

'Whole genome sequencing' bevestigt twee tbc-uitbraken in Limburg

Terugkoppeling van de resultaten van 'whole genome sequencing' (WGS) zal even wennen zijn voor wie met de VNTR-typering gewerkt heeft. Aan de hand van twee tbc-uitbraken in Limburg geven we hier een voorbeeld van een WGS-matrix.

De resultaten van het RIVM 'whole genome sequencing' (WGS) project zijn veelbelovend (zie voor een update het artikel op pagina 3). Het RIVM zal daarom in 2018 in een onderzoekspilot naast de 'variable number of tandem repeats' (VNTR) ook de WGS van *Mycobacterium tuberculosis* isolaten met GGD'en delen. Indien de pilot goed verloopt zal in 2019 de WGS de VNTR als standaardtypering vervangen.

De communicatie van WGS-resultaten is nog wel een uitdaging. De Regio Noordwest (Noord-Holland, Flevoland en Utrecht) werkt aan een tool om WGS-resultaten terug te koppelen. Begin 2018 zijn van een aantal clusters de WGS-data met vier GGD'en (Gelderland-Zuid, Zuid Limburg, Amsterdam en Haaglanden) gedeeld en besproken. In dit artikel beschrijven we de manier van terugkoppeling aan de hand van twee tbc-uitbraken in Limburg.

Matrix als basis voor WGS-clustering

Het RIVM hanteert in de VNTR-typering een 100%-overeenkomst tussen *M. tuberculosis* isolaten. Indien dit het geval is, dan krijgt het nieuwe isolaat hetzelfde VNTR-nummer en ontstaat er een nieuw cluster of wordt het isolaat aan een cluster toegevoegd. De GGD'en worden via Osiris

NTR geïnformeerd over de VNTR-nummers en kunnen zelf een overzicht of rapport downloaden van clusterende patiënten.

De WGS-typering geven we weer in een 'afstandstabel' (in Excel) met de verschillen tussen *M. tuberculosis* isolaten van patiënten. Zo'n tabel kun je vergelijken met de tabellen die gebruikt worden om afstanden tussen plaatsen weer te geven.

In een afstandstabel komen de plaatsnamen twee keer terug: verticaal, dus in de voorste kolom, en horizontaal, dus in

de bovenste rij. In de velden van zo'n tabel vind je het aantal kilometers tussen de plaatsen, met uiteraard een 0 als de plaats met zichzelf wordt vergeleken.

Vergelijkbaar daarmee vind je in de WGS-matrix het isolaat/patiëntnummer ook twee keer terug: in de voorste kolom en in de bovenste rij. In de velden staat het verschil in het aantal nucleotiden (SNP's; 'single nucleotide polymorphisms') tussen de *M. tuberculosis* isolaten van de patiënten.

TABEL 1. WGS-matrix van VNTR-cluster 1 met aantal SNP's verschil tussen isolaten in whole genome sequencing

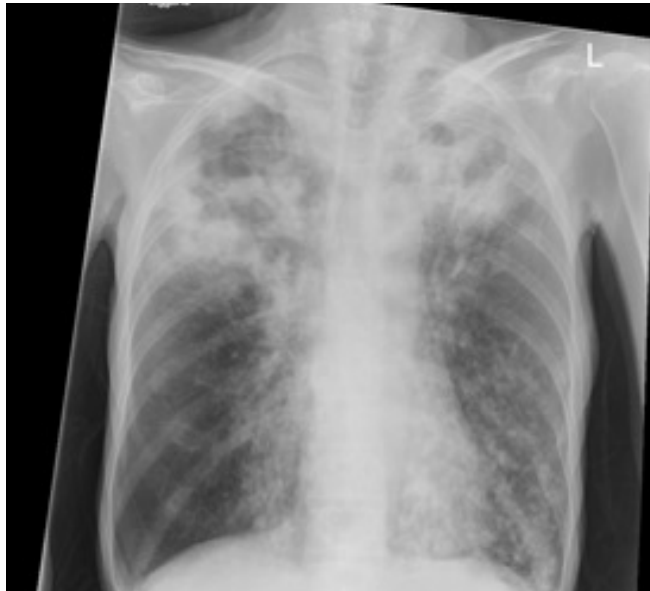
patiënt	maand/jaar	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J=D
A	2005	-									
B	2011		-								
C	11-2016			-							
D	1-2017			5	-	*					
E	2-2017			1	4	-					
F	3-2017			2	5	1	-				
G	4-2017			0	5	1	2	-			
H	8-2017			4	7	3	2	4	-		
I	9-2017			4	7	3	2	4	0	-	
J=D	11-2017			6	1	5	4	6	6	6	-

De groene blokjes geven aan dat er tussen de bron en het vervolggeval een epidemiologische link is vastgesteld. De patiëntnummers zijn hier omwille van de eenvoud en de privacy vervangen door een letter.

* De relatie tussen patiënt D en E (4 SNP's verschil) wordt in dit vakje weergegeven: dat betekent dat de bronpatiënt E later werd vastgesteld dan het vervolggeval.



THORAXFOTO 1 (PATIËNT E): EEN DIKWANDIGE CAVERNE IN DE RECHTER BOVENKWAB, OPGETROKKEN FISSUUR EN EEN OPGETROKKEN RECHTER HILUS. IN DE LINKER BOVENKWAB ZIJN VERSPREID OOK INFILTRATIEVE AFWIJINGEN TE ZIEN.



THORAXFOTO 2 (PATIËNT H): CAVERNES EN UITGEBREIDE INFILTRATIEVE AFWIJINGEN IN BEIDE BOVENVELDEN EN VERSPREID INFILTRATIEVE NODULI OVER DE LONGVELDEN.

Cluster 1

Tabel 1 is de WGS-matrix van een VNTR-cluster dat vorig jaar vooral in Limburg voorkwam. Het cluster bestaat uit tien patiënten; van twee patiënten vóór 2016 is geen WGS-resultaat bekend, van acht patiënten sinds 2016 is wel een WGS bekend. Elke keer als er een nieuw isolaat in WGS wordt getypeerd, wordt er een rij toegevoegd met het patiëntnummer en het aantal SNP's verschil met de isolaten van voorgaande patiënten in het cluster.

Alle isolaten in dit cluster hebben ≤ 12 SNP's verschil met elkaar. Dit past dus goed bij een cluster met transmissie. In groen is aangegeven als er een verband is aangetoond met een volgende patiënt in het cluster. Patiënt E is de bron van patiënten D, F en H. Patiënt H is de bron van patiënt I. Patiënt D heeft in november 2017 een recidief tuberculose.

Beschrijving cluster 1

- Patiënt E is een Nederlandse man die al sinds de zomer van 2016 hoestklachten heeft. Uiteindelijk wordt pas in februari 2017 de diagnose caverneuze longtuberculose gesteld (zie thoraxfoto 1). Hij is dan 6 kg afgevallen en is fors vermoeid. De ZN van het sputum is sterk positief.
- Patiënt D heeft een reumatische ziekte, waarvoor hij behandeld wordt met tocilizumab en leflunomide. Bij hem wordt één maand eerder tuberculose van de longen, botten en hersenvliezen vastge-

steld. Clusteronderzoek leert dat D bij de familie van E over de vloer kwam. Het feit dat bij hem de diagnose eerder wordt vastgesteld dan bij de (vermeende) bron maakt duidelijk dat E lang besmettelijk moet zijn geweest.

DE WGS-TYPERING GEVEN WE WEER

IN EEN SOORT 'AFSTANDSTABEL'

- Bij het contactonderzoek rondom E wordt bij de moeder eveneens longtuberculose gevonden (patiënte F). Twee andere familieleden (kinderen) hebben een 'primotuberculose' en een kennis heeft een pleuritis tuberculosa. Deze vervolgevallen staan niet in het cluster, omdat de diagnose niet bevestigd is met een positieve kweek. Er worden ook 32 latente tbc-infecties (LTBI) gevonden bij de 70 onderzochte personen (46%).
- Zes maanden na de diagnose van E wordt bij een plaatsgenoot (patiënte H) open tuberculose vastgesteld (zie thoraxfoto 2). Zij is extreem vermagerd en weegt bij opname nog de helft van wat normaal is. Er kan slechts één contactmoment met E worden achterhaald, namelijk tijdens een feest dat een half jaar eerder heeft

plaatsgevonden. H woont bovendien in hetzelfde appartementenblok als andere patiënten in dit cluster, mogelijk is daar ook contact geweest met E.

- Rondom H wordt contactonderzoek gestart, waarbij ook patiënte I tot de te onderzoeken personen behoort. Voordat zij echter wordt opgeroepen, meldt ze zich met klachten bij de huisarts. Die verwijst haar naar de longarts, die longtuberculose vaststelt. Patiënte I woont in hetzelfde complex als patiënte H en heeft haar tijdens haar ziekte intensief verzorgd.
- De laatste patiënt in dit cluster (patiënt J) is dezelfde persoon als patiënt D. Hij heeft een recidief tuberculose, ondanks goede therapietrouw.
- De overige patiënten (A, B, C en G) wonen elders in het land. Er wordt geen duidelijke link gevonden met patiënten in de regio, hoewel enkele van hen wel regelmatig in Limburg kwamen.

Cluster 2

Cluster 2 bestaat geheel uit Eritrese patiënten (zie Tabel 2). De eerste patiënt in Limburg betreft een kindje van slechts acht maanden (patiënt T). Het kindje heeft een vergrote halsklier. De thoraxfoto toont een miliair beeld en uit het maaginhoud-spoelsel wordt een *M. tuberculosis* gekweekt. Brononderzoek levert al snel de bron: een vriendin van de moeder (patiënt U).

Het onderzoek naar epidemiologische verbanden in dit cluster gaat moeizaam omdat

TABEL 2. WGS-matrix van VNTR-cluster 2 met aantal SNP's verschil tussen isolaten in whole genome sequencing

patiënt	maand/jaar	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z
Q	2014	-									
R	2014		-								
S	11-2016			-							
T	12-2016			4	-	*					
U	12-2016			4	2	-					
V	5-2017			3	1	1	-				
W	5-2017			3	1	1	0	-			
X	5-2017			4	2	2	1	1	-		
Y	5-2017			8	6	4	5	5	4	-	
Z	6-2017			5	3	3	2	2	1	5	-

De groene blokjes geven aan dat er tussen de bron en het vervolggeval een epidemiologische link is vastgesteld. De patiëntnummers zijn hier omwille van de eenvoud en de privacy vervangen door een letter.

* De relatie tussen patiënt T en U (2 SNP's verschil) is in dit vakje weergegeven, omdat de bronpatiënt U later werd vastgesteld dan het vervolggeval T.

men in deze gemeenschap niet open kan of wil spreken over relaties en contacten. Daarnaast is er een taalbarrière. Toch worden verschillende epi-links bevestigd: patiënt W is ook een contact van U. En patiënten X en Z kennen allebei W. Van patiënt W is er geen VNTR-resultaat beschikbaar, omdat er op twee loci een dubbele piek te zien was. Met WGS-typering kon deze patiënt alsnog in dit cluster geplaatst worden. Het contactonderzoek rondom patiënten in dit cluster leverde tot nu toe ook circa 20 personen met een LTBI op.

Er wordt geen epidemiologisch verband gevonden met de andere patiënten V en Y, die beiden niet in de regio Limburg wonen. Het cluster omvat ook drie eerdere patiënten (Q, R, S) die allemaal buiten de regio wonen, waarbij er een epi-link is vastgesteld tussen patiënten R en S.

Efficiënter

WGS is een veelbelovende techniek waarmee naar verwachting veel efficiënter naar epidemiologische verbanden gezocht kan

MET WGS KUNNEN WE EFFICIËNTER NAAR EPIDEMIOLOGISCHE VERBANDEN ZOEKEN

worden. Een voorbeeld is recent onderzoek van het RIVM. Daaruit bleek dat isolaten van een VNTR-cluster met veel (recente) vluchtelingen in WGS onderling vaak >50 SNP's verschil hadden (1). De ervaring van GGD'en was al dat clusteronderzoek in

deze clusters maar zelden een bevestigd epidemiologisch verband opleverde. WGS toont hier dus aan dat deze clusters met identieke VNTR patronen in werkelijkheid geen 'echte clusters' zijn. Daar staat tegenover dat er ook VNTR-clusters zijn die ook in de WGS geheel bij elkaar blijven. Daarvan is het dan aannemelijk dat al deze clusterende gevallen een gevolg van (recente) transmissie zijn, zoals de hier beschreven twee uitbraken in Limburg.

Anders terugkoppelen

Met WGS zal over een andere wijze van terugkoppeling van resultaten nagedacht moeten worden. In de toekomst – als VNTR gestopt is – zal in WGS bij een nieuwe uitslag elke keer gekeken worden of er andere isolaten zijn met ≤ 12 SNP's verschil. Na twee jaar WGS is er nu al een databestand met meer dan 1000 WGS-resultaten, en dus een matrix van >1000 rijen en >1000 kolommen. Dit databestand zal de komende jaren snel toenemen en kan vergeleken worden met een sterrenhemel. Soms wordt een ster aan het firmament gezien zonder nabijgelegen sterren, maar als transmissie heeft plaatsgevonden ontstaat er een sterrenhoop (≤ 12 SNP's), zoals in deze 'Limburgse clusters'. ■

Literatuur

1. Jajou R, de Neeling A, Rasmussen EM et al. A predominant VNTR cluster of *Mycobacterium tuberculosis* isolates among asylum seekers in the Netherlands and Denmark deciphered by whole genome sequencing. J Clin Microbiol. 2017 Nov 22;JCM.01100-17.

AGENDA TRAININGEN, CURSUSSEN EN CONGRESSEN

14 en 15 juni 2018	Nederlandstalige Tuberculose Diagnostiek Dagen (NTDD)	Locatie: landgoed Ehzerwold te Almen Informatie: www.erasmusmc.nl/memi/actualiteiten/NTDD/
23-27 juli 2018	22nd International AIDS Conference	Locatie: Amsterdam Informatie: www.aids2018.org
24-27 oktober 2018	49th Union World Conference on Lung Health	Locatie: Den Haag Informatie: http://thehague.worldlunghealth.org/