 OPV1 stam getest op HT-29 cellen. Voor alle middelen geldt het volgende: Als replicatie optreedt binnen de gebruikte concentratierange, dan betekent dit dat de stam resistent is binnen de range. Dit sluit echter niet uit dat de stam te remmen is bij een hogere concentratie. Uit de voorlopige data blijkt dat replicatie van CBV3 en ECHO7 te remmen is met het poliovirusmedicijn V-073 (gemiddelde IC<sub>50</sub>, 0.2 en 0.14 µM respectievelijk). De EV-B typen CAV9, CBV4, ECHO9, en ECHO11 zijn niet te remmen in de gebruikte concentratierange (IC<sub>50</sub> >1 µM). Bij bijna alle geteste stammen was de replicatie te remmen met fluoxetine met een gemiddelde IC<sub>50</sub> van 15.49 µM (met uitzondering van één CAV9 stam en poliovirus, >25 µM). Dat poliovirus replicatie niet te remmen is met fluoxetine, is al eerder bewezen. Verder speelt mee dat de IC<sub>50</sub>-waarden in onze test veel hoger zijn dan wat gepubliceerd is en dit kan een effect zijn van de gebruikte cellijn. Andere cellijnen worden nu getest. RBV inhibitie blijkt ook stamspecifiek te zijn. In tegenstelling tot fluoxetine en RBV, bleek amantadine bij geen van de geteste stammen de replicatie te remmen (IC<sub>50</sub> >250 µM).

## Type-Ned virologie; Enterovirus en humaan parechovirus surveillance

**Auteur:** Kimberley Benschop.

**Betrokkenen:** Marion Koopmans, Harry Vennema, Annelies Kroneman, Harrie van der Avoort, Eric Claas (LUMC), Bert Niesters (UMG), Katja Wolthers (AMC), Martin Schutten (EMC), Rob Schuurman (UMCU), Suzan Pas (EMC), Janette Raham-Langendoen (UMG).

**Contactpersoon:** Kimberley Benschop (kimberley.benschop@rivm.nl)

Type-Ned is een initiatief van een aantal Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's) en het Clb-IDS. Moleculaire typeringsdata worden gerapporteerd in een database, samen met epidemiologische en klinische data. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de molecu-laair-platformsoftware, ontwikkeld binnen het RIVM. Binnen deze software zijn voorzieningen gemaakt voor toegangsbeheer, worden de moleculaire data automatisch getypeerd door typingtools, en zijn meerdere analyse- en visualisatie modules ontwikkeld. Met de gegevens van verschillende laboratoria kunnen zowel vraagstellingen op ziekenhuis- of patiëntniveau, als (inter)nationale vraagstellingen beter beantwoord worden. Er is een virologisch en een bacteriologisch Type-Ned netwerk

Type-Ned virologie bestaat uit 6 MML's (Academisch Medisch Centrum (AMC), Erasmus Medisch Centrum (EMC), Universitair Medisch centrum Groningen (UMCG), Leiden Universitair Medisch Centrum (LUMC), Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU), GGD Amsterdam) en het RIVM. De data van AMC, EMC, UMCG, en LUMC, en het RIVM zijn gerapporteerd over de jaren 2010-2012.

In totaal zijn er 1029 entries over 2010-2012. In deze periode is EV-B ieder jaar het meest voorkomende enterovirus (2010: 48%; 2011: 64%; 2012: 69%), gevolgd door EV-A virussen en parechovirussen (PEV) (Tabel 1).

**Tabel 1.** Aantal entries in Type-Ned virologie 2010-2012.

	2010	2011	2012*
EV-A	86	73	50
EV-B	193	271	148
EV-C	3	2	2
EV-D	26	1	4
PEV	88	66	11
Rhinovirus	1	4	-
Totaal	397	417	215

\* Geen AMC data.

**Tabel 2.** Top 5 meest voorkomende typen.

	2010	2011	2012*
1	CV-A9	ECHO25	ECHO18
2	EV-A71, C2	ECHO7	CV-A6
3	ECHO30	CV-B3	ECHO9
4	EV-D68	CV-B4	ECHO11
5	CV-A4	ECHO9	CV-B2

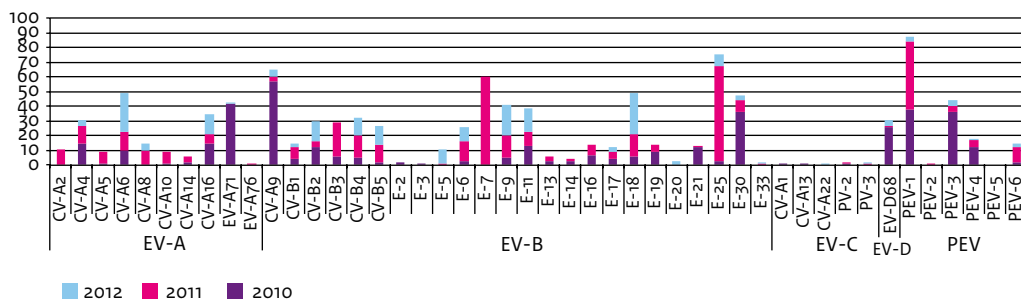
De meest voorkomende typen varieerden elk jaar; in 2010, 2011 en 2012 zijn dat respectievelijk CV-A9, ECHO25 en ECHO18 geweest (Tabel 2, Figuur 1). Over de totale periode van 2010-2012 was PEV1 het meest voorkomende type (Figuur 1). PEV1 infecties werden ieder jaar gerapporteerd, terwijl het aantal PEV3 infecties veel minder was in 2011 en 2012. De lage aantallen van PEV3 in 2011 komen overeen met het circulatie patroon dat PEV3 in Nederland heeft. PEV3-infecties worden vooral in de even jaren gerapporteerd. Het lage aantal in 2012 is te verklaren doordat de AMC-data van 2012 nog niet gerapporteerd zijn. In 2010 werd de helft van de PEV3-stammen gerapporteerd door het AMC.

Helaas zijn de klinische data die gerapporteerd worden in Type-Ned virologie nog beperkt (~30%). Desondanks is het mogelijk de bekende klinische associaties te extraheren. Meningitis is bijvoorbeeld vaak gevonden bij patiënten met een EV-B/PEV3-infectie, en Hand-Voet-en-Mond ziekte bij patiënten met een EV-A-infectie.

Met behulp van de sequentiedata kunnen we gericht kijken naar de circulatie van bepaalde type-stammen in een bepaalde periode. 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.

Meer informatie over Type-Ned kunt u vinden op de website [www.rivm.nl/TypeNed](http://www.rivm.nl/TypeNed). Laboratoria die belangstelling hebben voor deelname aan Type-Ned virologie, kunnen contact opnemen via [noronet@rivm.nl](mailto:noronet@rivm.nl)

**Figuur 1.** EV en PEV typen in Type-Ned virologie over 2010-2012.



## Poliovirus exclusie en Enterovirus surveillance in 2013

**Auteur:** Edin Jusic

**Betrokkenen:** Erwin Duizer, Kim Benschop, Bas van der Veer, Jeroen Cremer, Annemarie van de Brandt, Harry Vennema, Marion Koopmans.

**Contactpersoon:** Harrie van der Avoort (harrie.van.der.avoort@rivm.nl)

In Nederland wordt enterovirus (EV)-surveillance uitgevoerd om circulatie van poliovirus uit te sluiten. De EV-surveillance is een samenwerkingsverband tussen het Clb-IDS en 22 virologische laboratoria, vertegenwoordigd in de Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie (NWKV). Poliovirus wordt uitgesloten als het virus niet te kweken is op L2oB cellen (Muizen L-cellen met poliovirusreceptor, specifiek voor groei van poliovirus). Daarnaast wordt een EV-specifieke seminested PCR-test (EV-snPCR) uitgevoerd, gevolgd door typering. Voor de typering wordt een deel van het VP1 capsid eiwitgen gesequencet en geanalyseerd.

Op basis van de gevonden sequentie en met behulp van het programma BioNumerics, wordt in de EV-Genotypingtool (<http://www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool#/>) het genotype bepaald. In 2013 zijn er in Nederland 295 aanvragen binnen gekomen voor de uitsluiting van poliovirus en/of typering van EV. Dat is een afname van 56.8% ten opzichte van 2012 (519 aanvragen. Figuur 1). Het meest ingestuurde materiaal is feces (62.7%, 185 aanvragen. Figuur 1).

In totaal zijn 295 monsters ingezonden en hiervan zijn 237 monsters (80.0 %) positief voor EV. Van deze positieve monsters zijn weer 228 (77.8%) monsters getypeerd. Monsters waarbij het ingezonden materiaal geen groei vertoont op L2oB cellen, maar wel positief reageert in de EV-specifieke PCR zijn niet typeerbaar. Deze monsters zijn naar de inzender gerapporteerd als NPEV (Non Polio Enterovirus).

Van het totaal aantal ingezonden monsters zijn er 58 (20%) negatief bevonden voor EV. In deze negatieve monsters is in 6 gevallen Rhinovirus aangetoond en 1 geval Human Parecho virus (HPEV). De resterende 51 monsters zijn als negatief gerapporteerd naar de inzender (Tabel 1).

Uit de typeringsdata blijkt dat in 2013 voornamelijk Coxsackievirus A9 (13%), Coxsackievirus B3 (13%) en Echovirus 30 (12.5%) circuleerden. De meest voorkomende EV in 2012 waren Echovirus 11 (18.5%), Echovirus 5 (14%) en Echovirus 9 (11.6%, Figuur 2).

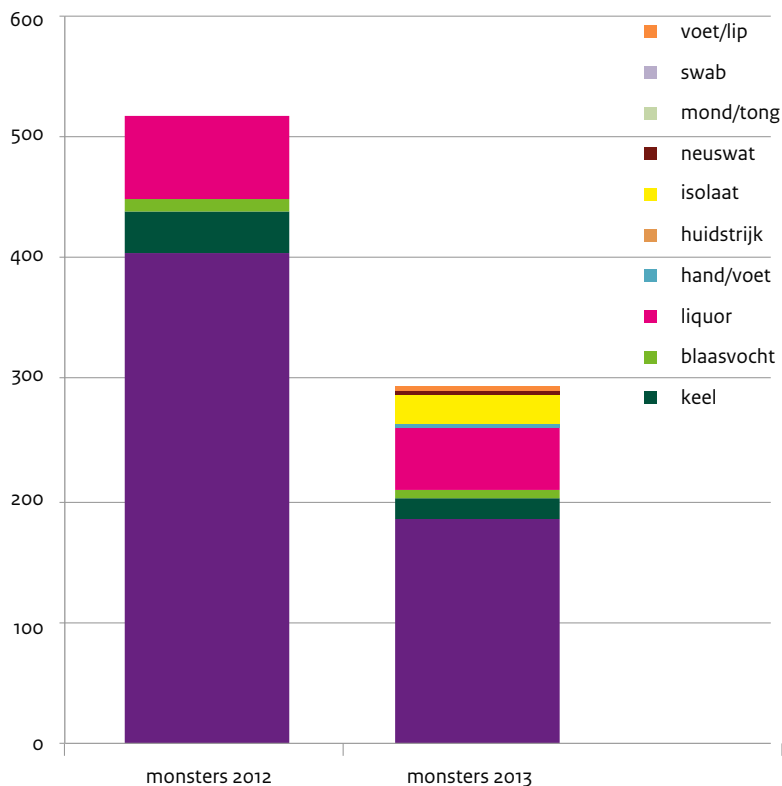
EV-groep B (HEV-B) is in 2013 het meest aangetroffen in de EV typering-PCR (Figuur 2).

Van 225 getypeerde monsters zijn 173 monsters (77%) positief bevonden voor HEV-B groep en 52 monsters (23%) positief voor HEV-A groep. Ook in 2011 en in 2012 is de HEV-B groep het meest aangetroffen in de EV-surveillance.

**Tabel 1.** Resultaten van uitsluiting poliovirus infectie en enterovirus typering in 2013.

EVsnPCR	Negatief	NPEV	Rhinovirus	HPEV	Poliovirus	Enterovirus	Totaal
aantal samples	51	9	6	1	0	228	295

**Figuur 1.** Aanvragen (monsters) voor uitsluiting van poliovirus infectie en enterovirus typering in 2012 en 2013

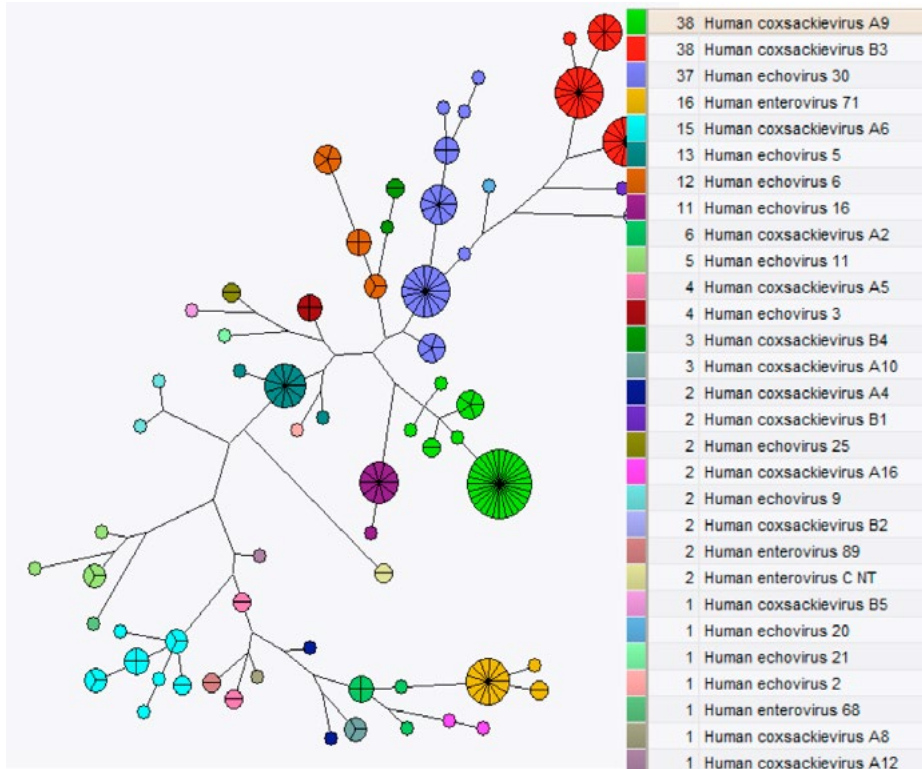


In 2013 is in de EV-surveillance geen poliovirus gevonden. Eén virus was positief voor EV-68 (HEV-D, Figuur 2). Verder zijn er twee monsters gevonden die in de HEV-C groep vallen. Deze twee monsters zijn afkomstig van dezelfde patiënt. De virussen zijn dan ook identiek in het gekarakteriseerde VP1 capside eiwit (Figuur 2), maar vertonen minder dan 85% overeenkomst met prototype stammen in de EV-database. Dit geeft aan dat het om een nieuw type EV gaat. We zijn nog bezig het virus verder te karakteriseren.

Naast de EV-surveillance wordt het programma om poliovirus uit te sluiten aangevuld met rioolwatersurveillance. Hiervoor wordt rioolwater verzameld van 13 locaties (scholen en dorpen) in de zogenaamde bijbelgordel. Rioolwatersurveillance in Israël heeft aangetoond dat dit een heel gevoelige en efficiënte aanpak is om polioviruscirculatie te detecteren in een IPV-gevaccineerde populatie. In Israël is in 2013 een uitbraak vastgesteld van wild polio type 1. Daarnaast is eind oktober 2013 een uitbraak van wildtype polio 1 vastgesteld in het noordoosten van Syrië. De eerste bevestiging hiervan is in ons laboratorium (Global Specialized WHO polio laboratory) vastgesteld met behulp van sequencen. Maandelijks komt een groot aantal



**Figuur 2.** Maximum parsimony tree van in 2013 getypeerde EV in Nederland.



vluchtelingen, inclusief kinderen, in Nederland aan. Daardoor wordt de kans op import van wild poliovirus als verhoogd geschat. Daarom worden sinds november 2013 ook op het terrein van het Centraal Orgaan opvang Asielzoekers (COA) Ter Apel rioolmonsters verzameld voor analyse van poliovirus.

In 2013 zijn voor de rioolwatersurveillance 96 monsters verzameld uit de bijbelgordel en 16 uit Ter Apel. In geen van de monsters is poliovirus gevonden. In totaal zijn 47 monsters (42%) positief bevonden voor één of meerdere enterovirussen, 59 monsters (53%) zijn negatief voor EV en 6 monsters (5%) zijn positief in celkweek op Ht-29 en Rd cellen, maar negatief op L20B cellen (Non-Polio enterovirus, NPEV). Opmerkelijk is dat in Ter Apel het EV-type 76 (1 monster) en Coxsackie A13 (5 monsters) zijn gevonden. EV-type 76 is nog nooit eerder gevonden in de EV-surveillance in Nederland. Coxsackie A13 is tot nu toe maar twee keer eerder gevonden; in 2008 en in 2010. Deze twee monsters tonen echter een verschil van liefst 25% ten opzichte van de Coxsackie A13 virussen die zijn gevonden in Ter Apel.

## Genotypering Rotavirus

**Auteur:** Bas van der Veer

**Betrokkenen:** Marion Koopmans, Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Annemarie van den Brandt, Jeroen Cremer, Wilfrid van Pelt (EPI)

**Contactpersoon:** Harry Vennema (Harry.Vennema@rivm.nl)

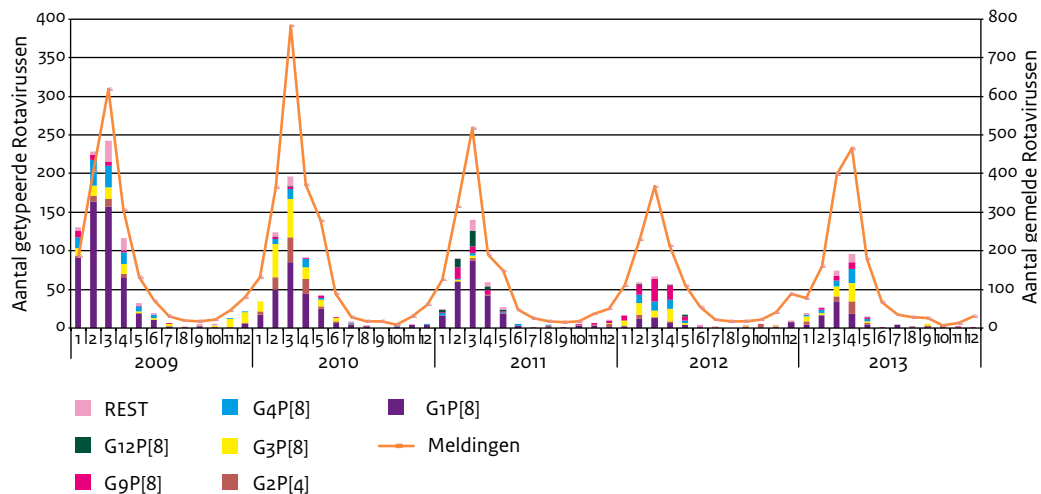
Het Nederlandse rotavirus kiemsurveillance-project is opgestart in juni 2008. Binnen dit project is het voor ziekenhuizen en andere microbiologische laboratoria mogelijk om rotavirus-positieve fecesmonsters op te sturen naar het RIVM voor typering. De rotavirussen worden getypeerd met behulp van de in-house Reverse Line Blot (RLB) methode en/of sequentie-bepaling. De resultaten die we uit dit project verkrijgen, worden gecombineerd met de data van 14 andere landen in de Europese rotavirus surveillance (EuroRotanet). Deze data worden onder andere gebruikt om de vaccine coverage van de gebruikte vaccins te monitoren. De inzender kan desgewenst de typeringsuitslag ontvangen, hieraan zijn voor de inzender geen kosten verbonden.

Sinds 2006 zijn er twee rotavirus vaccins beschikbaar; Rotarix en RotaTeq. Vaccinatie tegen rotavirus is in Nederland niet opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma, in tegenstelling tot diverse andere Europese landen. In omliggende landen zoals België en Duitsland wordt wel gevaccineerd, en België heeft inmiddels een dekkingsgraad van >90%. Het is interessant om te zien of dit effect heeft op de prevalentie van Rotavirus in Nederland en daarnaast op de verspreiding van genotypes door eventuele vaccindruk.

In 2013 hebben wij 299 fecesmonsters ontvangen die bij de inzender positief waren voor rotavirus. Inzenders gebruikten hiervoor de ELISA, snelst of moleculaire diagnostiek. Hiervan zijn er 280 (94%) getypeerd voor G en/of P (twee oppervlakte-eiwitten van rotavirus). In 30 (11%) fecesmonsters zijn dubbelinfecties met rotavirus aangetroffen. Vanaf het begin van de studie tot en met 2011 is het genotype G1P[8] dominant, en daar omheen circuleren andere genotypen (Figuur 1). Vanaf 2012 kregen deze co-circulerende genotypen steeds meer de overhand, waardoor in 2012 zelfs G1P[8] niet meer het meest voorkomende genotype was. In 2013 blijkt G1P[8] opnieuw het meest voorkomende genotype, maar blijft de variatie aan genotypen in stand. Daarnaast is het aantal meervoudige infecties de afgelopen jaren steeds verder toegenomen (Tabel 1), waarschijnlijk door deze diversiteit aan circulerende genotypen.

Door vaccindruk van onder andere Rotarix (G1P[8]) in België, is het mogelijk dat vooral andere G/P-genotypen opkomen en dat er afwijkende varianten van G1P[8] ontstaan. In deze Nederlandse studie zijn de laatste jaren inderdaad grotere fluctuaties waargenomen in voorkomende genotypen. Terwijl het aantal deelnemende laboratoria in Nederland niet is afgenomen, is het aantal Rotavirus gastro-enteritisgevallen wel sterk verminderd. In het aantal ingezonden monsters is het aantal G1P[8]-genotypen sterk verlaagd (Tabel 1). Deze waarnemingen suggereren dat we wel degelijk wat effect meten van vaccindruk in België. Aan de andere kant is de relatieve toename van G2P[4] niet geconstateerd, hoewel deze wel werd verwacht.

**Figuur 1.** Getypeerde en gemelde rotavirus monsters naar afnamedatum voor de periode 2009-2013.



**Tabel 1.** Aantal gemelde, ingestuurde en getypeerde Rotavirussen voor de periode 2009-2013. Daarbij het aantal mixed en G1P[8] infecties, gevonden binnen alle getypeerde samples.

RV	A		B		C		Mixed infecties		G1P[8] infecties	
	Aantal gemeld	Aantal Ingestuurd		Aantal Getypeerd		abs.	% t.o.v. C	abs.	% t.o.v. C	
		abs.	% t.o.v. A	abs.	% t.o.v. B					
2009	1935	869	44.9	830	95.5	10	1.2	519	62.5	
2010	2180	578	26.5	547	94.6	18	3.3	242	44.2	
2011	1504	414	27.5	400	96.6	25	6.3	235	58.8	
2012	1287	276	21.4	265	96.0	20	7.5	47	17.7	
2013	1487	299	20.1	280	93.6	30	10.7	83	29.6	

Sinds 2009 zien we in het aantal voor typering ontvangen monsters een gestage terugloop (Tabel 1). Voor een betrouwbare weergave van de type-specifieke prevalenties moeten naar schatting 400 monsters getypeerd worden voor Nederland. Om dit aantal te halen vragen wij ook in 2014 weer om rotavirus positieve monsters in te sturen vanuit ziekenhuizen en medisch microbiologische laboratoria. Omdat het niet is bedoeld voor diagnostiek maar voor surveillance, kunnen zij monsters opsparen en per batch versturen.

### **Publicaties en referenties**

Duizer E, van der Veer B, de Bruin E, Zeller M, Heylen E, van Ranst M, et.al. "Evaluation of a Reverse Line Blot Assay for Genotyping Common Human Rotaviruses." *J Virol Methods* 193, no. 2 (2013): 597-602.

Zeller M, Rahman M, Heylen E, De Coster S, De Vos S, Arijs I, et.al. "Rotavirus Incidence and Genotype Distribution before and after National Rotavirus Vaccine Introduction in Belgium." *Vaccine* 28, no. 47 (2010): 7507-13.

## Genotypering hepatitis A virus

**Auteur:** Jeroen Cremer

**Betrokkenen:** Marion Koopmans, Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Linda Verhoef, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt, Barbara Schimmer (EPI), Wilfrid van Pelt (EPI)

**Contactpersoon:** Harry Vennema (Harry.Vennema@rivm.nl)

Deze hepatitis A kiemsurveillance is een samenwerking van het Clb-IDS en de GGD'en. Doel is om het hepatitis A bestrijdingsbeleid van de GGD te ondersteunen door genotypering van Hepatitis A virus (HAV). Daarvoor worden virussen van nieuw gediagnosticeerde hepatitis A patiënten getypeerd, zowel in Nederland als in een aantal andere landen in Europa. Hierdoor verkrijgen we inzicht in de verspreiding van HAV in Europa. De bestrijding bestaat uit twee delen:

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

De bestrijding die verspreiding in een uitbraaksituatie beperkt, kunnen we ondersteunen door moleculaire diagnostiek. Kinderen hebben vaak geen symptomen. Daardoor bestaat de kans op ongemerkte verspreiding als er veel kinderen betrokken zijn bij een uitbraak. Met behulp van PCR op bijvoorbeeld feces van asymptomatische personen, kunnen we in die situaties dragerschap aantonen en wordt ook ongemerkte verspreiding in kaart gebracht.

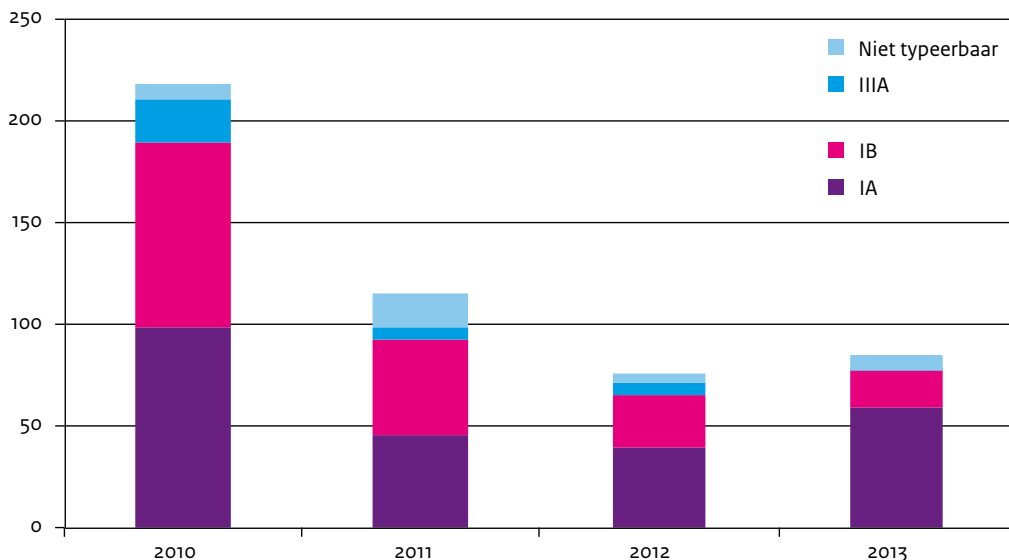
In 2013 heeft Clb-IDS van 46 laboratoria en ziekenhuizen 166 monsters ontvangen voor typering (1 aardbei, 19 feces en 146 serum). Dat is meer dan in 2012 (147 monsters). Van 6 OSIRIS-meldingen is geen serum of feces ontvangen. Het aantal ingezonden monsters is hoger dan het aantal OSIRIS-meldingen, omdat ook sera met dubieuze serologische uitslagen geconfirmeerd worden. Er is een lichte daling van het aantal OSIRIS-meldingen ten opzichte van 2011 en 2012. Van 92 van de 166 (55%) monsters is de detectie-PCR positief. Hiervan zijn 85 (92%) monsters getypeerd op basis van een sequentie van 460 nucleotiden in de VP1/2A regio van het virus. Voor de 7 andere monsters (8%) was typering niet mogelijk vanwege te lage virale loads (d.w.z.  $C_p > 34$  cycli).

Er zijn 44 verschillende sequenties gevonden in 2013, waarvan er 15 voorkomen in clusters van 2 tot 14 patiënten (Figuur 2). Bepaalde clusters komen in beide jaren voor, wat zichtbaar is door twee kleuren in één bol. Er zijn ook clusters die alleen in 2012 of 2013 voorkomen. Door de sequenties te vergelijken met achtergrondsequenties in de database, zijn de gevonden

**Tabel 1.** overzichtstabel van OSIRIS meldingen en ingezonden monsters van 2010-2013.

	2010	2011	2012	2013
Meldingen Osiris	262	123	121	105
Ingezonden monsters	336	295	147	166

**Figuur 1.** Weergave van de verschillende genotypen en aantallen van 2010 tot 2013



sequenties voor een groot deel te clusteren in een regio, land van herkomst of een risicogroep. De database bestaat uit gepubliceerde sequenties uit GenBank en sequenties die gedeeld worden door meerdere laboratoria in Europa. Deze sequenties worden gebruikt om een typingtool te ontwikkelen.

### Toelichting van enkele grotere clusters uit 2013

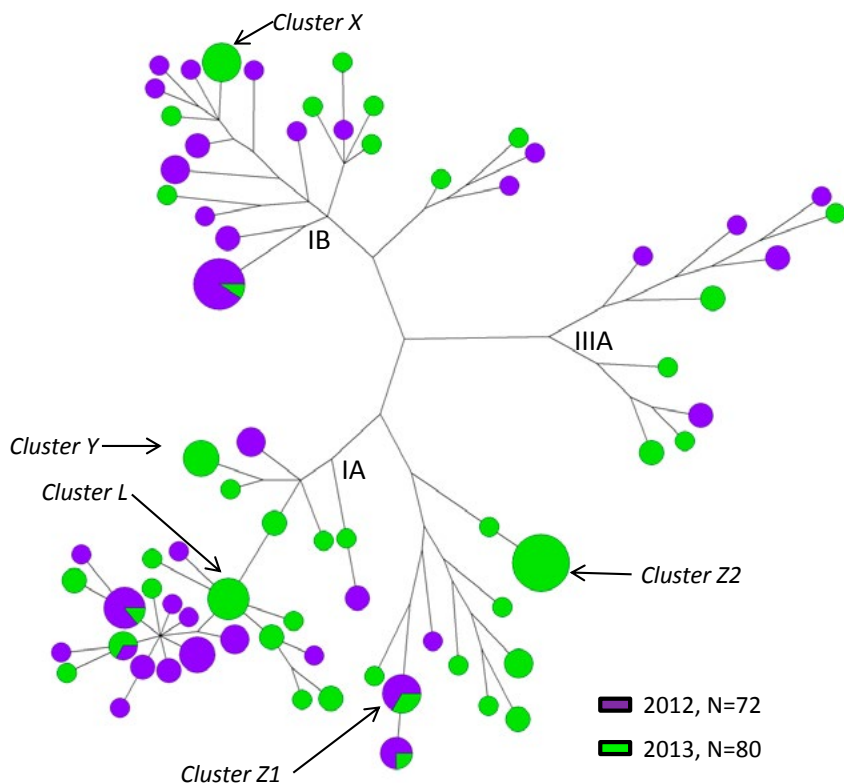
*Voedsel gerelateerd:*

**Cluster X:** Van november 2012 tot 24 april 2013 zijn er 80 Hepatitis A casussen gevonden van vakantiegangers met symptomen na een reis naar Egypte. Vijf vakantiegangers waren afkomstig uit Noorwegen, vijf uit Engeland en zes uit Nederland. De geïsoleerde virussen hebben een identieke HAV-IB sequentie. Negen andere landen geven aan dat zij minimaal 1 casus hebben die mogelijk gelinkt is aan deze uitbraak. Reizigers die naar Egypte afreizen wordt geadviseerd zich te laten vaccineren. Ondanks dit advies blijkt dat slechts een enkele reiziger gevaccineerd is. Van de HAV gevallen in cluster X was niemand gevaccineerd. Veel reizen worden via internet verkocht; mogelijk kunnen reisorganisaties hun klanten nog beter informeren over de juiste vaccinaties (4).

**Cluster Y:** In een Haags restaurant zijn vier ziektegevallen gemeld die door eten van besmet voedsel geïnfecteerd zijn geraakt.

**Clusters Z1 en Z2:** Deze twee clusters zijn mogelijk gerelateerd aan geconsumeerd voedsel uit de winkel, (mosselen en fruit) en beide sequenties worden ook gevonden in andere Europese landen. Sequentie Z1 is ook gevonden in 2012 (Figuur 2).

**Figuur 2.** Hepatitis A: Basic maximum parsimony tree van het VP1/2A gebied (460nt) van Hepatitis A virussen van casussen uit 2012 en 2013. De kleinste bolletjes staan voor 1 unieke sequentie. Hoe groter de bollen, hoe meer identieke sequenties.



*Familie gerelateerd:*

**Cluster L:** De afgelopen vier jaar is een cluster gevonden met 15 gevallen (2013=8, 2011=2 en 2010=5). De oorsprong van de sequentie ligt in Marokko, waarbij familiebezoek hoogst waarschijnlijk de bron van besmetting is.

Hepatitis A typering kan inzicht geven in de bronnen van HAV-infecties. Het aantal inzendingen is iets gestegen ten opzichte van 2012. De OSIRIS meldingen zijn iets gedaald in 2013. Het verschil is te verklaren door screenings rond enkele Hepatitis A clusters waar veel negatieve monsters zijn gevonden. Er zijn meer type IA gevonden en iets minder type IB. Type IIIA is gelijk gebleven ten opzichte van 2012. Ook dit jaar is een redelijk percentage geïmporteerd uit endemische landen. En een redelijk percentage is voedselgerelateerd. Vaccinatievoorlichting voor reizigers via de website van reisorganisaties zou verbeterd kunnen worden.

### Publicaties en referenties

Nordic Outbreak Investigation Team. "Joint Analysis by the Nordic Countries of a Hepatitis a Outbreak, October 2012 to June 2013: Frozen Strawberries Suspected." Euro Surveill 18, no. 27 (2013).

MacDonald E, Steens A, Stene-Johansen K, Gillesberg Lassen S, Midgley S, Lawrence J, et.al. "Increase in Hepatitis a in Tourists from Denmark, England, Germany, the Netherlands, Norway and Sweden Returning from Egypt, November 2012 to March 2013." Euro Surveill 18, no. 17 (2013): 20468.



## Genotypering hepatitis B virussen

**Auteur:** Jeroen Cremer

**Betrokkenen:** Audrey King, Marion Koopmans, Susan Hahné, Femke Koedijk, Françoise van Heiningen en Loes Soetens.

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

Genotypering van hepatitis B-virus wordt uitgevoerd om meer kennis te krijgen over de diversiteit van de hepatitis B viruspopulatie in Nederland. Met deze kennis ondersteunen we de bestrijding. Kennis van genotypen is relevant bij: 1.) bron- en contactopsporing, 2.) effectiviteitsbepaling van de huidige vaccinatiecampagnes, 3.) de monitoring van het ontstaan van eventuele immuun-escape mutanten.

In 2013 zijn 140 meldingen van een acute hepatitis B-infectie binnengekomen, wat iets minder is dan in 2012 (167 meldingen). Ten opzichte van 2012 zien we in 2013 een lichte daling in het aantal meldingen van hepatitis B onder mannen die seks hebben met mannen (MSM) (Figuur 1). Ook het aantal meldingen met andere vermeende transmissieroutes laten een daling zien in 2013. Uitzondering hierop is de categorie 'overig' (Figuur 1). Vanaf 2004 is een duidelijke afname van acute Hepatitis B te zien in Nederland.

Hepatitis B-genotypering wordt uitgevoerd op serummonsters door de S-regio (656nt) en C-regio (655nt) van het hepatitis B-virusgenoom te sequencen. In 2013 zijn geen opvallende verschuivingen gezien in de verdeling van de verschillende genotypen. Tabel 1 toont over de verschillende jaren het aantal ingezonden hepatitis B-sera voor acute Hepatitis B en chronische Hepatitis B in de MSN risicogroep.

Genotype A (Figuur 2) is wederom het grootste cluster (n=27). Hoewel dit cluster in het verleden is geassocieerd met transmissie via homoseksuele contacten, zijn in de afgelopen jaren ook vaak hepatitis B-virussen in dit cluster aangetroffen die via heteroseksuele contacten zijn overgedragen. De twee grootste groepen in het genotype A-cluster in 2013 zijn: transmissie via homoseksuele contacten (n=8) en 'transmissieroute onbekend' (n=7). Er is ook transmissie aangetroffen via heteroseksuele mannen (n=3) en biseksuelen (n=5).

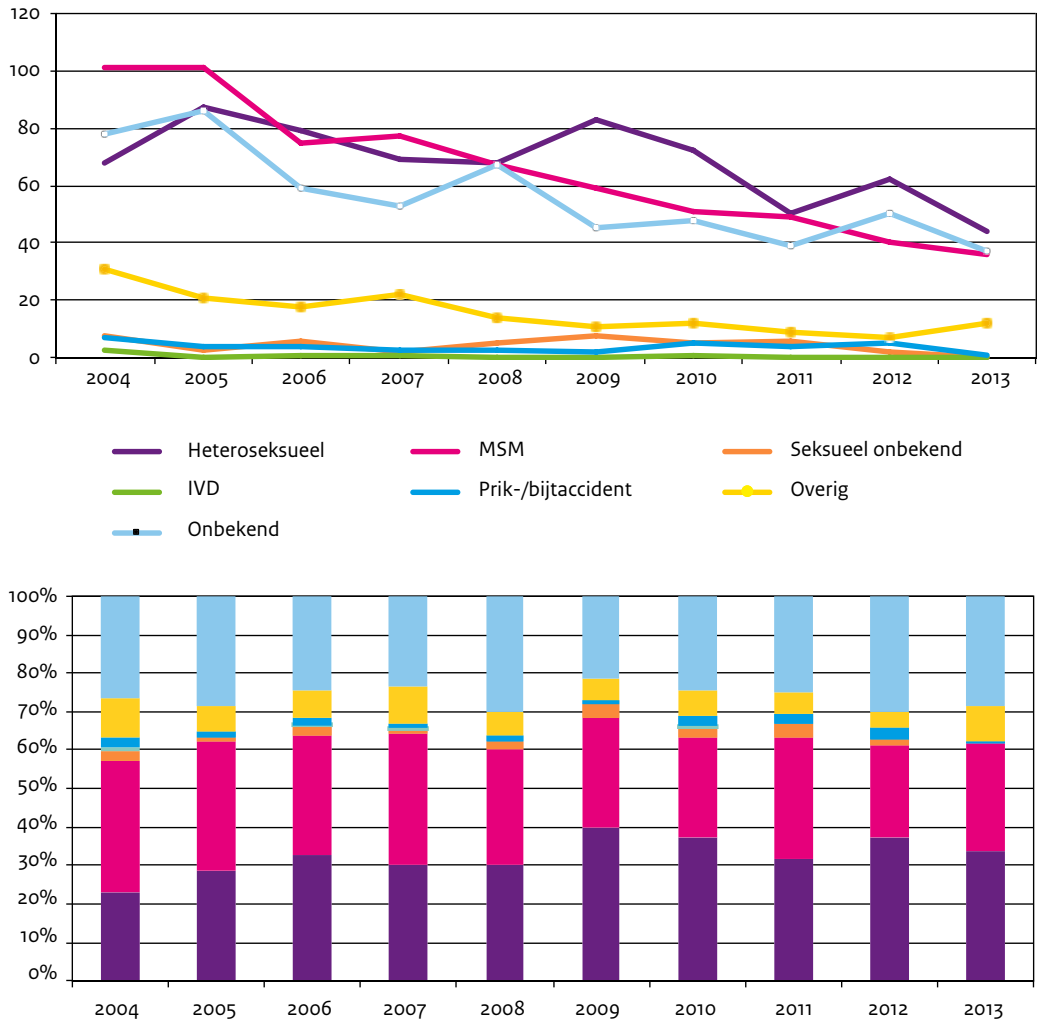
**Tabel 1.** Aantal ingezonden hepatitis B positieve sera

	2013	2012	2011	2010	2009	2008
Acuut	73	85	93	85	122	136
Chronisch	14	6	6	18	nvt	nvt

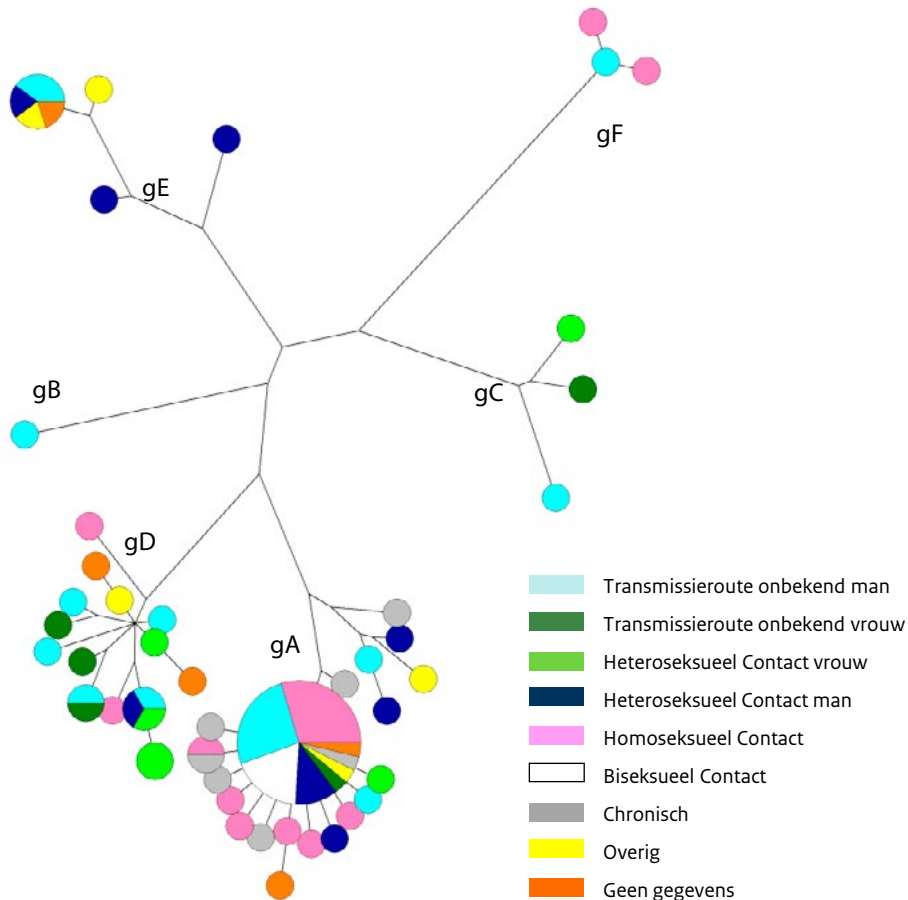
**Figuur 1.** Twee grafiekweergaven van de verdeling over de verschillende transmissie routes van Hepatitis B.

Boven: het absolute aantal hepatitis B-meldingen per jaar

Onder: de relatieve bijdrage van transmissieroutes.



**Figuur 2.** Basic maximum parsimony tree van hepatitis B virus sequenties uit acute HBV (n=73) en chronische HBV (n=7) gevallen uit Nederland. Deze zijn onderverdeeld naar waarschijnlijke transmissieroute en gebaseerd op de sequentie van de S-regio.



Naast acute HBV-isolaten, zijn ook isolaten van chronische HBV-patiënten getypeerd. Deze patiënten behoren tot een bepaalde risicogroep en komen in aanmerking voor gratis HBV-vaccinatie. Dit jaar zijn zes isolaten van chronische HBV-patiënten volledig getypeerd. Van deze stammen zijn er vijf uniek en twee stammen clusteren met één of meer andere stammen. Deze stammen zijn in figuur 2 weergegeven in het grijs.

### Publicaties en referenties

Hahne S, van Houdt R, Koedijk F, van Ballegooijen M, Cremer J, Bruisten S, Coutinho R and Boot H. "Selective Hepatitis B Virus Vaccination Has Reduced Hepatitis B Virus Transmission in the Netherlands." PLoS One 8, no. 7 (2013): e67866.

## Geografische tracing van hepatitis A virus door middel van moleculaire analyse

**Auteur:** Rita de Sousa

**Betrokkenen:** Harry Vennema, Jeroen Cremer, Bas van der Veer, Annemarie van den Brandt, Linda Verhoef, Erwin Duizer, Annelies Kroneman, Mariska Pertignani, Marion Koopmans

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

Hepatitis A is een acute leverziekte, veroorzaakt door het hepatitis A-virus (HAV). Dit is een picornavirus dat zich verspreidt via de oraal-fecale route. De drie genotypen I, II en III zijn onderverdeeld in A en B subtypen die geassocieerd zijn met verschillende geografische locaties. Het virus is niet endemisch in Nederland, de hepatitis A-gevallen worden vastgesteld bij reizigers die naar endemische gebieden zijn gereisd. Soms is de infectie echter gerelateerd aan consumptie van voedsel, geïmporteerd uit endemische gebieden. Het Clb-IDS coördineert een wereldwijd laboratorium netwerk (HAVNET) waarin sequenties en achtergronddata van HAV-gevallen worden gedeeld in een database. Deze database kan gebruikt worden om de bron van voedselgerelateerde clusters en uitbraken op te sporen. We hebben onderzocht hoe bruikbaar de HAVNET-database is voor de vroege detectie van diffuse, internationale uitbraken die voedselgerelateerd zijn.

De HAVNET-database bevat sequenties van laboratoria die gebruik maken van de HAVNET-database (N=1634) en sequenties die beschikbaar zijn in Genbank (N=5486). Deze zijn afkomstig van HAV-gevallen uit de periode 1957-2013. Alleen HAV-sequenties waarvan aanvullende informatie beschikbaar is, zijn gebruikt in de analyses. Dit betreft de mogelijke transmissieroute (bijvoorbeeld reis-gerelateerd of via voedsel), de lengte van de sequentie en de ligging ervan op het HAV-genoom en geografische informatie. Hierbij blijkt dat genotype IA het meest voorkomt (60%), gevolgd door genotype IB (19,5%) dat het meest voorkomt in Afrika en het Midden Oosten. Genotype IIIA komt het meest voor in Azië (India, Afghanistan). Voor 16% van de sequenties is de informatie over de transmissieroute bekend (Tabel 1). De reisinformatie geeft aan dat de hogere aantallen van sequenties afkomstig zijn uit hoog tot gemiddeld-hoog endemische landen. Genotype IB beslaat 55% van de sequenties, en is vooral gevonden bij reizigers naar Noord Afrika en Turkije (Figuur 1).

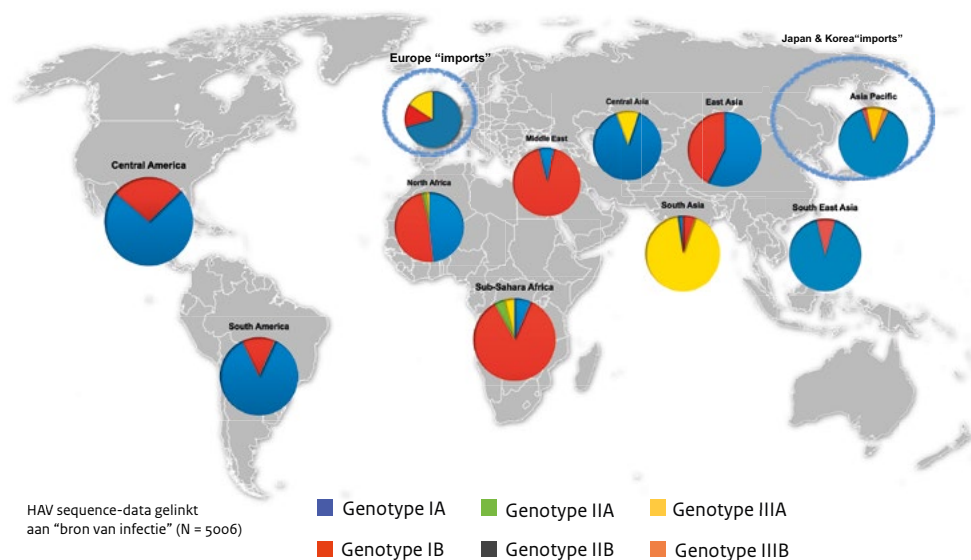
Verdere onderverdeling van de sequenties binnen een genotype in genetisch verwante clusters laat zien dat bepaalde clusters te linken zijn aan bepaalde landen. Deze data worden in 2014 gepubliceerd.

Het is dus mogelijk om met behulp van de beschikbare sequenties uitbraken internationaal te linken aan hun geografische oorsprong. Hoewel de beschikbare HAVNET-database sequenties bevat van de meeste continenten en genotypen, wordt vergelijking van sequentiedata echter bemoeilijkt door het feit dat niet alle sequenties afkomstig zijn van hetzelfde stuk van het HAV-genoom. Verder is het scheidend vermogen in sommige geografische regio's beperkt door de korte lengte van de sequenties en door het aantal beschikbare sequenties. Ook is het moeilijk

**Tabel 1.** Sequentieaantallen met informatie over transmissieroute in HAVNET. (N=637)

Possible transmission route	HAVNET
Reisgerelateerd	277
Persoon-naar-persoon (non-seksueel contact)	219
Persoon-naar-persoon (sexueel contact)	102
IV druggebruikers	14
Voedsel en water	25

**Figuur 1.** Wereldwijde genotypeverdeling van HAV.



om bijvoorbeeld de transmissieroutes te volgen van virusstammen bij een HAV-infectie als een deel van de epidemiologische informatie ontbreekt.

Om het scheidend vermogen van clusterdistributie op basis van HAV-genotypen te verhogen, is het nodig om systematisch data te verzamelen. Daarnaast moeten zowel de sequentieregio als de sequentielengte gestandaardiseerd worden. Dat is mogelijk door protocollen voor genotypering af te stemmen met de laboratoria die deelnemen aan HAVNET. Om de database te kunnen inzetten voor de publieke gezondheid is het daarnaast nodig om de geografische vertegenwoordiging en dekkingsgraad te vergroten.

### Publicaties en referenties

<http://www.Havnet.nl>

## Humaan papillomavirus (HPV) surveillance en onderzoek

**Auteur:** Jan Sonsma

**Betrokkenen:** Audrey King, Elske van Logchem, Naomi van Marm-Wattimena, Marion Koopmans, Hester de Melker, Rianne Vriend, Petra Woestenberg en Marianne van der Sande.

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

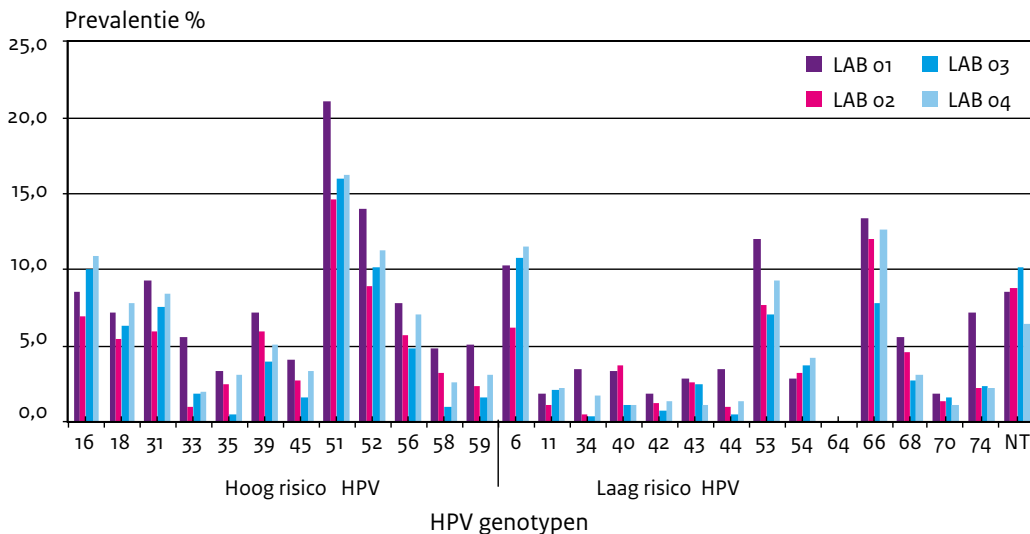
Een humaan papillomavirusinfectie kan baarmoederhalskanker veroorzaken. Er zijn meer dan 100 verschillende HPV-types bekend, maar van alle gevallen van baarmoederhalskanker wordt 70% veroorzaakt door HPV16 en 18. HPV16/18 vaccinatie is sinds 2009 opgenomen in het Rijksvaccinatieprogramma (RVP). Tot januari 2014 ontvingen meisjes van 12 jaar drie prikken met het Cervarix® vaccin volgens een 0, 1 en 6 maanden schema. Sinds kort blijkt dat meisjes, jonger dan 15 jaar, voldoende beschermd worden na 2 vaccinaties die gegeven worden op 0 en 6 maanden. Sinds januari 2014 worden meisjes jonger dan 15 jaar daarom gevaccineerd volgens dit aangepaste vaccinatieschema. Meisjes ouder dan 15 jaar worden wel gevaccineerd volgens een vaccinatieschema bestaande uit 3 prikken, omdat bij hen de beschermingsgraad onvoldoende blijkt te zijn na 2 prikken HPV Cervarix®.

Het RIVM is verantwoordelijk voor de monitoring van de effecten van het HPV-vaccinatieprogramma. Daarom voeren we een aantal HPV-studies uit om de impact te onderzoeken van HPV-vaccinatie op de prevalentie van deze virussen in verschillende populaties in Nederland. Hierbij is het Clb-IDS verantwoordelijk voor de HPV-detectie en genotypering. Deze wordt deels uitbesteed aan verschillende Nederlandse medisch microbiologische laboratoria (MML's). Met behulp van de SPF10 PCR-amplificatie en LiPA-genotypering wordt HPV bepaald. Alle laboratoria voeren deze bepalingen uit volgens een vast protocol. De reproduceerbaarheid van de HPV-detectie en -typering die de verschillende MML's uitvoeren, meet het Clb-IDS door een her-test uit te voeren op 5% van alle positieve en negatieve monsters. Door jaarlijkse deelname aan QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics) en WHO (World Health Organisation) proficiency panels is de kwaliteit van deze detectie- en genotyperingsmethode bij het Clb-IDS gewaarborgd. In 2013 was de score voor detectie van HPV in het QCMD panel 100%.

### **Uitgelicht: PASSYON (Papillomavirus Surveillance among STI clinic YOuNgsters) studie:**

In 2013 heeft het Clb-IDS de HPV-detectie en genotypering verzorgd voor de PASSYON studie. Deze studie meet de HPV-prevalentie in SOA-polibezoekers (m/v 16-24 jaar) in Nederland door vaginale/peniele/anale swabs te testen. De keuze is gemaakt om de HPV-prevalentie in deze groep te monitoren omdat naar verwachting de impact van vaccinatie het eerst zichtbaar zal zijn in een seksueel zeer actieve (hoog-risico) populatie. Verspreid over Nederland zijn in diverse SOA-polis genitale swabs afgenomen bij de bezoekers. Hiermee wordt het vóórkomen van HPV iedere 2 jaar in kaart gebracht. In 2013 is dit voor de derde keer uitgevoerd en zijn door het Clb-IDS en andere laboratoria ongeveer 2300 monsters geanalyseerd op de aanwezigheid van HPV. Onze voorlopige resultaten laten zien dat gemiddeld ongeveer 60% van de SOA-polibezoekers een HPV-infectie heeft. De hoog-risico HPV-types die het meest voorkomen in deze groep jonge SOA-polibezoekers, zijn types 16, 51 en 52. (Figuur 1). Deze prevalentie is

**Figuur 1.** HPV Genotypes in SOA poli bezoekers in 2013. NT= HPV genotype niet typeerbaar.



vrijwel onveranderd ten opzichte van de voorgaande meetmomenten in 2009 en 2011. Een voorlopige analyse van de data uit 2013 voor afzonderlijke groepen is uitgevoerd. Bij het cohort vrouwen met een leeftijd van 16-20 jaar is de prevalentie van HPV16 in 2013 significant lager in vergelijking met 2011 en 2009. Dit is het cohort vrouwen dat in aanmerking is gekomen voor HPV-vaccinatie. Verdere analyse van de data is nodig om te bevestigen of dit effect beïnvloed is door HPV-vaccinatie.

Het in Nederland gebruikte vaccin Cervarix® (HPV16/18), is gericht tegen HPV16 en 18 en bestaat uit virus-achtige deeltjes bestaande uit het L1 eiwit. L1 eiwitten vormen het capsid van het virus, en zijn tijdens een natuurlijke infectie het voornaamste doelwit voor neutraliserende antistoffen. De neutraliserende antistoffen die gevormd worden na vaccinatie, voorkómen HPV-infecties door binding aan HPV16 en 18 L1-eiwitten. Veranderingen in de L1-eiwitsequentie kunnen de binding van deze neutraliserende antistoffen beïnvloeden. Langdurige vaccinatie kan leiden tot selectie van HPV-virussen met specifieke varianten van het L1-eiwit en het is dus belangrijk om te monitoren of dit effect optreedt. Het is dan nodig om inzicht te krijgen in de (genetische) diversiteit van HPV-genotypen 16 en 18, die in Nederland circuleerden vóórdát de vaccinatie is gestart. Wij hebben binnen de PASSYON studie de volledige DNA-sequentie van het L1-gen (1.6 kb) bepaald in 241 HPV16-positieve monsters. Deze zijn verzameld in 2009 (n=97) en 2011 (n=144). Met behulp van sequentieanalyse is gezocht naar eventueel voorkomende mutaties in het L1-gen. Daarnaast is bestudeerd hoe deze mutaties zich verhouden tot de circulerende HPV16-stammen in Europa. Het grootste deel van de onderzochte HPV16-isolaten (93%) groepeert samen met Europese/Aziatische HPV16-varianten en 7% met de Afrikaanse HPV16-varianten. Op dit moment worden HPV18-monsters nader geanalyseerd.

# Influenza surveillance en genetische karakterisatie van virussen uit bijzondere aanvragen, respiratoir seizoen 2012-2013

**Auteur:** Pieter Overduin

**Betrokkenen:** Sharon van den Brink, Ton Marzec, Mariam Bagheri, Hans Krul, Marcel Jonges, Marion Koopmans, Gé Donker (NIVEL), Marit de Lange, Wim van der Hoek, Anja Haenen, Marie-José Veldman Marianne van der Sande; Lands laboratorium Aruba: Riemsdijk van den Berg, Luis Chong

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

## Lang seizoen

Het Influenza seizoen 2012-2013 is in vergelijking met andere jaren een ongewoon seizoen geweest (1). Het eerste influenzaviruspositieve monster uit de huisartsen peilstations-surveillance is al op 25 oktober 2012 gevonden. In week 52 van 2012 is de epidemische grens overschreden. Dit houdt in dat 51 mensen per 100.000 inwoners de diagnose influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) hebben. Pas in week 16 daalde het aantal IAZ gevallen weer onder de epidemische grens (Figuur 1A). Daarmee is het influenzaseizoen van 2012-2013 veel langer geweest dan gemiddeld (Figuur 1B). Het is bijzonder dat naast influenzavirus A(H1N1)pdm09 en A(H3N2) ook influenzavirus type B gedurende de hele periode is gevonden; meestal is dat pas later in het influenzaseizoen.

## Virusdetectie en karakterisatie

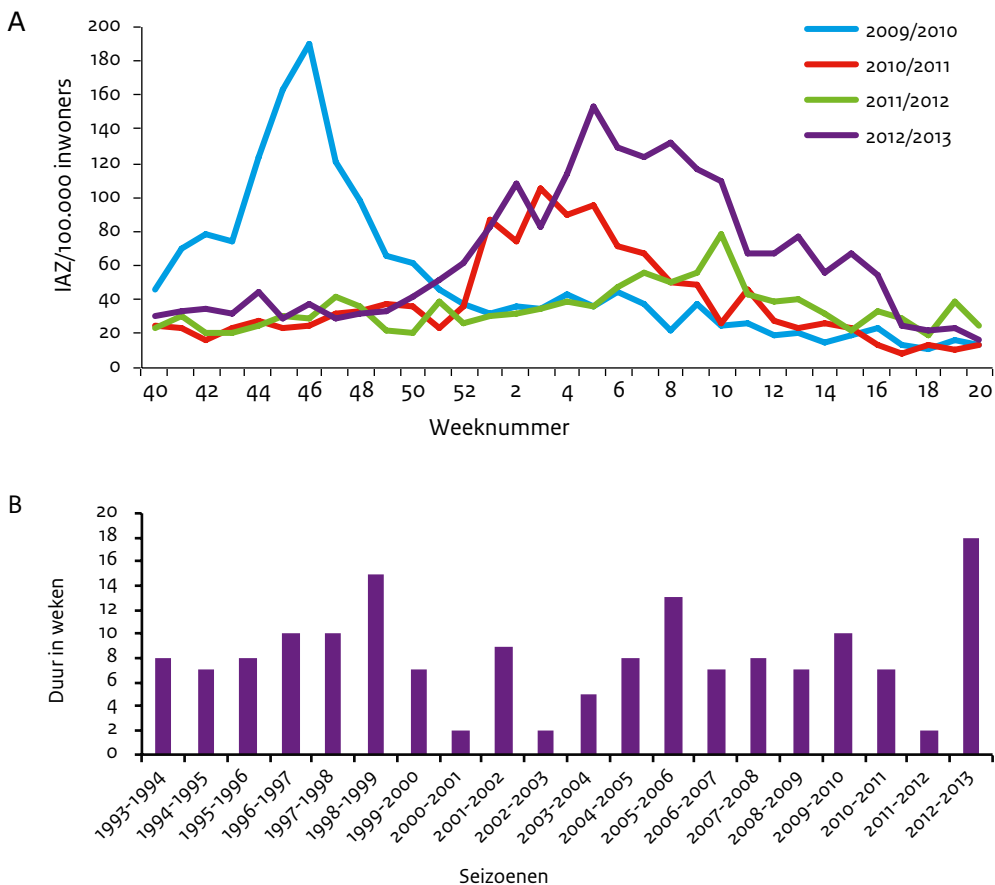
Gedurende het hele jaar wordt bij het Clb-IDS influenzavirusonderzoek uitgevoerd op klinische monsters. Deze zijn afkomstig van huisartsenpeilstations (gecoördineerd door NIVEL), verpleeghuizen-netwerk (SNIV; gecoördineerd door het RIVM) of bijzondere aanvragen (Tabel 1). Een deel van de influenzaviruspositieve monsters wordt genetisch gekarakteriseerd, waarmee we de evolutie en verspreiding van het virus volgen. Bij uitbraken in bijvoorbeeld verpleeg- of ziekenhuizen, kunnen we de transmissie van het virus in kaart brengen. Ook kunnen we mutaties in kaart brengen, die samenhangen met verlaagde gevoeligheid voor antivirale middelen. Als fenotypisch een verlaagde antivirale gevoeligheid wordt vastgesteld, geven sequenties meer inzicht in de aminozuren die daar mogelijk de oorzaak van zijn. Daarom wordt verspreid over het seizoen een deel van de gevonden virussen gesequencet en genetisch gekarakteriseerd (Tabel 1).

## Mogelijke uitbraak op cruiseschip

Een voorbeeld van een “uitbraak” die met karakterisatie verder in kaart is gebracht, betreft influenzagevallen op twee cruiseschepen in de Cariben. Beiden deden tijdens hun reis in juni 2013 Aruba aan, en van een aantal passagiers met griepklachten werden keel-neuswat monsters afgenomen. Het laboratorium op Aruba stelde vast dat het om influenzavirusinfectie ging, waarna deze monsters voor verdere karakterisatie zijn opgestuurd naar het RIVM. Het gaat om vier patiënten op het eerste cruiseschip en twee patiënten op het tweede schip. Op het eerste cruiseschip waren drie patiënten A(H1N1)pdm09 positief en één patiënt A(H3N2) positief. Op het tweede cruiseschip bleek één patiënt A(H1N1)pdm09-positief en de andere had



**Figuur 1.** (A) Klinische influenza-activiteit in Nederland in de seizoenen 2009/2010 (pandemisch seizoen), 2010/2011, 2011/2012 en 2012/2013 (zwarte lijn) weergegeven als het wekelijkse aantal patiënten met een influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) per 100.000 inwoners. De gegevens werden verzameld door NIVEL Zorgregistraties eerste lijn. (B) Influenza epidemie-duur in weken van de laatste twintig seizoenen.



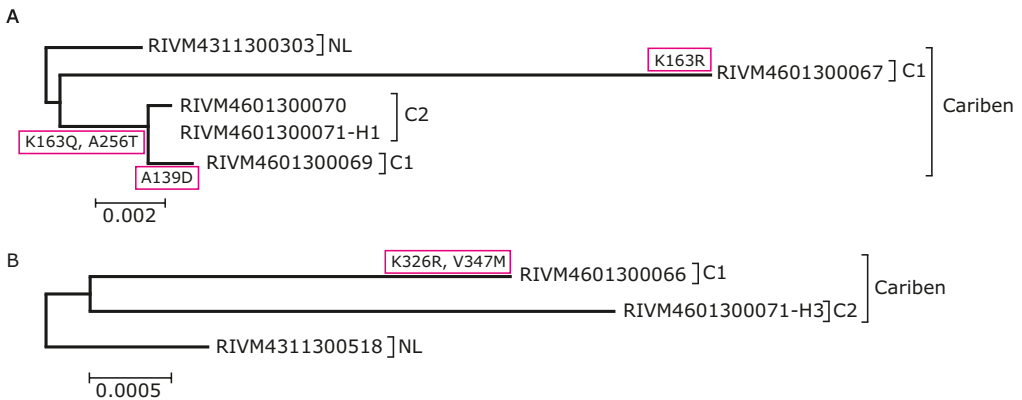
een dubbelinfectie met A(H1N1)pdm09 en A(H3N2). Deze virussen zijn fylogenetisch geanalyseerd, samen met virussen uit Nederland.

Van cruisschip één zijn twee A(H1N1)pdm09-virussen gekarakteriseerd, en deze verschillen van elkaar (Figuur 2A)

De twee A(H1N1)pdm09 virussen van het tweede cruisschip zijn identiek, en nauw verwant aan één van de A(H1N1)pdm09-virussen van het eerste cruisschip (Figuur 2A). De A(H3N2)-virussen van beide cruisschepen verschillen veel van elkaar (Figuur 2B). Alle virussen, gevonden bij de passagiers van de cruisschepen, zijn ook heel anders dan de virussen die in Nederland circuleerden (Figuur 2).

**Figuur 2.** Fylogenetische boom van influenzavirussen gevonden in cruiseschip passagiers; (A) A(H1N1)pdm09 en (B) A(H3N2).

Labels: C1, monsters van cruiseschip 1; C2, monsters van cruiseschip 2. Ter vergelijking is een influenzavirus uit Nederland (NL) meegenomen in de analyse. Karakteristieke aminozuurmutaties voor geografische regio's zijn in kaders geplaatst. Fylogenetische analyse: neighbour joining boom constructie, Jukes and Cantor substitutie model, pairwise alignment methode. Aminozuur substituties in kaart gebracht met gebruikmaking van FluSurver (<http://flusurver.bii.a-star.edu.sg/>).



Drie aminozuursubstituties (A139D, K136Q, A256T) in de A(H1N1)pdm09-virussen van de cruiseschepen, zijn tot dan toe exclusief gevonden in Noord- en Zuid Amerika. (Figuur 2A, omkaderd). Twee van de aminozuursubstituties die in de A(H3N2) virussen van de passagiers van de cruiseschepen zijn gevonden, zijn zeldzaam. K326R is tot dan toe 1 maal gerapporteerd in Zuidoost Azië. V347M komt regelmatig voor in virussen uit de VS (Figuur 2B, omkaderd).

### Toch geen uitbraak

De uitkomst van de sequentieanalyse is verrassend. De eerste gedachte die boven komt is immers: één cruiseschip met veel mensen die elkaar op een klein oppervlak regelmatig tegenkomen bij het eten, in bars, het zwembad etc, er zal wel één bron zijn die alle anderen besmet heeft. De virussen zullen daarom wel van één subtype zijn en genetisch nauw verwant. Uit de analyse blijkt echter dat op het eerste cruiseschip sprake is van minimaal drie verschillende bronnen. Op het tweede cruiseschip waren er zeker twee bronnen, omdat zowel A(H1N1)pdm09 als A(H3N2)-influenzavirus is gevonden.

De bijzondere aminozuursubstituties zijn een tweede resultaat van de karakterisaties. Sommige substituties komen heel weinig voor en geven daarmee een indicatie waar de patiënt het virus mogelijk heeft opgelopen. Het virus in monster RIVM 4601300067 heeft substituties die over een groot geografisch gebied gevonden zijn. Daar valt niet over te speculeren. Monster RIVM 4601300069 heeft drie aminozuur substituties die tot dan toe exclusief zijn gevonden in Zuid-Amerika. Het ligt dan ook voor de hand dat deze passagier uit Zuid-Amerika

**Tabel 1.** Influenzavirus positieve monsters per studie ingedeeld naar subtype en aantal gesequencet.

Studie	Ontvangen monsters	A(H1N1) pdm09	A(H3N2)	B-Victoria	B-Yamagata
Huisartsen peilstations	1373	96	93	11	189
Oseltamivir profylaxe studie in verpleeghuizen	51	0	3	0	3
Verpleeghuizen peilstations	43	0	1	0	0
Bijzondere aanvragen**	76	22*	18*	0	2
Gesequencet		31	39	3	10

\* Eén dubbelinfectie met influenza virus A(H1N1)pdm09 en A(H3N2)

\*\* Bijzondere aanvragen komen van laboratoria die geen subtypering kunnen doen, van aanvragen voor diagnostiek i.v.m. reishistorie bijvoorbeeld H7N9 influenza virus in China of MERS CoV in het midden oosten, of bij ernstig ziektebeloop.

afkomstig is. De passagier van cruiseschip één met de influenza A(H3N2)-infectie (monster RIVM 4601300066) heeft twee bijzondere aminozuursubstituties. De K326R substitutie is eenmaal in een monster uit Seoul gevonden. De substitutie V347M is ook een weinig voorkomende mutatie, die voornamelijk gevonden is in Amerika. In dit geval zijn er verschillende mogelijkheden, bijvoorbeeld een zakenman die in Azië geweest is of een Aziat die via Amerika naar het schip is gereisd. Helaas zijn verdere epidemiologische gegevens onbekend, zodat de reishistorie geen uitsluitsel kan geven over de mogelijke herkomst van het virus. Toch illustreert dit verhaal de mogelijkheden die genetische karakterisatie biedt om inzicht te krijgen in transmissie en de verspreiding van influenzavirussen.

### Publicaties en referenties

de Jong JC, G.A. Donker, A. Meijer, W. van der Hoek, M.M.A. de Lange, G.F. Rimmelzwaan, A.D.M.E. Osterhaus. "Het influenzaseizoen 2012/2013 in Nederland: een milde maar langdurige epidemie." Ned Tijdschr Med Microbiol 2013; 21(4):135-42.

## Surveillance van acute respiratoire infecties in verpleeghuizen en huisartsen peilstationnetwerken, belang voor preventie en bestrijding

**Auteur:** Adam Meijer

**Betrokkenen:** Pieter Overduin, Sharon van den Brink, Ton Marzec, Mariam Bagheri, Hans Krul, Marcel Jonges, Marion Koopmans, Marit de Lange, Anja Haenen, Marie-José Veldman, Wim van der Hoek, Marianne van der Sande, Danny Hommel, Yolanda van Rijnsoever-Greven, Gé Donker

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

Respiratoir syncytieel virus (RSV) wordt meestal geassocieerd met luchtweginfecties bij jonge kinderen en de ontwikkeling van astma/piepende ademhaling in het latere leven (1). Bij de meeste gezonde volwassenen presenteert een RSV-infectie zich als verkoudheid. Toch lijden ook kwetsbare ouderen aan een RSV-infectie. Met een gemiddeld sterftecijfer van 20% (bereik 2% - 20%) komt RSV-infectie op een derde plaats van infectieuze uitbraken in ouderenzorg faciliteiten. In de VS zijn elk jaar ongeveer 10.000 sterfgevallen onder personen ouder dan 65 jaar toe te rekenen aan RSV infecties. In Nederland is de schatting dat 1.685 personen ouder dan 65 jaar per winterseizoen sterven aan een RSV infectie (2). Dit is vergelijkbaar met 2.110 overlijdens door een influenzavirus type A infectie (2). Daarom is de detectie van RSV ook opgenomen in de surveillance van influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) en andere acute respiratoire infecties (ARI).

### Surveillance

De surveillance van IAZ en ARI in Nederland wordt uitgevoerd in een netwerk van verpleeghuizen gecoördineerd door het RIVM (Surveillance Netwerk Infectieziekten Verpleeghuizen; SNIV) en in een netwerk van huisartsen gecoördineerd door het NIVEL Nederlands instituut voor onderzoek van de gezondheidszorg. Deze surveillance is in beide netwerken op dezelfde manier ingericht. Naast monitoring van de incidentie van IAZ worden er respiratoire monsters afgenomen voor virusdetectie. Dit wordt onder andere gedaan om de oorzaak van stijgingen in IAZ-incidentie te kunnen duiden.

Verpleeghuisartsen en huisartsen wordt gevraagd om het hele jaar door per week een neuswat en een keelwat af te nemen bij minstens twee patiënten met IAZ. Worden er geen patiënten met IAZ aangetroffen, dan wordt hen gevraagd om bij patiënten met een andere ARI een neuswat en een keelwat af te nemen. Van alle bemonsterde patiënten worden demografische, klinische en epidemiologische gegevens verzameld. De monsters worden op het RIVM geanalyseerd op influenzavirus, RSV, rhinovirus en enterovirus.

### Uitbraak, detectie en karakterisatie

In twee opeenvolgende weken van december 2012 is in de surveillance type B RSV (RSV-B) gedetecteerd in drie van vier patiënten uit hetzelfde verpleeghuis (Figuur 1) (3). Dit leek op een uitbraak. Daarom is verder virologisch, klinisch en epidemiologisch onderzoek uitgevoerd. In de volgende week werden in dit verpleeghuis zes andere patiënten bemonsterd. Zij hadden vergelijkbare respiratoire klachten als de eerste vier patiënten. Eén van deze patiënten bleek

RSV-B-positief. De in totaal zes RSV-B-negatieve patiënten waren ook negatief voor influenza-virus, rhinovirus, en enterovirus. De meeste RSV-B-positieve patiënten in deze uitbraak hadden milde symptomen en niemand stierf. Twee patiënten hadden een longontsteking, de andere acht werden gediagnosticeerd met verkoudheid. Alle 10 patiënten herstelden binnen twee weken na het begin van de symptomen.

Het verpleeghuis heeft vier afdelingen van vier eenheden en één afdeling met drie eenheden en een kinderdagverblijf. Acht van de 10 patiënten wonen op één afdeling, waaronder de vier RSV-B-positieve patiënten. Twee RSV-B-positieve patiënten wonen met de RSV-B-positieve index patiënt op dezelfde eenheid. De 'attack rate' was 38%; drie van de acht bewoners die nauw samenleven op één eenheid waren RSV-B-positief.

### **Bronopsporing**

Onderzocht is of de RSV-B-virussen uit de uitbraak hetzelfde zijn en te onderscheiden van andere RSV-B-virussen. Daarvoor zijn tussen januari 2011 tot en met januari 2013 vijftien RSV-B-positieve monsters verzameld; zes uit het verpleeghuizennetwerk, waaronder de vier uit de uitbraak, en negen uit het huisartsennetwerk (Figuur 1). Van deze monsters is het glycoproteïne G gen gesequencet (GenBank accession numbers KC710983-KC710997). Vervolgens zijn de sequenties fylogenetisch geanalyseerd (Figuur 2). Van de vier RSV-B-positieve monsters uit de uitbraak bleken de glycoproteïne-G gensequenties 100% identiek te zijn. Deze sequenties verschilden van andere RSV-B positieve monsters (Figuur 2). Dit bevestigde het vermoeden dat er één infectiebron was.

Als mogelijke bronnen van de insleep van de RSV-infectie zijn geïdentificeerd: zieke familieleden die de index-patiënt bezochten in de week voordat de patiënt ziek werd, personeel met milde luchtwegklachten, en zieke kinderen op het inpatient kinderdagverblijf. Helaas waren er van deze personen geen monsters beschikbaar voor analyse.

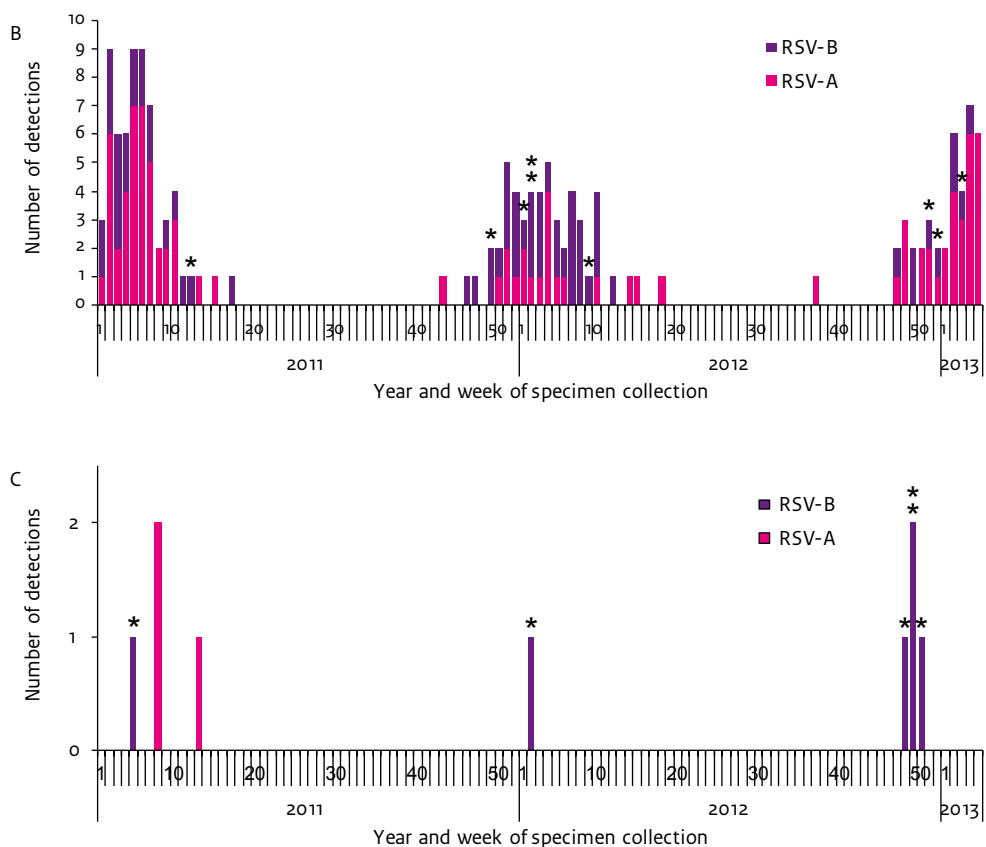
### **Risico's in kaart**

Deze bevindingen ondersteunen dat de drie geïdentificeerde bronnen in aanmerking moeten worden genomen in de strategieën voor de preventie van de insleep van besmettelijke infectieziekten in verpleeghuizen. Familieleden of personeel met een verkoudheid worden niet weerhouden van hun bezoek aan of werk met de verpleeghuisbewoners. Ziek aan het werk gaan staat bekend als presenteïsme en is onlangs erkend als een potentieel gevaar voor de volksgezondheid, naast het creëren van een economisch probleem. Kinderen en ouderen profiteren van 'intergenerationele geriatrische remotivatatie' dat wordt uitgevoerd door inpatient kinderopvang. Jonge kinderen lopen tijdens hun eerste levensjaren veel infecties op, waaronder RSV. Zij kunnen daarom een potentiële bron van infecties zijn. Dit is een nadelig effect. Bij de verpleeghuis infectiepreventie-strategie moet daar rekening mee worden gehouden als er 'intergenerationele geriatrische remotivatatie' geïmplementeerd wordt.

### **Preventie en bestrijding**

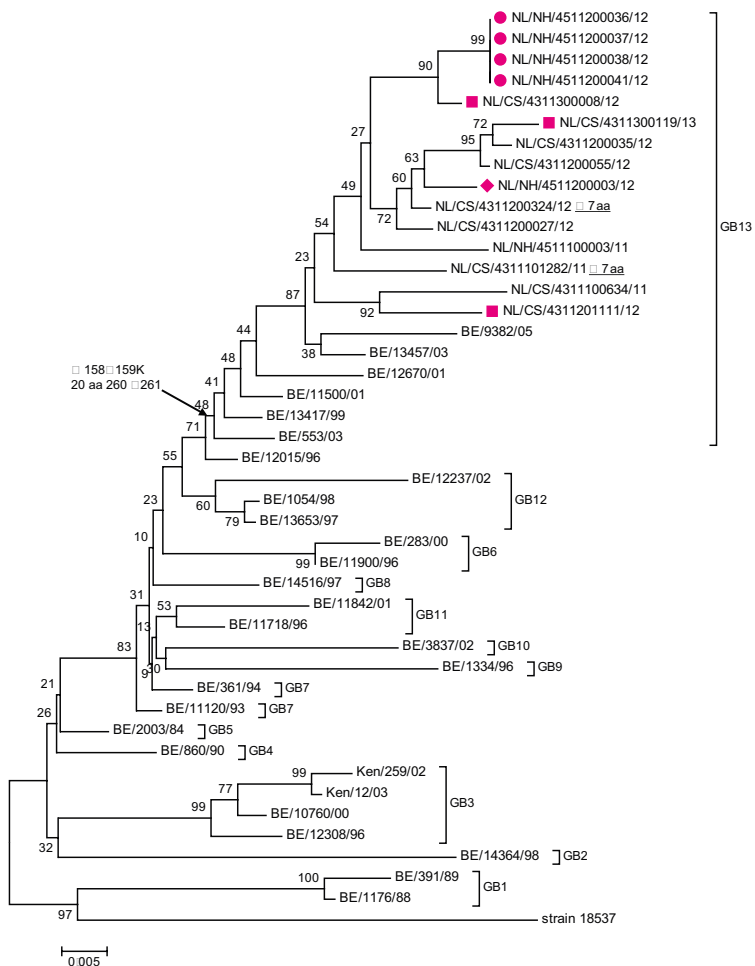
De bevindingen ondersteunen het nut van de multidisciplinaire benadering van de peilstation-gebaseerde surveillance van IAZ in Nederland. Deze aanpak laat zien dat we moleculair bewijs

**Figuur 1.** Aantal respiratoir syncytieel virus (RSV) detecties in twee peilstation surveillancesystemen in Nederland, januari 2011 tot en met januari 2013. RSV-detecties naar type in monsters afgenomen bij patiënten met influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) of een andere acute respiratoire infectie (ARI) in het huisartsen peilstationnetwerk (A) en het verpleeghuizen peilstationnetwerk (B). Sterren (\*) geven individuele klinische monsters aan van welke het RSV-B glycoproteïne-G gen is gesequencet.



kunnen leveren voor een enkele bron van introductie. Daarnaast levert het belangrijk inzicht in mogelijke infectiebronnen. Voor preventie van RSV-infectie bestaat geen vaccin. Verpleeghuizen kunnen daarom alleen algemene infectiepreventiestrategieën toepassen in een poging om introductie en nosocomiale verspreiding van RSV te voorkomen. In het getroffen verpleeghuis zijn deze uitgevoerd volgens verpleeghuis-specifieke richtlijnen. Bovendien beperkte de architectonische structuur van het verpleeghuis de uitbraak vooral tot één eenheid. De afzonderlijke eenheden zijn fysiek gescheiden waardoor bewoners van andere eenheden geen direct contact hebben met besmette en direct blootgestelde bewoners.

**Figuur 2.** Phylogenetische analyse van partiële glycoproteïne-G gensequenties van respiratoir syncytieel virus (RSV) type B. Sequenties zijn gecodeerd: land van virusdetectie/type peilstation wanneer beschikbaar/monternummer/jaar van virusdetectie. Getoonde sequenties zijn van Nederland (NL) van het verpleeghuizen peilstationnetwerk (NH = nursing home) en het huisartsen peilstationnetwerk (CS = community surveillance), België (BE), Kenia (Ken) en de 'outgroup' RSV-B-stam 18537. De genogroepen GB1 – GB13 zijn aangeduid binnen rechthoekige haken. De sequenties van de RSV-B's uit de verpleeghuisuitbraak zijn 100% identiek (roze cirkel) en te onderscheiden van RSV-B sequenties uit de huisartsen peilstationsurveillance op het moment van de uitbraak (roze vierkant). Een ander RSV-B, gedetecteerd in het verpleeghuis van de uitbraak maar dan begin 2012, is gemarkeerd met een roze ruit. De getallen bij de knooppunten geven de robuustheid van de afsplitsing aan in een percentage na 1000 'boots-trapped' herhalingen van de berekening van de topologie van de fylogenetische boom.



## Dankbetuiging

We danken alle deelnemende huisartsen en verpleeghuizen en patiënten en bewoners. Zonder hun medewerking is de surveillance niet mogelijk.

## Publicaties en referenties

Blanken MO, Rovers MM, Molenaar JM, Winkler-Seinstra PL, Meijer A, J. Kimpen L, et.al.

“Respiratory Syncytial Virus and Recurrent Wheeze in Healthy Preterm Infants.” *N Engl J Med* 368, no. 19 (2013): 1791-9.

van Asten L, van den Wijngaard C, van Pelt W, van de Kasstelee J, Meijer A, van der Hoek W, et. al. “Mortality Attributable to 9 Common Infections: Significant Effect of Influenza a, Respiratory Syncytial Virus, Influenza B, Norovirus, and Parainfluenza in Elderly Persons.” *J Infect Dis* 206, no. 5 (2012): 628-39.

Meijer A, Overduin P, Hommel D, van Rijnsoever-Greven Y, Haenen A and Veldman-Ariesen MJ. “Outbreak of Respiratory Syncytial Virus Infections in a Nursing Home and Possible Sources of Introduction: The Netherlands, Winter 2012/2013.” *J Am Geriatr Soc* 61, no. 12 (2013): 2230-1.



## Toepassingen van influenzavirus sequentieanalyse

**Auteur:** Marcel Jonges

**Betrokkenen:** Adam Meijer en Marion Koopmans

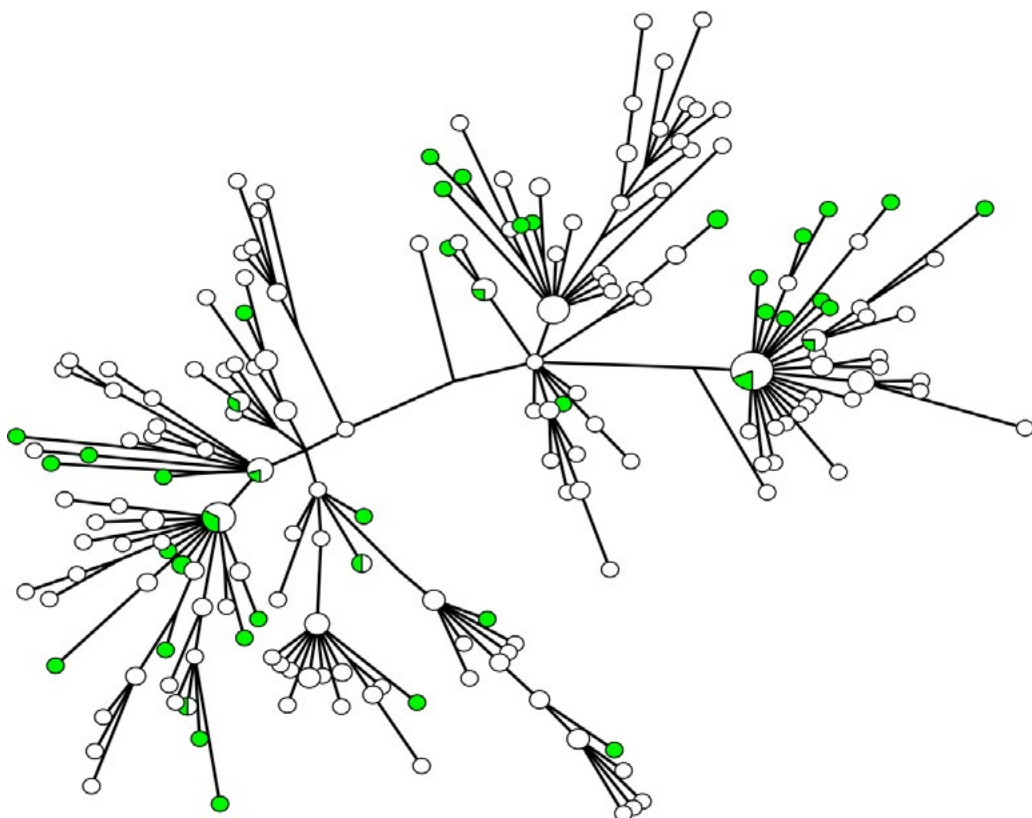
**Contactpersoon:** Marcel Jonges (marcel.jonges@rivm.nl)

Wilde watervogels zoals eenden en ganzen zijn de natuurlijke gastheer van een enorme diversiteit aan influenza A-virussen. Deze virussen zijn ingedeeld in subtypen, gebaseerd op twee verschillende membraaneiwitten: het haemagglutinine (HA) en het neuraminidase (NA). Behalve influenzasubtypen die recent in vleermuizen zijn aangetroffen (H17N10 en H18N11), komen influenza A-virussen van alle andere HA (1-16) en NA (1-9) subtypen voor bij watervogels. Vroeger werd gedacht dat deze vogelgriepvirussen onschadelijk waren voor mensen. Vanaf de ontdekking van influenza H5N1 virus bij mensen in 1997, werd vogelgriep echter langzaam maar zeker een zoonose. Een enkele keer raken mensen geïnfecteerd met een vogelgriepvirus, vooral als gevolg van contact met besmette vogels. Ziekteverschijnselen variëren afhankelijk van het virus-subtype en lopen uiteen van mild tot fataal. Bij de huidige influenza H7N9-uitbraak in China, zijn vanaf februari 2013 tot maart 2014 minimaal 361 mensen geïnfecteerd, waarvan er 80 zijn overleden. Gelukkig hebben deze vogelgriepvirussen zich tot nu toe niet voldoende kunnen aanpassen aan de mens. De mens-op-mens overdracht van deze virussen verloopt daardoor inefficiënt en een pandemie blijft uit.

Tijdens replicatie van influenzavirussen vindt er geen fout-correctie plaats bij het kopiëren van RNA. Hierdoor sluipen kopieerfouten in het RNA, die van persoon op persoon overgedragen worden. Vaak leiden deze kopieerfouten niet tot fenotypische veranderingen, maar soms wel. Een influenzavirus kan hierdoor mutaties krijgen waardoor een vaccin minder goed beschermt, het virus resistent wordt voor antivirale middelen of de ziekteverwekkende kwaliteiten van het virus veranderen. Met behulp van influenzavirus sequentieanalyses monitort het RIVM deze onvoorspelbare veranderingen nauwlettend. Daarnaast worden ook alle mutaties (met én zonder een fenotypisch effect) gebruikt om transmissieketens in kaart te brengen.

Sequentiedata zijn bruikbaar om transmissieketens en bronnen van infecties te identificeren. Dit is aangetoond tijdens de 2003-uitbraak van influenza H7N7-virus in Nederland, waar sequentieanalyse werd uitgevoerd op vogelgriepvirussen die zowel pluimvee als mensen infecteerden. De opstapeling aan kopieerfouten in het influenza-RNA door de tijd, maakte het mogelijk om de volgorde van geïnfecteerde pluimveebedrijven en bronnen van humane infecties op te helderen. De influenzavirus-sequentiedata kwamen overeen met epidemiologische gegevens. De resolutie van de sequentiedata bleek echter veel informatiever te zijn, waardoor de reconstructie van de uitbraak mogelijk was (Figuur 1). Vervolgens is gekeken naar situaties waarbij het vogelgriepvirus mutaties kreeg die het virus gevaarlijker maakt voor mensen. Het grootste gedeelte van deze mutaties bleek in pluimvee te ontstaan. Dit betekent dat boerderij-naar-boerderij verspreiding van vogelgriep een direct gevaar is voor de volksgezondheid. Vervolgonderzoek heeft aangetoond dat de wind een mogelijke rol speelt bij de boerderij-naar-boerderij verspreiding van dit virus (1). Daarom zijn de afgelopen tijd luchtmetingen verricht buiten met vogelgriep geïnfecteerde pluimveebedrijven. Bij meerdere bedrijven

**Figuur 1.** Reconstructie van de 2003 uitbraak van influenza H7N7-virus in Nederland met virus-sequentiedata van 48 geïnfecteerde mensen (groen) en 215 pluimveebedrijven (wit) identificeert transmissieketens en bronnen van infecties. Hoe groter de cirkel, hoe vaker een specifieke virusvariant gedetecteerd is. De afstand tussen de cirkels weerspiegelt het aantal mutaties (Jonges et al., 2011).



is influenzavirus gedetecteerd in de lucht, tot ongeveer 100 meter vanaf de geïnfecteerde stal (2). Om nauwkeuriger te kunnen kijken naar specifieke influenzavirusinfecties, is sinds kort een Next Generation Sequencing techniek gevalideerd en ingevoerd. Daarmee kan de diversiteit van virussen binnen een infectie (van één persoon) gekarakteriseerd worden. Met deze techniek is uitgezocht hoe een voor mensen gevaarlijke influenza H7N7-virusvariant kon ontstaan, die vervolgens domineerde en leidde tot het overlijden van een dierenarts in 2003 (3).

De totale opgebouwde kennis over het gebruik van influenzavirus-sequentiedata in uitbraak-situaties is afgelopen jaar ingezet voor influenza H7N9-virussen. Op 31 maart 2013 meldden de Chinese volksgezondheidsautoriteiten dat er mensen geïnfecteerd waren door een nieuw influenzavirus van het subtype H7N9. Direct daarna heeft het RIVM samengewerkt met

Chinese humane en veterinaire autoriteiten om aan de hand van de beschikbare sequentiedata een risico-inventarisatie te maken. Binnen twee weken is dit onderzoek gepubliceerd. Uit het onderzoek kwam vooral goed naar voren wat de omvang van de uitbraak, de mogelijke bron van humane infecties en het pandemisch potentiaal was van deze uitbraak (4). Dit type analyse van influenzavirus-sequentiedata in uitbraaksituaties blijkt tot belangrijke, objectieve informatie te leiden. Deze kan gebruikt worden om virusuitbraken effectiever te bestrijden en daarmee het risico voor de volksgezondheid te verkleinen.

### Publicaties en referenties

Ypma RJ, Jonges M, Bataille A, Stegeman A, Koch G, van Boven M, et.al. "Genetic Data Provide Evidence for Wind-Mediated Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza." *J Infect Dis* 207, no. 5 (2013): 730-5.

Jonges M, van Leuken J, Wouters I, Koch G, Meijer A, Koopmans M. "Wind mediated spread of influenza virus during outbreaks in commercial poultry farms. Manuscript in preparation

Jonges M, Welkers MR, Jeeninga RE, Meijer A, Schneeberger P, Fouchier RA, et.al. "Emergence of the Virulence-Associated Pb2 E627k Substitution in a Fatal Human Case of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus a(H7N7) Infection as Determined by Illumina Ultra-Deep Sequencing." *J Virol* 88, no. 3 (2014): 1694-702.

Jonges M, Meijer A, Fouchier RA, Koch G, Li J, Pan JC, et.al. "Guiding Outbreak Management by the Use of Influenza a(H7Nx) Virus Sequence Analysis." *Euro Surveill* 18, no. 16 (2013): 20460.

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

**Auteurs:** Jeroen Kerkhof, Sigrid Gouma

**Betrokkenen:** Daphne Gijselaar, Jeroen Cremer, Susan Hahné, Marion Koopmans, Rob van Binnendijk

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

Het Clb-IDS verricht diagnostiek, moleculaire typering en uitbraak-gerelateerd onderzoek bij bof, mazelen en rodehond ten behoeve van het Rijksvaccinatieprogramma. Perifere laboratoria en de GGD'en vragen de diagnostiek aan. Bij uitbraken van exantheem wordt ook de vijfde ziekte (parvo B19 virus) in de differentiële diagnostiek meegenomen.

### Mazelen

In 2013 was er sprake van een grote mazelenuitbraak. Deze vond plaats in de gebieden in Nederland waar de vaccinatiegraad lager is dan het landelijk gemiddelde, ook wel bekend als de bijbelgordel. Deze uitbraak begon in de laatste week van mei. Voorafgaand aan deze uitbraak zijn er al verschillende mazelen-incidenten geweest in Nederland.

Het eerste geval van mazelen in 2013 was een ongevaccineerde volwassene die een reis naar Engeland had gemaakt. Hij werd begin februari opgenomen in het ziekenhuis vanwege ernstige ziekteverschijnselen. Op grond van de typering werd bij deze patiënt een infectie vastgesteld met een D8 mazelenvirustype "Georgia" (MVs/Tbilisi.GEO/7.13) (Figuur 1: cluster 1). Dit is een type dat begin 2013 circuleert in enkele Europese landen, onder andere Georgië, Engeland (Belfast), Turkije (Istanbul) en Roemenië (ROMA zigeuners). Er zijn in de directe omgeving van deze patiënt geen andere gevallen van mazelen gesignaleerd.

In februari/maart is er sprake van een relatief groot mazelencluster (n=9) in de regio Den Haag (Figuur 1: cluster 2). De indexpatiënt is een onvolledig (1x) gevaccineerde huisarts, die de infectie heeft opgelopen op een congres in Italië in week 6. De diagnose is serologisch bevestigd. De huisarts heeft een nog ongevaccineerd kind dat een mazelenpneumonie ontwikkelt en daarvoor wordt opgenomen in het ziekenhuis. Twee volledig gevaccineerde ziekenhuismedewerkers ontwikkelen vervolgens ook klinische mazelen. Zij zijn in contact geweest met dit kind. Onder de contacten van de huisarts krijgen twee ongevaccineerde collega's mazelen. In de 2<sup>e</sup> ring worden nog 2 ongevaccineerde kinderen en een volledig gevaccineerde volwassene met mazelen opgespoord. Alle gevallen uit dit cluster zijn op basis van positieve PCR en/of positieve IgM bevestigd. Op basis van de typering wordt een D8-mazelenvirus vastgesteld met een sequentietype dat bekend staat als het "Taunton" type (MVs/Taunton.GBR/27.12). In 2013 komt dit D8-type het meest voor in veel Europese landen.

In week 12 signaleren we de eerste gevallen van mazelen binnen de reformatorische gezindte, maar dit leidt nog niet tot de grote mazelen uitbraak. Het aantal gevallen blijft beperkt tot 4 personen. Het hierbij vastgestelde sequentietype is opnieuw het "Georgia" type D8.

Tegelijkertijd is hetzelfde type mazelenvirus ook nog een keer vastgesteld bij een ongevaccineerd kind. Beide mazelenmeldingen zijn niet met elkaar in verband te brengen, maar mogelijk is hier wel sprake van een gemeenschappelijke bron (Figuur 1: cluster 1).

Begin april is mazelen vastgesteld bij 3 ongevaccineerde kinderen, waarbij de epidemiologie en typering wijst op geïmporteerde mazelen uit India (Figuur 1: cluster 3). Het gaat hier opnieuw om een genotype D8-mazelenvirus, maar de sequentie wijkt sterk af van de eerder omschreven D8-clusters.

De grote mazelenuitbraak begint eind mei als mazelen wordt gesignaleerd binnen een gezin en een basisschool. Het genotype dat hierbij wordt vastgesteld is het "Taunton" type D8. Dit sequentietype komt dan al heel vaak voor in veel Europese landen. Het is daarom meer waarschijnlijk dat mazelen opnieuw is geïmporteerd, in plaats van dat de bron het eerdere 'Den Haag cluster' is. In de loop van de mazelenepidemie worden enkele subclusters gesignaleerd met een iets afwijkende sequentie dan de uitbraakstam. Verder worden tijdens de uitbraak in 2013 nog 3 personen met mazelen gesignaleerd met een import-gerelateerde infectie (China, genotype H1; Marokko, genotype D4).

### Rodehond

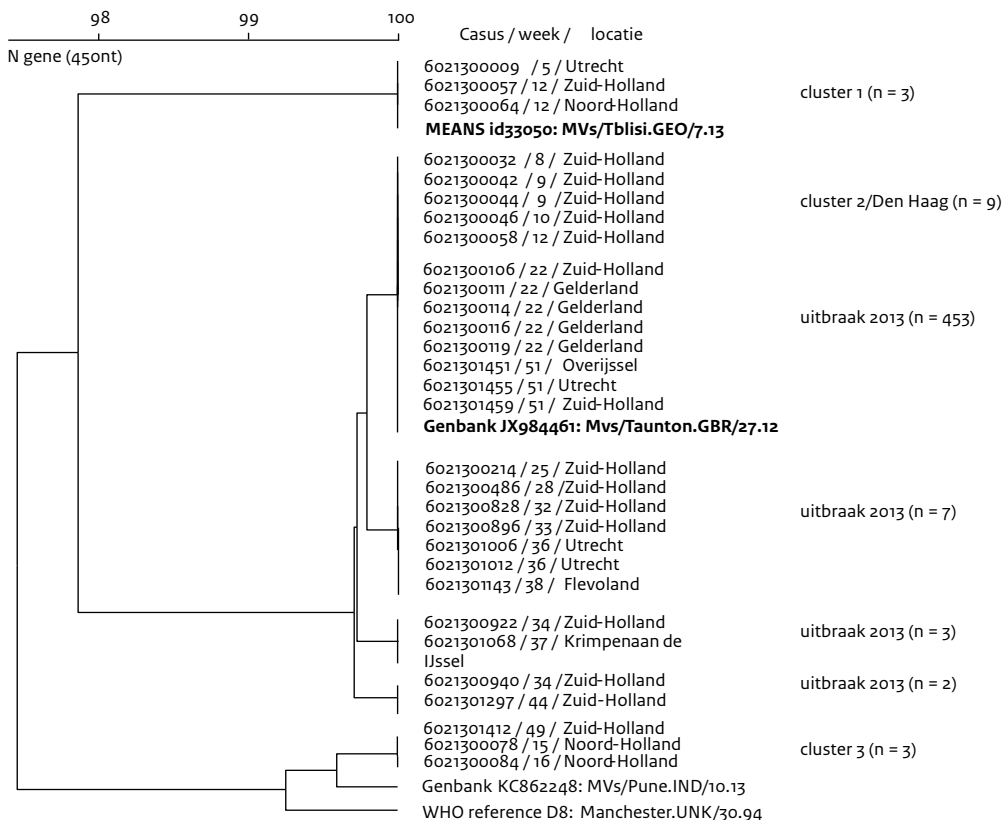
In de 2<sup>e</sup> week van juni wordt rodehond gediagnosticeerd en getypeerd bij een Poolse werknemer in Nederland. Eerder in april is er ook al serologische bevestiging en melding van rodehond bij andere Poolse werknemers in Nederland. De WHO (World Health Organisation) meldt begin 2013 dat er sprake is van een grote uitbraak van rodehond in Polen. Op basis van virustypering is een genotype 2B rubellavirus aangetoond met een sequentietype dat overeenkomt met uitbraken van rodehond in de EU, waaronder Polen.

In dezelfde week van juni is een uitbraak van exantheem vastgesteld op een basisschool met lage vaccinatiegraad. Ondanks de mazelenepidemie heeft de GGD hier het vermoeden dat het gaat om een uitbraak van rodehond, vanwege exantheem en milde klinische verschijnselen. Bij 15 ongevaccineerde kinderen is de diagnose rodehond bevestigd door een multiplex-PCR voor mazelen- en rubellavirus, uitgevoerd op afgenomen speeksel. In totaal zijn 54 gevallen van rubella vastgesteld over een periode van 4 weken. Allen zijn epidemiologisch gelinkt aan dezelfde basisschool. Het blijkt dat het gevonden rubellavirus-2B sequentietype identiek is aan het type dat eerder bij de Poolse werknemer is vastgesteld. Het is niet bekend hoe het rubellavirus op deze school is geïntroduceerd.

### Vijfde ziekte (parvo B19 virus)

In 2013 zijn 12 clusters (14 kinderen) positief bevonden voor parvo B19-virus-IgM. Voor de test is serum gebruikt dat is verkregen uit vingerprikbloed. Hiervan zijn 2 clusters (3 personen) ingestuurd met een verdenking op vijfde ziekte. Daarnaast zijn nog 5 clusters (6 personen) met een verdenking op vijfde ziekte onderzocht, maar kon de bron niet worden vastgesteld. Bij de overige exantheemaanvragen werd verdenking van mazelen (n=130) of van rodehond (n=9) opgegeven, of er werd geen opgave gedaan (n= 54). Van deze aanvragen zijn 10 clusters (11 personen) IgM positief getest op parvo B19-virus (6%).

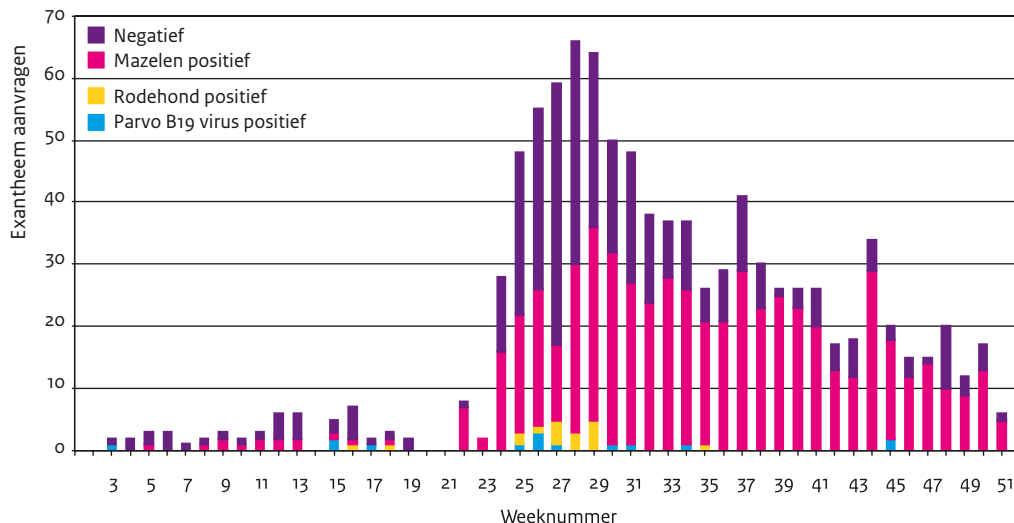
**Figuur 1.** Subtypering van het mazelenvirus genotype D8, het meest voorkomende genotype in Nederland in 2013.



### Diagnostiek mazelen, rodehond en vijfde ziekte

In 2013 zijn 1380 patiëntenmonsters van in totaal 974 personen met exantheem naar het Clb-IDS opgestuurd voor differentiatie van mazelen, rodehond en vijfde ziekte. De enorme toename van het aantal diagnostieaanvragen ten opzichte van 2012 (n=83), is vooral terug te voeren op de grote mazelenuitbraak (Figuur 2). Van de ingezonden klinische monsters zijn er 1019 afkomstig van GGD'en en 361 van microbiologische laboratoria. De GGD maakt gebruik van specifieke afnamesets voor exantheemsurveillance (vingerprikbloed en speeksel). In specifieke gevallen is ook gevraagd naar de afname van urine. De microbiologische laboratoria hebben bij het Clb-IDS vooral keel/neus/mond (KNM)-uitstrijken aangeboden voor diagnostiek, en in mindere mate ook urine en serum (Tabel 1). Met een multiplex PCR zijn speeksel-, urine- en KNM-monsters getest (n=1127, Tabel 1). Deze PCR toont aan of viraal RNA van mazelen en rubella aanwezig is. Vingerprikbloed is geanalyseerd op IgM-antistoffen tegen

**Figuur 2.** Aanvragen exantheemdiagnostiek in 2013 per week.



parvo B19-virus, mazelenvirus en rubellavirus met de multiplex proteïn microarray (PA, n=202). Deze test is bij het Clb-IDS ontwikkeld voor surveillance doeleinden. De sera die zijn aangeboden door de microbiologische laboratoria zijn getest op specifieke IgM-antistoffen. Daarvoor zijn gestandaardiseerde EIA-testen voor resp. mazelen(n=24), rodehond(n=5) of parvo B19 virus (n=1) gebruikt. Ten slotte hebben laboratoria 12 biopten en 9 liquormonsters aangeboden voor PCR-diagnostiek op mazelen of rodehond (Tabel 1, overig).

### Bof

Sinds 2009 zijn er verschillende bofuitbraken gerapporteerd in Nederland. Tijdens deze uitbraken waren de meeste bofpatiënten 18-25 jaar oud en volledig BMR-gevaccineerd. In 2013 zijn 817 klinische materialen ingestuurd, die afkomstig zijn van 550 verschillende personen met een klinische verdenking op bof. Door de GGD'en zijn 368 materialen ingestuurd, afkomstig van 183 personen. Door de perifere laboratoria zijn 449 materialen ingezonden afkomstig van 368 verschillende personen. In totaal zijn 94 van de 550 personen (17%) positief getest voor bof (Tabel 2 en Figuur 3).

De GGD'en maken gebruik van afnamesets voor de afname van speeksel en urine die door het RIVM zijn samengesteld. Van 173 van de 183 personen (95%) die door de GGD'en zijn bemonsterd, is zowel speeksel als urine afgenomen. De laboratoria sturen meestal keel/neus/mondutstrijken in voor diagnostiek, in 16% van de gevallen is daarbij ook urine afgenomen, of werd een serum ingestuurd voor IgM-bepaling (Tabel 2). In tegenstelling tot voorgaande jaren is de incidentie van bof in 2013 lager, en is geen duidelijke seizoenspiek zichtbaar in het aantal bofaanvragen. Wel zijn twee lokale bofuitbraken gesignaleerd. De eerste was in juni in de regio Alkmaar. De tweede uitbraak begon in augustus en vond plaats in Volendam.

**Tabel 1.** Overzicht diagnostieaanvragen voor exantheemziekten bij Clb-IDS in 2013.

Monstertype	Test	Laboratorium inzendingen		GGD inzendingen	
		Aantal monsters	Positief %	Aantal Monsters	Positief %
Serum / vingerprik-bloed	mazelen IgM	24	8 (33%)	202	73 (36%)
	rodehond IgM	5	2(40%)		1 (0,5%)
	B19V IgM	1	0 (0%)		14 (7%)
Speeksel	mazelen PCR	4	1 (25%)	682	411 (60%)
	rodehond PCR		0 (0%)		13 (2%)
KNM uitstrijk	mazelen PCR	260	137 (53%)	4	1 (25%)
	rodehond PCR		2 (1%)		0 (0%)
Urine	mazelen PCR	46	22 (48%)	131	89 (68%)
	rodehond PCR		0 (0%)		2 (1,5%)
Overig	mazelen PCR	21	0 (0%)	0	0 (0%)
	rodehond PCR		0 (0%)		0 (0%)
<b>Totaal</b>		<b>361(26%)</b>	<b>172(47,5%)</b>	<b>1019(74%)</b>	<b>604(59%)</b>

Opvallend is dat vergeleken met voorgaande jaren het percentage personen met de diagnose 'bof' relatief laag is ten opzichte van het totaal aantal aanvragen waar een klinische verdenking is op bof.

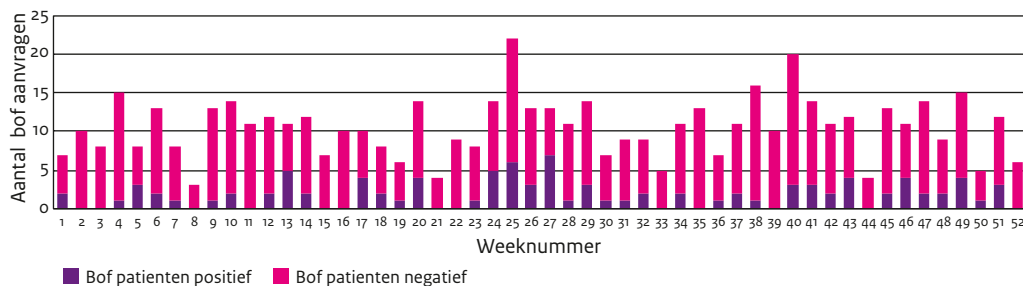
Een verklaring hiervoor is moeilijk te geven. De afnamelogistiek lijkt niet anders dan voorgaande jaren. Ook zijn er geen aanwijzingen gevonden voor een lagere diagnostische sensitiviteit of voor een toename van parotitis door bijvoorbeeld parainfluenzavirus. Onderzoek naar andere mogelijke verwekkers van parotitis is niet verricht.

Voor de typering van bof wordt de sequentie van het small hydrophobic (SH)-gen (316 bp) gebruikt. De meeste patiënten tijdens de recente bofuitbraken blijken geïnfecteerd met een genotype-G bofvirusstam. Binnen genotype-G worden twee grote clusters geïdentificeerd, namelijk G5-NLD1 en G5-NLD2. G5-NLD1 domineerde tijdens het eerste uitbraakseizoen (sep 2009 t/m aug 2010), maar circuleerde ook nog tijdens het tweede en derde uitbraakseizoen (sep 2010 t/m aug 2012). G5-NLD2 is in maart 2010 voor het eerst gevonden en is in het tweede en derde uitbraakseizoen de dominante bofvariant (Figuur 4).

Met de SH-typering is in 2013 voor 83 patiënten een typering uitgevoerd. Vijf personen (6,0%) hebben een infectie met een bofvirus dat niet tot genotype-G behoort (genotype -A, -J en -H). Opvallend is, dat het G5-NLD-sequentietype in 2013 weer domineert. Van de 78 personen met



**Figuur 3.** aanvragen voor bofdiagnostiek in 2013 per week.



**Tabel 2.** Overzicht van de bofdiagnostiekaanvragen bij Clb-IDS in 2013.

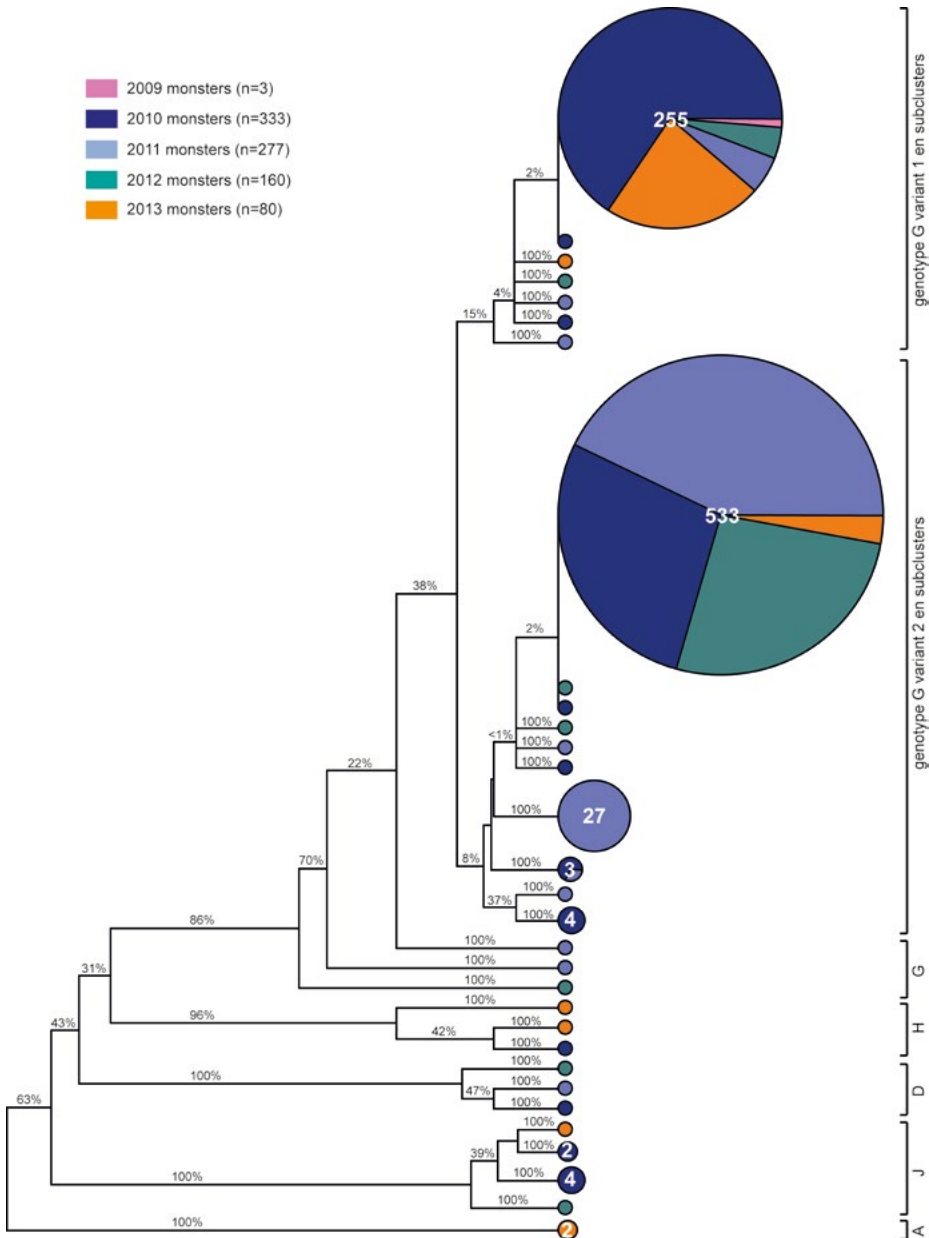
Monstertype	Test	Lab. inzendingen	Column1	GGD inzendingen	Column2
		Aantal monsters	Positief (%)	Aantal monsters	Positief (%)
Serum	IgM	20	2 (10%)	0	0
Speeksel	PCR	29	5 (17%)	180	58 (32%)
Keel/Neus/ Mond uitstrijk	PCR	286	30 (10%)	14	6 (43%)
Urine	PCR	103	6 (6%)	174	23 (13%)
Overig	PCR	11	3 (27%)	0	0 (0%)
Totaal	PCR	449	46 (10%)	368	87 (24%)

een bofvirus genotype-G-infectie, hebben 59 personen (75.6%) een infectie met G5-NLD1 en 16 personen (20.5%) een infectie met G5-NLD2. In drie personen (3.8%) zijn subvarianten van G5-NLD1 gevonden (Figuur 4). Ook bij de twee lokale uitbraken in Alkmaar en Volendam is het G5-NLD1 genotype vastgesteld (Figuur 4 en 5).

Uitbreiding van de bof typing met het fusiegen (F) levert belangrijke nieuwe informatie op. Het fusiegen codeert voor een oppervlakte-eiwit. Uit een eerste steekproef blijken mutaties in het F-gen aanwezig te zijn bij het sequentiotype uit 2013, vergeleken met het dominerende G5-NLD1-sequentiotype aan het begin van de bofuitbraak in 2010 en 2011. Verder blijken de F-gen sequenties uit 2013 te clusteren met de F-gen sequenties van G5-NLD2 uit 2010/2011. Sequenzen van additionele genen als het F-gen vergroot de resolutie van fylogenetische data. Daarnaast is het mogelijk om kleinere subclusters binnen de genotype-G-varianten te onderscheiden.

**Figuur 4.** UPGMA boom gebaseerd op de SH-gensequenties van 853 bofmonsters.

Percentages zijn de bootstrap waarden (1000x replicatie). Kleuren geven het jaar van klinische monsterafname weer. Het aantal personen per cluster is voor elk cluster in het wit weergegeven. Achter ieder cluster staat het bijbehorende genotype.





## Publicaties en referenties

- Opstelten W, Ruijs WLM, Warris A, van Binnendijk RS, Wolfs TFW and Hahné S. "Mazelen in Nederland". NTVG, 158, A6710(2013).
- Dorigo-Zetsma JW en van Binnendijk RS Mazelen: "De epidemie en het eradicatieprogramma". Ned.Tijdschr.Med.Microbiol. 21, 133-135(2013).
- Mollema L, Smits GP, Berbers GA, Van der Klis FR, van Binnendijk RS, de Melker HE, et.al. "High Risk of a Large Measles Outbreak Despite 30 Years of Measles Vaccination in the Netherlands." Epidemiol Infect, (2013): 1-9.
- Knol M, Urbanus A, Swart E, Mollema L, Ruijs W, van Binnendijk R, et.al. "Large Ongoing Measles Outbreak in a Religious Community in the Netherlands since May 2013." Euro Surveill 18, no. 36 (2013): pii=20580.
- Fanoy EB, Wolters BA, Topsakal V, van Binnendijk RS, van der Borden J, and Hahné SJ. "Three cases of hearing loss related to mumps during a nationwide outbreak in the Netherlands, 2009-2013". Ped.Inf.Dis.J., in press. (2014).
- Sane J, Gouma S, Koopmans M, de Melker H, Swaan C, van Binnendijk RS, et.al. "Emergence of mumps in vaccinated persons in the Netherlands, 2009-2012." Emerg Infect Dis [Internet]. 2014 Apr [date cited].<http://dx.doi.org/10.3201/eid2004.131681>.
- Gouma S, Sane J, Gijselaar D, Cremer J, Hahne S, Koopmans M, et.al. "Two Major Mumps Genotype G Variants Dominated Recent Mumps Outbreaks in the Netherlands (2009-2012)." J Gen Virol, (2014). <http://vir.sgmjournals.org/content/early/2014/03/06/vir.o.062943-o.long>

## Publicatielijst Cib-IDS 2013

De complete publicatielijst 2013 is beschikbaar op de website:  
[www.rivm.nl/publicatielijst-cibids-2013](http://www.rivm.nl/publicatielijst-cibids-2013)



.....

**Eindredactie**

Berry Overbeek | Ellen Stobberingh |  
Ingrid van de Pol

.....



[www.rivm.nl/cib](http://www.rivm.nl/cib)

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)

juni 2014