

→ CK (Richard)

Postbus 1  
3720 BA Bilthoven

A. van Leeuwenhoeklaan 9  
Bilthoven

Tel (030) 274 91 11  
Fax (030) 274 29 71

info@rivm.nl  
www.rivm.nl

16/10/2007 "out-debt" - Nitswee gedaan!  
Jwz/keu



Rijksinstituut  
voor Volksgezondheid  
en Milieu

Ministerie van LNV  
T.a.v. de heer R.C.A. Soons  
Postbus 20401  
2500 EK DEN HAAG

MINISTERIE VAN LANDBOUW, NATUUR EN VOEDSELKwaliteit VOEDSELKwaliteit EN DIERGEZONDHEID		
VD: 06/144		
Ontv. 19101 2007	Beantw. 	Paraaf
Classnr.		1.7739

Onderwerp  
Coxiella-diagnostiek

Geachte heer Soons,

Datum

12 januari 2007

Ons kenmerk

007/07 MGB AG/np

Blad

1/1

Behandeld door

A.W. van de Giessen  
MGB

Tel (030) 274 2816

Fax (030) 274 4434

arjen.van.de.giessen@rivm.nl

Mede namens mijn collega's van het Centraal Instituut voor DierziekteControle, de Gezondheidsdienst voor Dieren en het Centrum Infectieziektebestrijding van het RIVM stuur ik u hierbij een veterinair-humaan geïntegreerd onderzoeksvoorstel op hoofdlijnen voor de ontwikkeling, validatie en toepassing van *Coxiella*-diagnostiek in Nederland.

Vanuit het oogpunt van diergezondheid is het nodig om inzicht te verkrijgen in het vóórkomen van *Coxiella* bij (landbouw)huisdieren, teneinde de bijdrage van *Coxiella*-besmetting aan dierziektegevallen in kaart te brengen. Daarnaast is het voor de volksgezondheid van belang een goed inzicht te verkrijgen in de seroprevalentie en het vóórkomen van *Coxiella burnetii* in de humane populatie om een schatting te kunnen maken van het risico en de gezondheidslast van Q-fever. Tevens is het van belang om transmissieroutes van dier naar mens in kaart te brengen.

Kopie aan  
auteurs

Doel van dit gemeenschappelijk onderzoeksvoorstel is om de diagnostiek in humane, veterinaire en omgevingsmonsters (verder) te ontwikkelen, te valideren en te harmoniseren ten behoeve van primaire diagnostiek, bronopsporing, prevalentie- en epidemiologisch onderzoek.

Graag vernemen wij uw wensen voor verdere uitwerking cq uitvoering van deze onderzoeksplannen.

Met vriendelijke groet,

A. W. van de Giessen

Microbiologisch laboratorium voor Gezondheidsbescherming,  
Centrum Infectieziektebestrijding, RIVM



## VOORSTEL VOOR ONTWIKKELING, VALIDATIE EN TOEPASSING VAN *COXIELLA* -DIAGNOSTIEK IN NEDERLAND

**Centrum voor Infectieziektebestrijding (RIVM/Cib):** Peter Wielinga, Daan Notermans, Frederika Dijkstra, Maaïke de Vries, Bart van Rotterdam, Joke van der Giessen, Arjen van de Giesen

**Centraal Instituut voor DierziekteControle (CIDC-Lelystad):** Hendrik-Jan Roest, Fred van Zijderveld

**Gezondheidsdienst voor Dieren (GD):** Piet Vellema, Kees van Maanen

### Achtergrond

*Coxiella burnetii* is een zoönotische bacterie die bij mens en dier ziekte (Q-koorts) kan veroorzaken. Vaak verloopt de infectie asymptomatisch. Symptomen die bij de mens kunnen optreden zijn o.a. een griepachtig ziektebeeld, koorts en een pneumonie. In chronische gevallen kunnen ernstige aandoeningen aan o.a. hart en lever optreden. Humane (serologische) diagnostiek van *C. burnetii* vindt plaats in verschillende diagnostische laboratoria; de resultaten hiervan worden gerapporteerd in 'de virologische weekstaten'. In Nederland is *C. burnetii* bij de mens aangifteplichtig, melding vindt plaats via OSIRIS. In de periode 2004-2005 vonden 8 meldingen plaats in OSIRIS, terwijl 17 gevallen werden gerapporteerd in de virologische weekstaten. Deze laatste betroffen 16 ziekenhuisopnames en één overleden patiënt. In de periode 1998 -2004 waren er jaarlijks gemiddeld 18 meldingen in de virologische weekstaten en 12 in OSIRIS. Hoogstwaarschijnlijk is er sprake van onderrapportering in OSIRIS of mogelijk dubbelmeldingen van herhaaldelijk geteste patiënten met een chronische infectie in de weekstaten. Seroprevalentiestudies in de tachtiger jaren onder bloeddonoren uit Rotterdam, Groningen en Maastricht lieten een hoge seroprevalentie (24%, 60%, 62%, respectievelijk) zien onder de Nederlandse bevolking welke sterk afhankelijk bleek van regio, geslacht en leeftijd (2). Ofschoon deze studies nooit zijn herhaald en mogelijk een overschatting zijn, is er waarschijnlijk sprake van forse onderdiagnostiek voor Q-fever. In tegenstelling tot de ons omringende landen zijn er in Nederland geen outbreaks van Q-fever beschreven. Onduidelijk is of outbreaks niet voorkomen in Nederland of dat ze niet worden opgemerkt. Als gevolg hiervan kunnen ziektegevallen over het hoofd worden gezien. Bovendien kan er geen onderscheid worden gemaakt tussen natuurlijke en opzettelijke besmettingen.

*C. burnetii* bij dieren is niet aangifteplichtig. *C. burnetii* is aangetoond bij een groot aantal diersoorten inclusief (landbouw)huisdieren. Over het algemeen zijn dieren symptoomloos drager. Pas recentelijk wordt besmetting bij schapen, geiten en runderen in verband gebracht met abortus en verminderde fertiliteit. In gevallen van abortus bij dieren kan GD immuno-histochemische diagnostiek op de placenta en het abortusmateriaal verrichten. Gegevens over het voorkomen van *C. burnetii* bij landbouwhuisdieren zijn schaars. In de jaren '80 vonden Houwers en Richardus bij runderen, schapen en geiten seroprevalenties van respectievelijk 21%, 3,5% en 1% (1). Momenteel wordt serologie bij dieren toegepast bij het CIDC-Lelystad in het kader van exportonderzoek met behulp van de Complement Bindings Reactie (CBR). Daarnaast verricht GD (tank)melkonderzoek van runderen m.b.v. ELISA. De resultaten doen vermoeden dat *C. burnetii* op een groot aantal rundveebedrijven aanwezig is; tot nu toe zijn er echter geen geconfirmeerde gevallen van abortus op melktank-positieve bedrijven gevonden.

*C. burnetii* kan via een sporenachtige vorm worden uitgescheiden in feces, urine, melk, luchtwegen en de amnion-vloeistof en placenta van dieren. De "sporen" zijn zeer resistent en overleven lange tijd in het milieu. Transmissie is mogelijk via besmet stof in de lucht, via

consumptie van rauwe dierlijke producten (melk) en via contact met besmette dierlijke materialen (vlees, abortusmateriaal). Landbouwhuisdieren worden algemeen gezien als belangrijkste infectiebron voor de mens.

Omdat *C. burnetii* in zeer lage doses al kan leiden tot infectie en de de kiem lang in het milieu kan persisteren, heeft ertoe geleid dat het CDC dit agens tot de Categorie B organismen van de lijst van bioterroristische agentia rekent ([www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp](http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp)) is geplaatst. In kader van de bestrijding van bioterroristisch aanslagen doet het RIVM onderzoek naar dit organisme.

### **Relevantie voor volksgezondheid en diergezondheid**

Voor de volksgezondheid is het van belang een goed inzicht te verkrijgen in de seroprevalentie en het vóórkomen van *Coxiella burnetii* in de humane populatie om een schatting te kunnen maken van het risico en de gezondheidslast van Q-zevier. Tevens is het van belang om transmissieroutes van dier naar mens in kaart te brengen. Daarnaast is inzicht in het vóórkomen van *Coxiella* bij (landbouw)huisdieren nodig vanuit het oogpunt van diergezondheid, teneinde de bijdrage van *Coxiella*-besmetting aan dierziektegevallen in kaart te brengen.

### **Betrokken onderzoeksinstituten**

Op nationaal niveau werken momenteel het CIDC, de GD en het RIVM/CIb aan *Coxiella*. Daarnaast zijn het CIDC en het RIVM/CIb betrokken bij Europees onderzoek naar Q-zevier in het kader van het Europese MedVetNet-project. Hoewel de Faculteit Diergeneeskunde (FD) niet betrokken was bij de uitwerking van dit onderzoeksvoorstel, kan deze kennisinstelling mogelijk worden betrokken bij het onderzoek naar *Coxiella*, met name onderzoek bij gezelschapsdieren.

### **Doelstelling**

Doel van dit gemeenschappelijk onderzoeksvoorstel is om de diagnostiek in humane, veterinaire en omgevingsmonsters (verder) te ontwikkelen, te valideren en te harmoniseren ten behoeve van primaire diagnostiek, bronopsporing, prevalentie- en epidemiologisch onderzoek. Hieronder worden voorstellen gedaan voor de verschillende onderzoekscomponenten.

## ONDERZOEKSVORSTELLEN

### **Seroprevalentie-onderzoek**

#### Validatie veterinaire serologie

Door GD en het CIDC wordt een selectie gemaakt van commercieel verkrijgbare ELISA's voor serologie van *Coxiella* bij runderen, schapen, geiten en gezelschapsdieren. In overleg zal een geschikte test worden gekozen voor een validatie-onderzoek. Daartoe zullen zowel bloedmonsters als abortusmaterialen verzameld worden van dieren met abortus. De abortusmaterialen zullen door GD worden onderzocht d.m.v. immuno-histochemie. Confirmatie van serologische resultaten zal plaatsvinden bij het CIb d.m.v. een Western blot-techniek en bij het CIDC door middel van de CBR. Hiertoe zal door het CIb een Western blot voor *Coxiella* worden opgezet aan de hand van sera van positief bevonden dieren (verzameld door GD/CIDC) en sera van positief bevonden mensen (verzameld door CIb).

#### Seroprevalentie-onderzoek bij dieren

M.b.v. een gevalideerde serologische test zal prevalentieonderzoek worden uitgevoerd onder de Nederlandse runder-, schapen- en geitenpopulatie. Daarbij zal o.a. gebruik worden gemaakt van sera van schapen en geiten die reeds door GD zijn verzameld in het kader van onderzoek naar *Chlamydophila*. Naast onderzoek bij landbouwhuisdieren kan mogelijk in samenwerking met de Faculteit Diergeneeskunde onderzoek worden verricht naar de seroprevalentie in de honden- en kattenpopulatie.

#### Validatie humane serologie

De serologische testen die bij het CIb worden gebruikt voor patiëntendiagnostiek, immuunfluorescentie testen op IgG en IgM tegen fase 1 en 2 apart, zijn ongeschikt om grotere hoeveelheden monsters te verwerken. Hiervoor zal een geschikte commerciële test worden gezocht dan wel worden overgenomen uit de literatuur, waarbij de keuze o.a. zal afhangen of deze een breed (Europees) draagvlak heeft en ermee verkregen resultaten vergelijkbaar zijn met gegevens uit andere landen.

#### Seroprevalentie-onderzoek bij de mens

CIb zal serologie doen bij risico groepen zoals veehouders en dierenartsen bij probleem bedrijven en een controle groep bij een normaal bedrijf. Voor een goede evaluatie van de data is kennis van seroprevalentie in de gehele humane populatie zodat de risicogroepen en -factoren voor Q-koorts beter in kaart kunnen worden gebracht. Dit laatste zal worden uitgevoerd met monsters van de Pienter studie.

#### **Ontwikkeling en validatie PCR-detectie**

Ten behoeve van de ontwikkeling en de validatie van een PCR-methode voor de detectie van *Coxiella* in humane, veterinaire en omgevingsmaterialen worden de volgende activiteiten voorgesteld:

#### Kweek van controlematerialen.

In samenwerking tussen het CIDC en het RIVM/CIb zal een *Coxiella* - kweek worden opgezet op BSL-3 niveau. De verkregen materialen zullen worden gebruikt als positieve controles bij het opzetten van de verschillende methoden. Er zal op Europees niveau worden samengewerkt voor de kweek van *Coxiella*: het verkrijgen van stammen en methoden.

#### Ontwikkeling en validatie PCR

In samenwerking tussen het RIVM/CIb en het CIDC zal een solide opwerkingsmethode en robuuste PCR worden opgezet voor de bepaling van *Coxiella* in omgevingsmonsters en humaan en veterinair materiaal. Deze methoden zullen onder andere worden gevalideerd met behulp van immunohistochemisch positieve dierlijke materialen van GD en kweek materiaal. Ook materialen van door het CIDC positief geteste export-dieren kunnen worden gebruikt. Daarnaast zal in samenwerking met de VWA slachthuismateriaal worden verzameld. Tevens zal via de FD materiaal van gezelschapsdieren worden verzameld.

Van mogelijke Q-koorts patiënten (oa patiënten met hartklep problemen en patiënten die serologisch positief zijn bevonden) zal materiaal worden verzameld en getest mbv van deze PCR. De positieve monsters zullen tevens worden gebruikt voor genotyperingsonderzoek.

## Ontwikkeling genotypering

Om bronopsporing mogelijk te maken is er een overeenkomstige techniek voor genotypering nodig. Daartoe zullen het CIb en het CIDC een genotyperingsmethode voor *Coxiella* ontwikkelen die bruikbaar is voor zowel mens, dier en milieumonsters. Samenwerking zal plaatsvinden om kennis en expertise te delen, waarbij beide instituten deel-assays uitvoeren, waarna de resultaten in een gezamenlijke database zullen worden verzameld. Voor genotypering zijn reeds verschillende methoden gepubliceerd. Een aantal methoden zal worden onderzocht waarbij zal worden gekeken of de deze zowel humaan als veterinair bruikbaar zijn en in Europees verband draagvlak heeft om vergelijking met buitenlandse studies mogelijk te maken. Daarnaast zijn de methoden vaak alleen nog getest op gezuiverd DNA van gekweekte *Coxiella* stammen en zullen moeten worden gevalideerd voor complexere materialen. De multilocus variable number of tandem repeats analysis (MLVA) ontwikkeld door het CIb (3) en genotyperingsmethoden op basis van DNA sequencing (4) zullen worden geëvalueerd. In eerste instantie zullen de verschillende methoden op kleine schaal worden geëvalueerd met behulp van gekweekt materiaal en een aantal complexe monsters. Wanneer dit goed loopt en er een goed beeld is van het onderscheidende vermogen van de methoden zullen deze verder worden getest op complexere humane en veterinaire materialen. Hiertoe wordt gebruik gemaakt van de positieve diermonsters van GD en CIDC alsmede van positieve tank-melk-monsters en een aantal controle monsters.

### (Moleculair-) Epidemiologisch onderzoek

Onderzoek naar het voorkomen van Q-fever bij de mens in Nederland geschiedt bij het CIb op basis van de melding van Q-fever-patiënten in het kader van de infectieziektewet en diagnostiek bij humane patiënten. Gegevens van serologie, genotypering en voorkomen van Q-fever bij mens en dier zullen bij het CIb intergraal worden geanalyseerd. Daartoe zullen (geanonimiseerde) gegevens (genotype, positief/negatief, serologie, postcode, periode, mens, dier(product), sex, leeftijd, genotype, etc.) van de verschillende kennisinstellingen worden verzameld in een gezamenlijke database op het CIb. Genotypes aangetroffen in dieren, mensen en producten zullen onderling worden vergeleken. Daarbij zal o.a. gebruik worden gemaakt van GIS om moleculair-epidemiologische relaties aan te tonen. Tevens zal vergelijking plaatsvinden in internationale context.

### Transmissie-onderzoek n.a.v. ziektegevallen

Bij (verdenking op) transmissie van dier op mens dienen de betrokken partijen (GD, VWA, GGD, huisartsen) gestimuleerd te worden om monsters af te nemen voor zowel serologie als PCR en genotypering. Gezien de goede contacten van de GD met de veehouders kan de GD daarbij een belangrijke rol spelen. Voor de monsternamen bij mens en dier zal aangesloten worden bij de protocollen van het Landelijk Coördinatiecentrum Infectieziekten (LCI/RIVM) en de VWA (het LCI-protocol wordt op dit moment herzien). Bij het onderzoek zal het RIVM de humane serologie uitvoeren en de GD de veterinaire serologie, terwijl het RIVM en het CIDC zullen samenwerken m.b.t. de PCR en genotypering.

### Referentielijst

1. Houwers, D. J. and J. H. Richardus. 1987. Infections with *Coxiella burnetii* in man and animals in The Netherlands. Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]. 267:30-36.

2. Richardus, J. H., A. Donkers, A. M. Dumas, G. J. Schaap, J. P. Akkermans, J. Huisman, and H. A. Valkenburg. 1987. Q fever in the Netherlands: a sero-epidemiological survey among human population groups from 1968 to 1983. *Epidemiol.Infect.* 98:211-219.
3. Svraka, S., Toman, R., Skultety, L., Slaba, K., & Homan, W.L. 2006. Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Lett* 254(2), 268-74.
4. Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., Tokarevich, N., Kovacava, E., Marrie, T.J., & Raoult, D. 2005. *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerg Infect Dis* 11(8), 1211-7

