

Artikel

Bron- en contactonderzoek bij een *Mycobacterium bovis*-infectie

O. Akkerman, A. van der Zanden, D. Nijmeijer, K. van der Loo, R. Beldman, D. Bakker, D. van Soolingen, K. Kremer, B. Mulder

Een *Mycobacterium bovis*-infectie bij mensen kan verschillende oorzaken hebben. Directe overdracht van dier naar mens is mogelijk door geïnfecteerd vee, bijvoorbeeld door het drinken van ongepasteuriseerde melk (1) of door dieren in een dierentuin. (2) Zeldzamer is overdracht tussen mensen onderling. (3-5) In de periode 1993-2007 werden in Nederland 16.059 patiënten geregistreerd met kweekpositieve tuberculose (TB), waarvan 231 (1.44%) een *M. bovis*-infectie hadden. (6) Patiënten met een *M. bovis*-infectie hebben meestal extrapulmonale TB, slechts 35% heeft pulmonale TB. De meeste autochtone patiënten met een *M. bovis*-infectie zijn ouder dan 60 jaar, terwijl immigranten met een *M. bovis*-infectie meestal jonger zijn. (7) In dit artikel beschrijven we voor de eerste keer het gebruik van de IGRA (de Quantiferon-Gold *in tube* (QFT-GIT)) voor contactonderzoek in Nederland bij een jonge vrouw met TB, veroorzaakt door *M. bovis*.

Recent werd in onze regio een uitzonderlijk geval van TB gediagnosticeerd. Bij een autochtone, 23-jarige vrouw werd een pulmonale *M. bovis*-infectie aangetoond. De vrouw was als verpleegkundige werkzaam in een verpleeghuis en had anderhalf jaar klachten van chronisch productief hoesten. Van haar sputum waren zowel het Ziehl-Neelsenpreparaat positief, +4 volgens de schaal van Bronckhorst, als de PCR op *M. tuberculosis*-complex. De GGD startte een bron- en contactonderzoek op basis van het ringprincipe om eventuele andere geïnfecteerde patiënten te vinden en daardoor ook de mogelijke bron van de infectie. (8,9) Bij contactonderzoek en voor het aantonen van een latente infectie wordt al meer dan 100 jaar de tuberculinehuidtest (THT) gebruikt. De THT wordt gezet, via het principe van Mantoux, door intradermaal purified protein derivaat (PPD) tuberculine te injecteren. Het 'humane' PPD-tuberculine bestaat uit een ruw extract van antigenen van *M. tuberculosis* en bevat daardoor ook antigenen van andere, nauw verwante, leden van het *M. tuberculosis*-complex, die ook voorkomen in *M. bovis* Bacille Galmette-Guerin (BCG). (10) Sinds enkele jaren zijn er ook interferon-gamma release assays (IGRA's) beschikbaar voor het aantonen van een latente TB-infectie, terwijl steeds meer onderzoek laat zien dat deze ook voor het aantonen van een recente actieve infectie gebruikt kunnen worden. (11,12) Deze IGRA's zijn gebaseerd op de vorming van interferon-gamma door T-lymfocyten van besmette personen of dieren, na stimulatie met eiwitantigenen uit chromosomale region of difference 1 (RD1) van *M. tuberculosis*. Omdat het hierbij om specifieke antigenen gaat en niet om een mengsel van specifieke en niet-specifieke antigenen, zijn deze

assays specifiek voor het aantonen van infecties met bacteriën van het *M. tuberculosis* complex, waaronder *M. bovis*. Een uitzondering is de *M. bovis* BCG waarin het RD1-gebied en dus de genen voor deze specifieke eiwitantigenen in de IGRA's ontbreken. IGRA's tonen wel kruisreactie met enkele non-tuberculose mycobacteriën (NTM), waaronder *M. szulgai*, *M. marinum* en *M. kansasii*. (13,14) Een positieve THT kan ontstaan door vaccinatie met *M. bovis* BCG terwijl de IGRA negatief blijft. Een positieve THT ontstaan door een *M. bovis*-infectie geeft wel een positieve IGRA-uitslag. Hierdoor zijn IGRA's te gebruiken om onderscheid te maken tussen gevaccineerde en geïnfecteerde personen bijvoorbeeld in de gezondheidszorg of bij laboratorium medewerkers, die in het verleden (voor 1980) vaker BCG gevaccineerd werden dan de algemene populatie.

Casus

In oktober 2007 zagen we een 23-jarige vrouw met klachten van een anderhalf jaar bestaande chronische, productieve hoest, niet reagerend op meerdere antibioticumkuren en verminderde eetlust met gewichtsverlies van 10 kg. Er was geen sprake van nachtzweeten. Patiënte was niet bekend met TB en was niet in contact geweest met een TB-patiënt. Ze woont op een boerderij waar vee wordt gehouden, waaronder jaarlingen (pinken). Deze jaarlingen verblijven maximaal een half jaar op de boerderij voor de handel. Als kind was ze vaak op bezoek bij haar grootouders, die naast de boerderij woonden. In deze periode had ze contact met het vee. De laatste 10 jaar is ze niet meer in contact geweest met het vee op de boerderij. Verder heeft ze nooit een reis gemaakt naar een

TB-endemisch gebied. In haar vrije tijd gaat ze naar de lokale voetbalclub maar komt niet in de kantine. Ook gaat ze af en toe naar een regionale dierentuin. Op het moment dat ze klachten kreeg werkte ze in een verpleeghuis, waarop dat moment geen mensen met TB verbleven. In het verpleeghuis was niet bekend of er mensen in voorgaande jaren overleden waren aan TB en of er bewoners in het verleden TB hadden gehad. In het verpleeghuis wonen mensen die vooral in de textielindustrie werkzaam zijn geweest.

Bij lichamenlijk onderzoek zagen we een bleke vrouw met een tachycardie en erytheem op haar rug. Het laboratoriumonderzoek toonde een licht verhoogde bezinkingssnelheid van erythrocyten (BSE) van 22 (normaal <20) en een verhoogde C-reactive protein (CRP) van 45 mg/l (normaal 0-7½). De THT was 22 mm. De QFT-GIT was niet aangevraagd. De X-thorax en de CT-thorax toonden aan beide zijden nodulaire interstitiële afwijkingen met 2 kleine consolidaties in de rechter bovenkwab en een grote bulla in de linker bovenkwab. Het longfunctieonderzoek was normaal, afgezien van een licht verlaagde diffusiecapaciteit voor koolstofmonoxide (DLCO).

Er werd een bronchoscopie verricht en histopathologisch onderzoek van de linker bovenkwab toonde een granulomateuze ontsteking aan. Zowel de ZN-kleuring als de PCR voor *M. tuberculosis*-complex van de bronchoalveolaire lavage (BAL) waren positief.

De conventionele behandeling, isoniazide, rifampicine, ethambutol en pyrazinamide, voor pulmonale TB werd gestart. De uitslag van de kweek van de BAL duurde 2 maanden en toonde groei van *M. bovis*. Na het bekend worden van de kweekuitslagen met *M. bovis*, die natuurlijke resistentie heeft tegen pyrazinamide, werd de behandeling met zowel pyrazinamide als ethambutol gestaakt.

Contactonderzoek

Naar aanleiding van de positieve ZN en PCR van *M. tuberculosis*-complex startte de GGD een contactonderzoek volgens het ringprincipe. Hierbij werd gebruik gemaakt van de THT en indien nodig een tweede ronde THT. De THT-resultaten werden geïnterpreteerd volgens de Nederlandse richtlijnen. (7) Bij een positieve THT werd een aanvullende QFT-GIT-bepaling verricht. QFT-GIT-resultaten in ons laboratorium zijn positief als ze groter dan 0.35 U/ml zijn, dubieus tussen de 0.20 en 0.35 U/ml en negatief indien kleiner dan 0.20 U/ml (15). De contacten van de indexcasus werden verdeeld in ringen. De 1ste en 2de ring werden tegelijkertijd onderzocht. Door het hoge aantal positieve THT-uitslagen in de 1ste en 2de ring werd besloten ook de 3e ring te onderzoeken. Ring 1 bevatte 74 personen, bestaande uit familie en directe collega's.

Van hen hadden 24 een positieve THT-uitslag. Van deze 24 hadden 7 een positieve QFT-GIT-uitslag, 3 een dubieuze uitslag en 10 hadden een negatieve QFT-GIT-uitslag. Vier van de 24 personen werden niet onderzocht met een QFT-GIT. Ring 2 bestond uit 31 collega's die minder contact hadden met de patiënt. Zeven van hen hadden een positieve THT. Daarvan hadden 5 een negatieve QFT-GIT en waren 2 niet gescreend. Ring 3 bestond uit 30 collega's welke in andere gebouwen van het verpleeghuis werkten. Hiervan hadden 2 een positieve THT. Eén van de 2 personen had ook een positieve QFT-GIT en de ander had een negatieve uitslag. De persoon met de positieve QFT-GIT had nooit contact gehad met onze patiënte. (Tabel 1)

Tabel 1 Contactonderzoek ring 1 t/m 3

Ring	Gescreende mensen	Positieve THT	Positieve QFT-GIT (%)	Dubieuze QFT-GIT (%)	Negatieve QFT-GIT (%)
1	74	24	7 (29)	3 (13)	10 (42)
2	31	7	0 (0)	0 (0)	5 (71)
3	30	2	1 (50)	0 (0)	1 (50)

Aanvullend QFT-GIT-onderzoek werd alleen gedaan bij mensen met een positief THT- resultaat. Percentages zijn ten opzichte van mensen met een positief THT- resultaat. De percentages zijn afgerond waardoor het totaal niet 100% kan zijn.

De bewoners van het verpleeghuis, met wie de patiënte werkte, werden ook onderzocht vanwege de ontstane onrust. Gezien hun leeftijd en de daarbij behorende hoge prevalentie van TB werden zij alleen onderzocht met een QFT-GIT. In totaal werden 40 personen gecontroleerd. Drie van hen hadden een positief resultaat, 3 een dubieus resultaat en 34 een negatief resultaat. Van alle in het contactonderzoek ingesloten personen vertoende niemand tekenen van actieve TB. De personen uit de eerste 3 ringen met een positieve QFT-GIT-uitslag werden 6 maanden behandeld met Isoniazide volgens de richtlijn *Behandeling Latente Tuberculose infectie*. (16) De bewoners van het verpleeghuis met een positieve uitslag van de QFT-GIT werden niet behandeld. De huisarts werd geïnformeerd en erop gewezen om extra alert te zijn bij klachten die kunnen passen bij actieve TB.

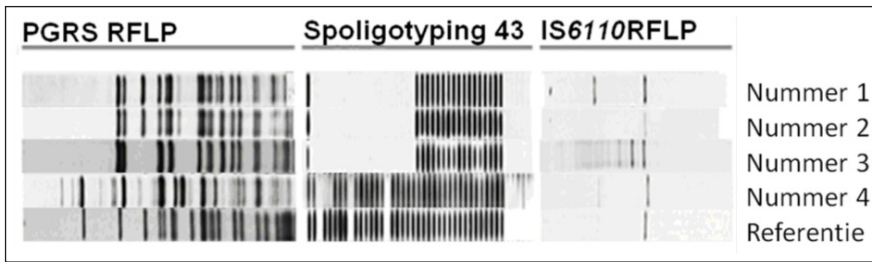
Onderzoek van de veestapel voor bovine TB

Conform het overheidsbeleid in geval van (mogelijk) tuberculose bij dieren werd vervolgonderzoek gedaan naar bovine TB bij de jaarlingen op de boerderij van de familie van de indexpatiënte. Dit onderzoek werd verricht ondanks het feit dat de patiënte al meer dan 10 jaar geen contact meer had gehad met de veestapel op de boerderij en ondanks het feit dat de jaarlingen ieder half jaar de boerderij verlieten. De THT's waren negatief bij alle dieren, op één na. Dit dier werd geëuthanaseerd voor sectie. Bij deze sectie werden geen aanwijzingen voor een TB-infectie gevonden en ook na 6 maanden was de kweek voor het aantonen van *M. bovis* negatief.

Genotypering van het isolaat van het sputum van de patiënt

Sinds 1993 vindt van alle *M. tuberculosis*-complexisolaten van patiënten in Nederland genotypering plaats binnen het handvest van de nationale surveillance van tuberculoseprojecten en om het contactonderzoek te ondersteunen. Patiënten met isolaten met identieke DNA fingerprints worden doorgegeven aan de GGD, die mogelijke (epidemiologische) verbanden tussen deze patiënten onderzoekt. (17) Op alle isolaten werd IS6110 restrictie fragment lengte polymorfisme (RFLP)-typering verricht en bij minder dan 5 kopieën van IS6110 vindt ook RFLP-typering met polymorfe GC-rijke sequenties (PGRS) plaats. Op verzoek wordt spoligotypering verricht. (18-21).

Om een mogelijke menselijke overdracht van de infectie te onderzoeken, werd genotypering van de geïsoleerde stam van onze patiënte verricht met IS6110 RFLP. Het IS6110 RFLP-patroon liet 2 banden zien, waarvan één met een grootte van 1.9 kb,



Figuur 1 Vergelijking van, PGRS- RFLP- en spoligotypering IS6110 RFLP-patronen van *M. bovis*-isolaten van 4 Nederlandse patiënten en van de referentiestam *M. bovis* BCG-P3.

Nummer 1 geeft de DNA-fingerprintsresultaten van het *M. bovis*-isolaat van de indexpatiënte weer. Nummers 2,3 en 4 zijn patiënten waarbij een *M. bovis* is geïsoleerd. Nummers 1 en 2 hebben een vrijwel identiek PGRS-RFLP-patroon, namelijk groter dan 96% overeenkomst, en deze 2 stammen komen voor 85% overeen met nummer 3. De 3 isolaten zijn identiek in de spoligotypering maar zijn verschillend in de IS6110 RFLP. Nummer 4 heeft een ander PGRS-RFLP- en spoligopatroon dan de andere isolaten maar heeft een IS6110 RFLP-patroon identiek aan dat van nummer 1. Referentie is een *M. bovis* BCG-referentiestam

hetgeen karakteristiek is voor *M. bovis*. (20) Vanwege dit resultaat werd ook de PGRS-RFLP-typering verricht. Gezien de interesse in deze casus werd aanvullend ook spoligotypering uitgevoerd. Na vergelijking met alle IS6110/PGRS-RFLP-patronen van *M. tuberculosis*-complexisolaten sinds 1993 uit de Nederlandse databank, bleek dat de combinatie van de fingerprintresultaten van het isolaat van onze patiënte uniek was. (Figuur 1). Er was één IS6110/RFLP-patroon in de database met 2 IS6110-banden die identiek was aan het IS6110 /RFLP-patroon van het isolaat van onze patiënte, maar de PGRS-RFLP- en spoligotyperingresultaten van de betreffende stam waren heel verschillend. Verder was er 1 isolaat dat qua PGRS-RFLP vrijwel identiek was aan het isolaat van onze patiënte en een spoligopatroon had dat 100% identiek was. (Figuur 1) Deze *M. bovis*-stam werd geïsoleerd bij een 69-jarige patiënt van Nederlandse afkomst, waarvan men dacht dat hij een reactivatie ondervonden had van een infectie die hij lang geleden had opgelopen door het drinken van geïnfecteerde melk. Gezien de typeringsresultaten werd een verband tussen onze patiënte en deze 69-jarige patiënt, of mogelijk een nooit geïdentificeerde bewoner van het verpleeghuis, aannemelijk bevonden.

Discussie

Sinds 1999 is de veestapel in Nederland officieel vrij van bovine TB. Af en toe zijn er kleine uitbraken van bovine TB in rundvee of dieren in een dierentuin. (22,23) Ondanks het (erg) lage risico op een bovine TB-infectie werd een jonge Nederlandse vrouw gediagnosticeerd met een *M bovis*-infectie. Ondanks uitgebreid onderzoek kon de bron van deze *M.bovis*-infectie niet worden aangetoond. Transmissie via dieren was erg onwaarschijnlijk. Er kon geen verband worden gevonden tussen de *M. bovis*-infectie van onze patiënte en de veestapel van de boerderij waar zij woonde. Het vee dat in de periode van onze eerste contacten met de patiënte op de boerderij was werd getest op bovine TB met behulp van de huidtest. Er waren bij de veterinaire inspectie geen gegevens bekend over met TB geïnfecteerd vee op deze boerderij. De patiënte bezocht regelmatig dezelfde dierentuin en had de infectie ook via de daar aanwezige dieren kunnen opgelopen. Echter de betreffende dierentuin was de laatste 20 jaar niet geassocieerd met bovine TB. Uit het contactonderzoek bleek dat geen van de onderzochte

contacten met een positieve THT- of QFT-GIT-resultaat verschenen had van actieve TB. Hierdoor kon ook geen bron van de infectie onder hen gevonden worden. Voor verder onderzoek werden de DNA fingerprints van het *M. bovis*-isolaat van de patiënte vergeleken met DNA fingerprints van *M. tuberculosis*-complexstammen uit de de Nederlandse databank. Hierin kon geen 100% match gevonden worden.

Door de sterke overeenkomst tussen de DNA fingerprints van het isolaat van onze casus en die van een oude Nederlandse patiënt uit de databank werd deze patiënt als bron mogelijk geacht. Dit uitsluitend op grond van de DNA-fingerprintgegevens van PGRS-RFLP, want er kon geen epidemiologisch verband worden aangetoond. Ook zou onze patiënte nog geïnfecteerd kunnen zijn in het bejaardentehuis door een niet-geïdentificeerde *M. bovis*-bron. Als laatste mogelijkheid blijft, ons inziens, het drinken van onpasteuriseerde melk over. In de gebieden waar zij woont, wordt namelijk de melk nog frequent zo gedronken.

Conclusie

Bron- en contactonderzoek bij een *M. bovis* infectie blijft zinvol. De huidige tendens in Nederland is om mensen met een positieve THT en een negatieve QFT-GIT nog niet preventief te behandelen met isoniazide. Bij deze populatie wordt voorlopig een afwachtend beleid gevoerd. Echter bij mensen met zowel een positief THT als een positief QFT-GIT-resultaat wordt behandeling voor latente TB geadviseerd.

In onze casus werd direct na de diagnose van pulmonale TB, bij verdenking op een *M. tuberculosis*-infectie gestart met contactonderzoek. Twee maanden later, na het bekend worden van de kweken, bleek de pulmonale TB te berusten op een *M. bovis*-infectie. Doordat contactonderzoek met zowel de THT als de QFT-GIT werd verricht, kunnen we de resultaten van deze 2 testen vergelijken. In de beschreven casus zijn 6 personen met een positief THT-resultaat niet getest met de QFT-GIT. Zoals beschreven in tabel 1 waren er bij de mensen met een positieve THT-uitslag, die wel getest waren met een QFT-GIT, hoge percentages negatieve QFT-GIT-uitslagen. Deze resultaten ondersteunen de theoretisch hogere specificiteit van de QFT-GIT voor een *M. bovis*-infectie zoals de QFT-GIT in geval van *M. tuberculosis*-infecties. (10,11). Hierdoor is de QFT-GIT in dit contactonderzoek ook bruikbaar gebleken als methode om te screenen bij bron- en contactonderzoek rondom een patiënt met *M. bovis*.

Auteurs

O. Akkerman¹, A. van der Zanden², D. Nijmeijer³, K. van der Loo⁴, R. Beldman⁴, D. Bakker⁵, D. van Soolingen^{6,7}, K. Kremer⁶, B. Mulder²

- ¹ Afdeling longziekten, Medisch Spectrum Twente, Enschede
- ² Laboratorium microbiologie Twente Achterhoek, Enschede
- ³ Afdeling Longziekten, Streekziekenhuis Koningin Beatrix, Winterswijk
- ⁴ Afdeling tuberculosebestrijding, GGD Gelre-IJssel, Apeldoorn/Doetinchem
- ⁵ Afdeling bacteriologie en TSE's, Central Veterinary Institute, Lelystad
- ⁶ Tuberculose Referentie Laboratorium, Cib, RIVM, Bilthoven
- ⁷ Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen

Correspondentie:

O. Akkerman | onnoakkerman@gmail.com

Literatuur

1. Griffith AS. Bovine tuberculosis in man. *Tubercle* 1937; 18: 529-543
2. Smith RM, Drobniewski AF, Gibson JD et al. *Mycobacterium bovis* infection, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10:539-541.
3. Sunder S, Lanotte P, Godreuil S et al. Human-to-Human Transmission of Tuberculosis Caused by *Mycobacterium bovis* in Immunocompetent Patients. *J. Clin. Microbiol* 2009, Vol. 47 (4):1249-1251
4. Evans, JT, Smith EG, Banerjee A et al. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. *Lancet* 2007; 369:1270-1276
5. Blazquez J, de Los Monteros LEE, Samper S, et al. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus-positive patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35:1390-1393.
6. Erkens CGM, Kalisvaart NA, Slump E, Sebek M, van Soolingen D. Tuberculose in Nederland 2007. *Surveillancerapport, KNCV Tuberculosefonds, Den Haag jan 2009. ISBN nr 978-90-77865-09-5*
7. Majoor CJ, Magis-Escurra C, van Ingen J, Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in The Netherlands from 1993-2007. Accepted for publication *Emerging Infectious Diseases*
8. Veen J. 1992. Microepidemics of tuberculosis: the stone-in-the-pond principle. *Tuber Lung Dis* 73(2):73-6.
9. Richtlijn Tuberculose contactonderzoek 2006, KNCV/CPT 10. <http://www.ssi.dk>
11. Menzies D, Pai M, Comstock G. Meta-analysis: New Tests for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: Areas of Uncertainty and Recommendations for Research. *Ann Intern Med.* 2007;146:340-354.
12. Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic Review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. *Ann Intern Med.* 2008;149:177-184.
13. Andersen P, Munk ME, Pollock JM et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *Lancet* 2000 Sep 23;356(9235):1099-104.
14. van Ingen J, de Zwaan R, Dekhuijzen R et al. Region of difference 1 in nontuberculous *Mycobacterium* species adds a phylogenetic and taxonomical character. *J Bacteriol.* 2009 Sep;191(18):5865-7.
15. <http://www.cellestis.com>
16. Richtlijn Behandeling Latente Tuberculose Infectie 2006, KNCV/CPT.
17. Lambregts-van Weezenbeek CS, Sebek MM, van Gerven PJ et al. Tuberculosis contact investigation and DNA fingerprint surveillance in The Netherlands: 6 years' experience with nation-wide cluster feedback and cluster monitoring. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003 Dec;7(12 Suppl 3):S463-70.
18. van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol.* 1993 Feb;31(2):406-9.
19. Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R et al. 1999. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J. Clin. Microbiol.* 37:2607-2618.
20. Otal I, Gomez AB, Kremer K et al. Mapping of IS6110 insertion sites in *Mycobacterium bovis* isolates in relation to adaptation from the animal to human host. *Vet Microbiol.* 2008 Jun 22;129(3-4):333
21. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997 Apr;35(4):907-14
22. Leerboek der Tuberculosebestrijding, 13e druk. Koninklijke Nederlandse Centrale Vereniging tot Bestrijding der Tuberculose. 's Gravenhage 1984.
23. Veling J, Verhoeff J, Bosch JC et al. An outbreak of bovine tuberculosis on a dairy farm. *Tijdschr Diergeneeskd.* 1993 Sep 1;118(17):541-4.