

**Dick van Soolingen**  
hoofd Tuberculose Referentie Laboratorium, IDS, RIVM en  
hoogleraar Medische Microbiologie  
Radboud Universiteit Nijmegen

**Han de Neeling**  
Tuberculose Referentie Laboratorium, IDS, RIVM  
**Loes Soetens**  
promovenda, EPI, RIVM en  
Radboud Universiteit Nijmegen

**Wim van der Hoek**  
hoofd afdeling Respiratoire Infecties, EPI, RIVM  
**Gerard de Vries**  
coördinator tbc-bestrijding Nederland, LCI, RIVM en KNCV Tuberculosefonds

# Onderzoek naar de toepassing van 'whole genome sequencing' van *Mycobacterium tuberculosis*

Vanaf begin jaren negentig van de vorige eeuw is een nieuwe techniek in de tbc-bestrijding geïntroduceerd om overdracht van tuberculose te onderzoeken, namelijk DNA-fingerprinting. Aanvankelijk met behulp van RFLP-typering, die in 2009 werd vervangen door de VNTR-typering. Nu dient zich een nieuwe en veelbelovende techniek aan: 'whole genome sequencing' (WGS). De komende vier jaar gaat het RIVM, samen met betrokkenen in de tbc-bestrijding, de toepassing van WGS onderzoeken. Dit artikel beschrijft de huidige stand van zaken en de uitdagingen die ons wachten bij deze grote stap vooruit.

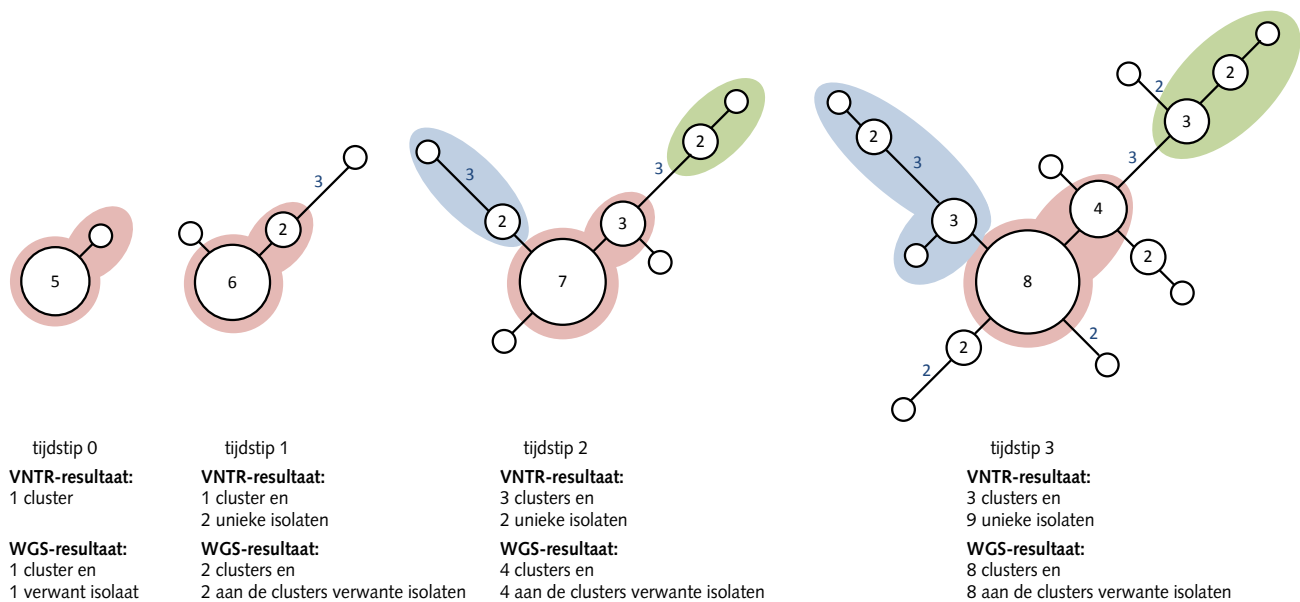
Met de ontdekking van repeterende DNA-sequenties in het genoom van *Mycobacterium tuberculosis* in de jaren negentig van de vorige eeuw konden DNA-fingerprintmethoden ontwikkeld worden die een enorme variatie onder deze bacteriën zichtbaar maakten. De eerste techniek waarmee het DNA-polymorfisme onder *M. tuberculosis*-isolaten gevisualiseerd werd, was 'restriction fragment length polymorphism' (RFLP) typering. Deze techniek leverde een veelheid aan polymorfe bandenpatronen, maar het laboratoriumwerk en de analyse waren technisch moeilijk uitvoerbaar. Tevens was er dermate veel DNA nodig dat de bacteriën wekenlang gekweekt dienden te worden, hetgeen de doorlooptijd van deze techniek niet bepaald ten goede kwam. De invoering van 'variable number of tandem repeat' (VNTR) typering leverde een verbetering in de uitvoerbaarheid, een verkorting in de doorlooptijd en ook meer onderscheidend vermogen op. Verder is de clustering van gevallen op grond van VNTR-typering beter in overeenstemming met bevindingen in de praktijk aangaande epidemiologische links. Deze techniek is tot op heden de gouden standaard.

## Beperkingen

Al heeft DNA-fingerprinting veel basale kennis geleverd over de epidemiologie van tuberculose en over de fylogenie van het *M. tuberculosis* complex, toch kennen de RFLP- en VNTR-typeringen hun beperkingen. Het onderscheidend vermogen tussen *M. tuberculosis*-stammen is wel groot, maar de DNA-fingerprints veranderen dermate langzaam dat clusters van patiënten in de loop van de tijd sterk gegroeid zijn. Daardoor zijn primaire, secundaire en volgende verspreidingsbronnen in een cluster nauwelijks meer te onderscheiden.

## Whole genome sequencing

In 2011 rondde Anita Schürch bij het RIVM een promotieonderzoek af, waaruit bleek dat WGS veel meer onderscheid levert dan RFLP- en VNTR-typering (1). Vervolgens is samen met de GGD Amsterdam onderzoek gedaan naar de stabiliteit van het genoom van *M. tuberculosis*. Daaruit bleek dat er gemiddeld 0,36 mutaties per genoom per jaar ontstaan, wat veel belooft voor de mogelijkheid om afzonderlijke transmissieketens in RFLP- en VNTR-clusters te onderscheiden (2). Inderdaad werden in het grote Harlingen-cluster diverse transmissieketens onderschei-



**Figuur 1. Ontwikkeling van DNA-fingerprintclusters in de tijd**

Theoretische voorstelling van de interpretatie van de resultaten van VNTR-typering en whole genome sequencing, op basis van zich in de tijd ontwikkelende DNA-fingerprintclusters. De nummers in de cirkels geven het aantal *M. tuberculosis*-isolaten weer in de clusters. De met kleuren verbonden cirkels geven enkelvoudige VNTR-clusters weer. De nummers langs de verbindingsstreepjes tussen de cirkels geven het aantal mutaties verschil aan tussen *M. tuberculosis*-isolaten.

den aan de hand van WGS-data (3). In Groot-Brittannië zijn inmiddels diverse epidemiologische studies afgerond met WGS als typering (4). Tevens zijn er artikelen verschenen over het gebruik van WGS om de (sub)species van *M. tuberculosis* complex te herkennen (5) en om alle mutaties die geassocieerd zijn met resistentie tegen tbc-medicijnen te traceren (6).

### Promotieonderzoek

Deze overwegingen leveren de basis om vanaf 2016 een vierjarig promotieonderzoek te starten om de kenmerken van WGS verder te onderzoeken, alvorens deze techniek in te voeren voor structurele toepassing op het gebied van identificatie, resistentieonderzoek en epidemiologische typering van isolaten van *M. tuberculosis* complex. In deze onderzoeksperiode blijft de gestandaardiseerde VNTR-typering

gehandhaafd, om de dagelijkse praktijk van GGD'en niet te compliëren. Het promotieonderzoek is een samenwerking tussen de afdelingen Epidemiologie en Surveillance van Infectieziekten (EPI), Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS) en Landelijke Coördinatie Infectieziektebestrijding (LCI) van het RIVM en KNCV Tuberculosefonds. De GGD'en zullen benaderd worden voor hun participatie.

### Standaardisering

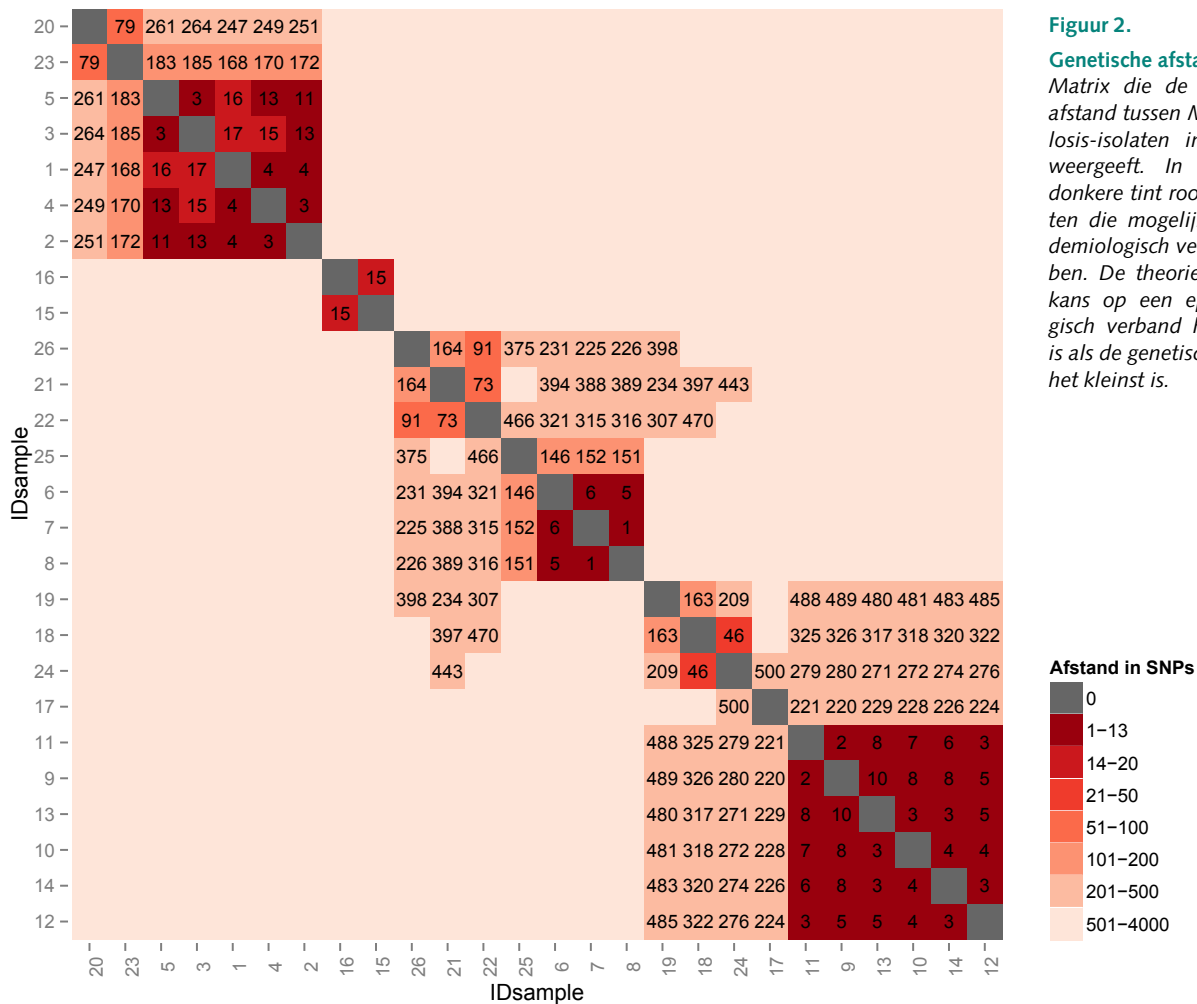
Vragen die zich bij het nieuwe project aandienen zijn bijvoorbeeld: welk deel van het genoom dient buiten de analyse gehouden te worden vanwege aanwezigheid van complexe repeterende structuren? Welke software kan het beste gebruikt worden voor de analyse? Hoe kan de reproduceerbaarheid van WGS en de analyse hiervan worden aangetoond? En hoe wordt

de grote hoeveelheid data het beste opgeslagen?

Er zal in de komende tijd een afstemming plaatsvinden met de landen waarin men de meeste kennis heeft opgedaan met WGS van *M. tuberculosis*, zoals Engeland en Duitsland. Als de analyse van WGS voldoende uitgewerkt en gewaarborgd is, kan gewerkt gaan worden aan de andere vragen die geformuleerd zijn in het project. De kosten van WGS dalen zeer snel; de verwachting is dat dit niet de beperkende factor zal zijn bij de invoering van deze techniek.

### Beter dan VNTR?

Omdat WGS naast VNTR-typering gaat draaien, kan onderzocht worden hoe VNTR-clusters worden opgesplitst door WGS en of deze nieuwe indeling beter strookt met de bevindingen van het onderzoek naar epidemiologische verbanden.



**Figuur 2.**  
**Genetische afstandsmatrix**  
 Matrix die de genetische afstand tussen *M. tuberculosis*-isolaten in mutaties weergeeft. In de meest donkere tint rood de isolaten die mogelijk een epidemiologisch verband hebben. De theorie is dat de kans op een epidemiologisch verband het grootst is als de genetische afstand het kleinst is.

De tbc-afdelingen van GGD'en zullen een belangrijke rol spelen in dit onderzoek.

Hierbij is ook van belang hoe de populatiestructuur van *M. tuberculosis* op grond van WGS eruitziet. Eerder is deze bepaald op grond van VNTR-patronen en bleek dat er sprake is van clonale complexen onder *M. tuberculosis*-isolaten, hetgeen een invloed heeft op het discriminerende vermogen en de interpretatie van DNA-fingerprinting (7). Kunnen bijvoorbeeld isolaten van bepaalde immigranten, die nu nogal eens clusteren zonder aanwijsbaar epidemiologisch verband, met WGS wel van elkaar worden onderscheiden? Ook zal opnieuw onderzocht

worden hoe snel het genoom van *M. tuberculosis* verandert. Bij tbc-patiënten met een aangetoonde epidemiologische link zullen mutaties gevonden worden die hierover meer informatie leveren.

### Weergave van clustering

Een andere uitdaging vormt het formuleren en visualiseren van de genetische afstand tussen *M. tuberculosis*-kweken. Waar tot op heden een vrij rigide werkwijze werd aangehouden, waarbij isolaten wel of niet tot een cluster behoorden, zullen we nu met een waarschijnlijkheid van clustering gaan werken. In feite is er geen sprake meer van clustering van *M. tuberculosis*-

kweken met identieke DNA-fingerprints, maar complexen van stammen die onderling meer of minder verschillen en die in de loop van de tijd vrij snel veranderen, waardoor clusters zich als het ware in diverse richtingen vertakken (zie figuur 1). De genetische afstand tussen *M. tuberculosis*-isolaten is ook in een matrix weer te geven (zie figuur 2). Naar verwachting zal deze informatie meer helderheid opleveren in het epidemiologisch onderzoek. WGS zal waarschijnlijk ook een belangrijk instrument zijn om te monitoren of de doelstelling wordt behaald om transmissie van tuberculose in Nederland verder terug te dringen.

## Identificatie met WGS

De verwachting is dat met WGS de identificatie op (sub)species niveau en wat betreft de herkenning van de *M. tuberculosis*-genotypefamilie gemakkelijk uitgevoerd kan worden. Hierbij kunnen alle (sub)species in het complex, zoals *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis caprae*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. pinnipedii* en *M. orygis* op efficiënte wijze onderscheiden worden. De fylogenie op grond van genomische mutaties is namelijk het meest robuust van alle benaderingen die gevolgd zijn in de loop van de tijd in de taxonomie (8). Ook de genotypefamilies van *M. tuberculosis* kunnen op betrouwbare wijze aangetoond worden. Dit laatste is van belang omdat bijvoorbeeld het Beijing-genotype wereldwijd en in Oost-Europa sterk geassocieerd is met MDR/XDR-tuberculose en herkenning van verspreiding belangrijk kan worden in een tijd van toenemende immigratie.

## Resistentieonderzoek en WGS

Maar ook het detecteren van alle mogelijke mutaties die samenhangen met resistentie tegen antibiotica zal het vermogen aanzienlijk verbeteren om aan de hand van DNA-analyse resistentie te voorspellen. De hypothese is dat na verder onderzoek met WGS in ieder geval de afwezigheid van resistentiemutaties dermate zeker gesteld kan worden, dat een aanzienlijk deel van het fenotypische resistentieonderzoek achterwege kan blijven. Ook zal in de komende periode uit dergelijk onderzoek steeds meer bekend worden over de correlatie tussen bepaalde resistentiemutaties en het niveau van resistentie tegen specifieke tbc-medicijnen, zodat het steeds beter mogelijk wordt om de therapie aan de hand hiervan in of bij te stellen (6).

## Verwachte opbrengst


Er zal een hogere resolutie in epidemiologische typering van *M. tuberculosis* bereikt worden en dit zal waarschijnlijk de bruikbaarheid van de moleculaire typering in de praktijk ten goede komen. Het zal wellicht ook het ontstaan van clustering van patiënten, waarbij geen epidemiologisch verband aantoonbaar is, sterk verminderen en hierdoor de inclusie en exclusie van gerelateerde patiënten verbeteren.

Ook de snelheid van de typering zal na de inwerkperiode sterk toenemen. Op termijn wordt het hopelijk zelfs mogelijk om WGS toe te passen op bacteriën in klinisch materiaal.

De determinatie van kweken en de indeling in genotypefamilies zal sterk verbeteren. Dit is onder andere van belang om uitbraken van MDR/XDR-tuberculose op Europees niveau snel te herkennen.

Tenslotte zal de bepaling van resistentie van *M. tuberculosis*-kweken sterk profiteren van de invoering van WGS. De voorspellende waarde van de moleculaire resistentiebepaling zal verbeteren, maar het is zelfs waarschijnlijk dat een flink deel van de fenotypische resistentiebepalingen straks niet meer uitgevoerd hoeft te worden. In feite kan WGS op termijn een aanzienlijk deel van de huidige tbc-laboratoriumdiagnostiek vervangen en kan invoering hiervan een zeer kostenefficiënte operatie worden.

## Project

De werving van een onderzoeker in opleiding is gestart. In 2016 zal een landelijke bijeenkomst worden georganiseerd voor geïnteresseerden. Tevens zal er een begeleidingsgroep worden gevormd die het onderzoek gaat adviseren en ondersteunen. 

De auteurs zijn Miranda Kamst, Rianne van Hunen en Hester Korthals-Altes erkentelijk voor hun bijdragen aan dit artikel.

## Literatuur

1. Schürch AC, van Soolingen D. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: from phage typing to whole-genome sequencing. *Infect Genet Evol* 2012;12:602-609.
2. Bryant JM, et al. Inferring patient to patient transmission of *Mycobacterium tuberculosis* from whole genome sequencing data. *BMC Infect Dis* 2013;13:110.
3. Schürch AC et al. High-resolution typing by integration of genome sequencing data in a large tuberculosis cluster. *J Clin Microbiol* 2010;48:3403-3406.
4. Walker TM et al. Contact investigations for outbreaks of *Mycobacterium tuberculosis*: advances through whole genome sequencing. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:796-802.
5. Bos KI et al. Pre-Columbian mycobacterial genomes reveal seals as a source of New World human tuberculosis. *Nature* 2014;514:494-497.
6. Walker TM et al. Whole-genome sequencing for prediction of *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility and resistance: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2015;15:1193-1202.
7. Sloot R et al. Clustering of tuberculosis cases based on variable-number tandem-repeat typing in relation to the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 2013;51:2427-2431.
8. Stucki D, Gagneux S. Single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* and the need for a curated database. *Tuberculosis* 2013; 93:30-39.