

Nieuwe tbc-laboratoriumdiagnostiek in aantocht

De tbc-laboratoriumdiagnostiek schakelt waarschijnlijk al eind 2018 over op 'whole genome sequencing' van *Mycobacterium tuberculosis* complex isolaten. Dat is op diverse fronten een grote stap vooruit voor de tbc-bestrijding, zo blijkt uit de resultaten van een onderzoeksproject bij het RIVM.

Sinds begin 2016 onderwerpt het RIVM alle binnenkomende *M. tuberculosis* complex isolaten aan 'whole genome sequencing' (WGS), in aanvulling op routinediagnostiek en VNTR-typering. Het gaat om een onderzoeksproject dat we al in december 2015 in dit tijdschrift bespraken (1). We beschrijven nu de vorderingen van het project in 2016/2017 en de gevolgen voor de laboratoriumdiagnostiek van tuberculose.

De WGS-techniek

De term whole genome sequencing betekent letterlijk het vaststellen van de volgorde van het gehele DNA, ofwel genoom. DNA bestaat uit dubbele strengen van de moleculen cytosine (C), guanine (G), adenine (A) en thymine (T). Deze zogenoemde nucleobasen zijn in DNA steeds paarsgewijs gekoppeld, C in de ene streng met G in de andere, en A met T. In de volgorde van de basenparen ligt de complete genetische informatie van een organisme besloten.

Nadat het DNA van de tbc-bacterie uit vloeibare kweken is geïsoleerd en gezui-

verd, wordt het gefragmenteerd en voorzien van 'adapters' die de gefragmenteerde stukjes DNA van elkaar kunnen onderscheiden. Daarna is de volgorde van de 4,4 miljoen baseparen volledig in kaart te brengen. De tot nu toe gebruikte methoden brengen alleen stukjes van het DNA in beeld. De

WE BRENGEN HET COMPLETE DNA VAN DE TBC-BACTERIE IN KAART

RFLP-typering ('restriction fragment length polymorphism'; tot 2009 in gebruik) was technisch moeilijk en vergde een wekenlange kweektijd. Daarop volgde de tot op heden toegepaste VNTR-typering ('variable number of tandem repeat'): makkelijker, sneller en met meer resultaten (2).

Gebruik van DNA-typering

Typering van *M. tuberculosis* isolaten is

bedoeld om een dermate specifieke 'DNA fingerprint' te verkrijgen dat de verspreiding van tuberculose kan worden gemonitord. Als bij VNTR-typering een patroon tweemaal of meer wordt gevonden, is er sprake van een cluster en onderzoeken sociaal verpleegkundigen tbc-bestrijding van de GGD'en of er een epidemiologisch verband kan worden vastgesteld tussen de geclusterde cases ('clusteronderzoek'). Isolaten die in de DNA-fingerprinting in Nederland niet eerder zijn voorgekomen worden 'uniek' genoemd.

WGS nauwkeuriger

In een WGS-analyse vergelijken we alle stukjes DNA (de 'reads') met een referentiestam van *M. tuberculosis* om de mutaties in kaart te brengen. Met WGS worden de genetische afstanden tussen isolaten nog nauwkeuriger bepaald. Een verschil van 12 of minder mutaties/SNP's ('single nucleotide polymorphisms') is een voorspellende maat voor een epidemiologisch verband tussen patiënten.

LEES VERDER >>

Onderzoek isolaten 2016

In het WGS-project zijn de *M. tuberculosis* isolaten van in 2016 vastgestelde patiënten zowel met VNTR als met WGS getypeerd. De GGD'en hebben – volgens de huidige praktijk – op basis van de VNTR het clusteronderzoek verricht. Het resultaat daarvan (wel of niet een epidemiologisch verband bevestigd) werd door GGD'en aangeleverd voor patiënten die in 2016 met een andere patiënt in 2016 clusterden. Patiënten die in de VNTR clusterden met patiënten vóór 2016 werden in dit onderzoek niet meegenomen omdat van de patiënten voor 2016 geen WGS bekend was.

Resultaten

In 2016 werden er 535 *M. tuberculosis* isolaten met VNTR en WGS getypeerd (zie Tabel). In de VNTR clusterden er 289 (54%), waarvan 134 met een ander isolaat in 2016 en 155 met een isolaat vóór 2016; 246 (46%) waren uniek. Het percentage geclusterde isolaten in 2016 was op grond van WGS veel lager dan op basis van VNTR (14% versus 25%).

Van de 68 patiënten die zowel in VNTR als WGS clusterden werd bij 39 (57%) een epidemiologische link bevestigd, terwijl van de 66 patiënten die alleen in de VNTR clusterden, slechts bij twee een epi-link werd aangetoond. Na her-analyse bleek dat de WGS-data van een van deze twee isolaten van slechte kwaliteit waren (3). Daarnaast toonde WGS bij acht isolaten clustering aan (drie clusters) die niet in de VNTR-typering werd gevonden; vijf van deze gevallen leken op basis van de geografische herkomst van de patiënt en de infectieuze vorm van tuberculose (pulmonale tuberculose) aan elkaar gerelateerd. De VNTR-patternen van de isolaten van deze acht patiënten waren niet identiek, maar wel sterk gelijkend. De conclusie van dit onderzoek

is dat WGS een veel hoger onderscheidend vermogen (resolutie) onder *M. tuberculosis* isolaten biedt dan de VNTR-typering.

Efficiënter onderzoek transmissie

In 2018 zullen als onderzoekspilot naast de VNTR-resultaten ook de WGS-data aan de GGD'en verstrekt worden. Indien deze pilot gunstig verloopt, kan eind 2018 gestopt worden met de VNTR-typering.

IN WGS KUNNEN 23 RESISTENTIEGENEN TEGELIJKERTIJD WORDEN ONDERZOCHT

De invoering van WGS zal in de praktijk betekenen dat GGD'en nog maar in veel minder dan de helft van de tbc-gevallen meldingen van clustering zullen ontvangen en dat ze bij ruim de helft van deze WGS-clusterende gevallen een epidemiologisch verband zullen bevestigen. WGS zal dus de efficiency van het onderzoek van GGD'en naar transmissie doen toenemen.

Voorspellen van resistentie

In de afgelopen decennia zijn DNA-technieken ontwikkeld om in het genoom van *M. tuberculosis* mutaties aan te tonen die geassocieerd zijn met resistentie. Meest bekend zijn de 'reverse line blot'-testen, de GeneXpert en het sequencen van bepaalde hotspots van resistentiegenen. Vergelijken met fenotypische resistentieprofielen bieden deze testen voor isoniazide- en rifampicine-mutaties een hoge positieve en negatieve voorspellende waarde. Met de huidige generatie DNA-testen voor het aantonen van resistentie kunnen echter

slechts een beperkt aantal resistentiemutaties worden aangetoond. In WGS kunnen 23 resistentiegenen tegelijkertijd worden onderzocht op aanwezigheid van alle soorten mutaties (4), hoewel negen genen het meest informatief zijn voor de eerstelijns-middelen isoniazide, rifampicine, pyrazinamide en ethambutol.

Internationale WGS-studie

Het RIVM heeft deelgenomen aan een internationale WGS-studie vanuit de Oxford Universiteit, waarbij 10.225 *M. tuberculosis* isolaten uit 16 landen zijn geanalyseerd. Er is hierbij apart gekeken naar de voorspellende waarde van WGS voor resistentie voor een verzameling isolaten uit landen met veel resistentie en landen zoals Nederland met een lage prevalentie (ongeveer 10%) van resistentie. De categorische overeenkomst tussen WGS en fenotypische resistentiebepalingen bedroeg 98,7 procent. De negatieve voorspellende waarde was 99,8 procent voor alle eerstelijnsmiddelen. Uit deze studie blijkt dus dat wanneer er geen mutaties aanwezig zijn in de negen resistentiegenen we met zoveel zekerheid kunnen voorspellen dat de bacteriën gevoelig zijn voor de eerstelijnsmiddelen dat een fenotypische resistentiebepaling voor deze isolaten niet meer nodig is. Dit zal in Nederland betekenen dat er geen fenotypische resistentiebepaling meer nodig is voor 80 tot 90 procent van de kweken. Indien er zich in één van de negen resistentiegenen wel een mutatie bevindt, is nader onderzoek nodig met fenotypische resistentiebepalingen. Dit kan dan op een gerichte wijze gedaan worden aan de hand van de aangetroffen mutaties.

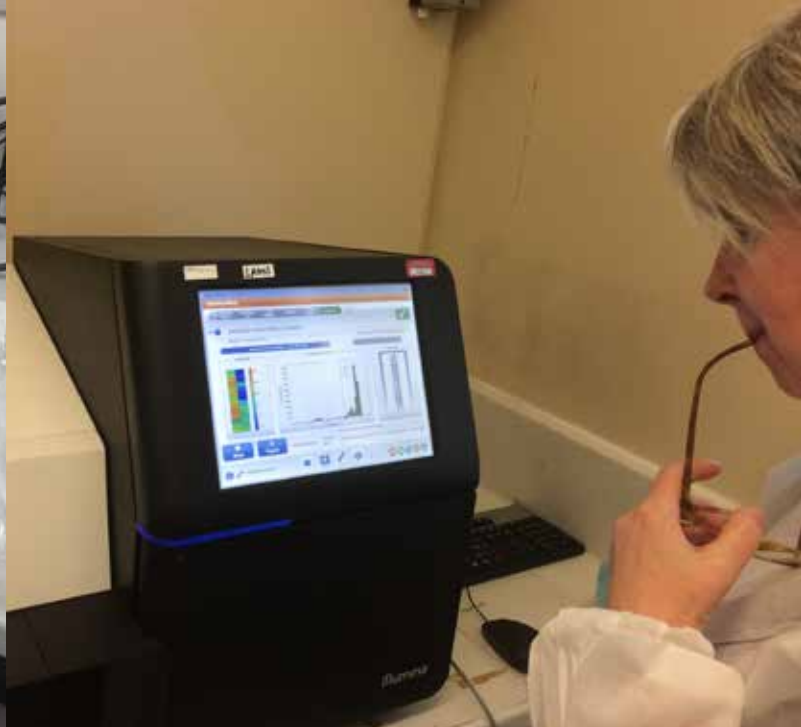
Identificatie van (sub)species

Tuberculose bij de mens wordt meestal veroorzaakt door *M. tuberculosis*, maar kan

TABEL.
De mate van clustering van 535 *M. tuberculosis* isolaten op basis van VNTR en WGS

	VNTR-clustering in 2016	VNTR-clustering vóór 2016 of uniek	totaal
WGS clustering*	68	8	76 (14%)
WGS uniek	66	393	459 (86%)
totaal	134 (25%)	155+246=401 (75%)	535

* gebaseerd op ≤ 12 SNP's (single nucleotide polymorphisms) verschil tussen *M. tuberculosis* isolaten



De cupjes (foto links) bevatten de DNA-extracties voor het sequencen. In het sequence-apparaat (foto rechts) kunnen gelijktijdig 15 samples gesequenced worden (+ nog 1 controle = 16); het sequencen duurt 25 uur.

(Fotografie: Gerard de Vries)

ook worden veroorzaakt door bijvoorbeeld *M. bovis*, *M. africanum* of meer uitzonderlijke (sub)species zoals *M. microti*. Zowel voor de epidemiologie als voor de behandeling van tuberculose is het belangrijk om *M. tuberculosis* complex isolaten nauwkeurig te identificeren. De huidige identificatie is veelal gebaseerd op de reverse line blot-methode, hoewel er ook home-made testen zijn om op grond van DNA-poly-morfisme de (sub)species te herkennen. In nauwe samenwerking met de Oxford Universiteit werd een nieuw algoritme ontwikkeld om aan de hand van een breed panel aan karakteristieke verschillen in het DNA met WGS alle (sub)species op een meer betrouwbare wijze te herkennen.

Conclusie

Hoewel de validatie voor praktische toepassing van WGS nog in volle gang is en er vooral wat betreft de analyse van

WGS-data nog verdere optimalisatie zal plaatsvinden, groeien we snel toe naar een situatie waarin WGS een aantal laboratoriumtechnieken kan vervangen.

WGS levert een nauwkeurige identificatie

DE IMPLEMENTATIE VAN DE NIEUWE BENADERING IS IN VOLLE GANG

op van de (sub)species in het *M. tuberculosis* complex, kan de gevoeligheid voor tbc-medicijnen op zeer betrouwbare wijze voorspellen en levert een typering met een hogere specificiteit voor epidemiologisch onderzoek. De implementatie van deze nieuwe benadering is in volle gang. De

verwachting is dat de volledige overschakeling naar WGS kan plaatsvinden aan het einde van 2018. ■

Literatuur

1. Van Soolingen D, de Neeling H, Soetens, van der Hoek W, de Vries G. Onderzoek naar de toepassing van 'whole genome sequencing' van *Mycobacterium tuberculosis*. Tegen de Tuberculose. 2015;111(3):3-6.
2. Supply P, Allix C, Lesjean S, et al. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2006;44(12):4498-510.
3. Jajou R, de Neeling A, van Hunen R, et al. Epidemiological links between tuberculosis cases identified twice as efficiently by whole genome sequencing than conventional molecular typing: A population-based study. PLoS ONE. 2018;13(4):e0195413.
4. Walker TM, Kohl TA, Omar SV, et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. Lancet Infect Dis. 2015;15(10):1193-202.

BERICHTEN

Apeldoorn

Op 15 januari is **Marrit Broersma** gestart als sociaal verpleegkundige bij de afdeling tbc-bestrijding van de GGD Noord- en Oost-Gelderland.

Rotterdam

Annebet de Groot werkt sinds 16 maart 2018 bij de GGD Rotterdam-Rijnmond als sociaal verpleegkundige tbc-bestrijding.

Utrecht

Half januari 2018 is **Marrit Broersma** gestopt als sociaal verpleegkundige tbc-bestrijding bij de GGD regio Utrecht.