

# NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR MEDISCHE MICROBIOLOGIE

## Visie

## Van de redactie

## Artikel

De kleur van een micro-organisme

*K. Maquelin, H.P. Endtz, G.J. Puppels, A. van Belkum*

Identificatie van klinisch relevante micro-organismen met behulp van  
Fourier transform infrarood-spectroscopie

*C.H.W. Klaassen, A.M. Horrevorts*

Betekenis van moleculaire technieken voor de diagnostiek van CMV-ziekte

*M.W.H. Wulf, J.S. Kalpoe, J.M.D. Galama, A.C.M. Kroes, W.J.G. Melchers,*

*E.C.J. Claas*

## Casuïstiek

Dikke druppel: malaria en een worm?

*H.F.L. Wertheim, A. Pronk, L. van Lieshout, R.W. Vreede*

## Oratie

Infectieziekten en Medische Microbiologie: in medio virtus?

*B.J. Kullberg*

## ICAAC-award

Jan Nouwen krijgt GSK ICAAC-award 2004

*J.E. Degener*

## Rubrieken

Ingezonden

Promoties

Personalia

Agenda

# 4



**Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie**  
 Het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie is het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM). Het doel van het tijdschrift is de lezers te informeren over ontwikkelingen betreffende het vakgebied. In het tijdschrift worden zowel fundamentele als klinische aspecten van de Medische Microbiologie belicht. Daarnaast biedt het plaats voor promoties e.d., nieuws over evenementen en mededelingen uit de Vereniging.

**NVMM-secretariaat**  
 Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden  
 Telefoon (058) 293 94 95, fax (058) 293 92 00  
 E-mail nvmm@knmg.nl  
 Internet <http://www.nvmm.nl>

**Redactie**  
 Dr. A.M. Horrevorts, hoofdredacteur  
 Mw. Dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg/  
 Dr. A. Fleer/Dr. T. van Gool/  
 J.A. Kaan/Mw. L.M. Kortbeek/  
 H. Wertheim/Dr. J.F.G.M. Meis/Dr. M.F. Peeters/  
 Prof. dr. H.A. Verbrugh

**Eindredactie**  
 Mw. G. Brouwer  
 Van Zuiden Communications B.V.  
 Postbus 2122, 2400 CC Alphen a/d Rijn  
 Telefoon (0172) 47 61 91, fax (0172) 47 18 82  
 E-mail [brouwer@zuidencomm.nl](mailto:brouwer@zuidencomm.nl)

**Oplage**  
 800 exemplaren, 4 x per jaar

**Abonnementen**  
 € 35,- per jaar voor niet-leden van de NVMM,  
 Europa € 42,50 per jaar, losse nummers € 10,20.  
 Opgave abonnementen: telefoon (0172) 47 61 91

**Advertentie-exploitatie**

  
**VAN ZUIDEN**  
 COMMUNICATIONS B.V.  
 Van Zuiden Communications B.V.  
 Telefoon (0172) 47 61 91

**Auteursrecht en aansprakelijkheid**  
 ©Van Zuiden Communications B.V., 2004  
 Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. Uitgever en auteurs verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en auteurs op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en auteurs aanvaarden dan ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt met nadruk aangeraden deze informatie niet geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun professionele kennis en ervaring en de te gebruiken informatie te controleren.

**Algemene voorwaarden**  
 Op alle aanbiedingen, offertes en overeenkomsten van Van Zuiden Communications B.V. zijn van toepassing de voorwaarden welke zijn gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Amsterdam.

ISSN 0929-0176

**Visie** 110

**Van de redactie** 111

**Artikel**

De kleur van een micro-organisme 112  
*K. Maquelin, H.P. Endtz, G.J. Puppels, A. van Belkum*

Identificatie van klinisch relevante micro-organismen met behulp van Fourier transform infrarood-spectroscopie 115  
*C.H.W. Klaassen, A.M. Horrevorts*

Betekenis van moleculaire technieken voor de diagnostiek van CMV-ziekte 118  
*M.W.H. Wulf, J.S. Kalpoe, J.M.D. Galama, A.C.M. Kroes, W.J.G. Melchers, E.C.J. Claas*

**Casuïstiek**

Dikke druppel: malaria en een worm? 121  
*H.F.L. Wertheim, A. Pronk, L. van Lieshout, R.W. Vreede*

**Oratie**

Infectieziekten en Medische Microbiologie: in medio virtus? 123  
*B.J. Kullberg*

**ICAAC-award**

Jan Nouwen krijgt GSK ICAAC-award 2004 129  
*J.E. Degener*

**Rubrieken**

Ingezonden 130

Promoties 131

Personalia 132

Agenda 132

## De NVMM: waar staan we nu?

In de aanloop naar de najaarsledenvergadering van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie in het schitterende Instituut voor de Tropen in Amsterdam, waar ik de voorzittershamer van Marcel Peeters zou gaan overnemen, vroeg ik me af hoe het er eigenlijk voor stond met de NVMM.

De NVMM, voortgekomen uit de Medische Sectie van de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (NVvM) en de Nederlandse Vereniging van Laboratoriumartsen (NVL), bestaat in de huidige vorm sinds 1992. Onder voorzitterschap van succesievelijk Bob Jansz, Henri Verbrugh en Marcel Peeters heeft de vereniging zich zeer voorspoedig ontwikkeld. Momenteel telt de NVMM iets meer dan 500 leden. Medici en niet-medici, van medisch microbiologisch onderzoekers (MMO-registerleden) tot artsen-microbioloog en die daarvoor in opleiding zijn (AIOS-sen), en overige academici die in het veld van de medische microbiologie en infectieziekten werkzaam zijn.

We blijken als NVMM-ers erg actief te zijn, in een van de acht statutaire commissies (Beroepsbelangencommissie MMO, Beroepsbelangencommissie artsen-microbioloog, Commissie Wetenschapsbehartiging, Commissie Nascholing, Commissie Kwaliteit, Algemene Visitatie Commissie, Concilium Medico Microbiologicum, Commissie Laboratoriumonderwijs) of in een van de vier werkgroepen (Werkgroep Klinische Virologie, Werkgroep Openbare Gezondheidszorg en Infectieziekten, Werkgroep Oost, Werkgroep West; de Werkgroep Moleculaire Diagnostiek is in oprichting). We zijn als NVMM vertegenwoordigd in vele besturen (CCKL, SWAB, WIP, SKML, NVvM, NIAZ, CRG enz.) en andere organen (te veel om op te noemen). Ook vinden we artsen-microbioloog op persoonlijke titel terug als voorzitter van twee van de drie kamers van de Orde van Medisch Specialisten, de Kamer Vrij Beroep (Rob Diepersloot) en de Kamer van Academische Specialisten (Henri Verbrugh). De directeur-generaal van het RIVM is een arts-microbioloog (Marc Sprenger), evenals de directeur van het in oprichting zijnde Centrum Infectieziekten (Roel Coutinho). De NVMM fungeert in toenemende mate als gesprekspartner voor partijen als bijvoorbeeld overheid als deskundige op het gebied van infectieziekteproblematiek in al zijn facetten.

Kortom, de NVMM is een zeer actieve vereniging die steeds duidelijker op de kaart is komen te staan en waarvan de leden frequent worden gevraagd voor bestuurlijke posities. Die leden zitten daar vaak met een herkenbaar NVMM-label, dat wordt geassocieerd met deskundigheid, kwaliteit en liefde voor het vak. Het is plezierig dat te mogen vaststellen.

Een vak dat tegenwoordig publicitair aantrekkelijk is en frequent op de voorpagina staat. Een vak dat continu verandert, zowel qua gastheer (de adipeuze, vergrijzende homo sapiens), qua pathogenen (humaan metapneumovirus, SARS), qua medische mogelijkheden (MRI, PET-CT-scan, immuunmodulators) en qua diagnostische technieken in ons vak (RealTime-amplificatie). Maar ook de maatschappelijke setting waarin we opereren, verandert.

De financiën zullen nog steeds niet in gelijke mate toenemen met de vraag naar zorg, en dus te krap blijven. De minister wijzigd het speelveld ingrijpend door de invoering van de DBC's en versterkt de regievoering door de zorgverzekeraars. De concurrentie wordt harder met andere aanbieders van diagnostiek, zoals de 'huisartsenlaboratoria'. Het kwaliteitsdenken gaat ook voort met accreditatie van de medisch microbiologische laboratoria. Ook de Inspectie voor de Gezondheidszorg wil ons gaan inspecteren. De *Public-Health* kant van het vak wordt ingrijpend gerenoveerd met onder meer de oprichting van het Centrum Infectieziekten. De dynamiek neemt toe en vraagt dat we snel op ontwikkelingen inspelen.

De breedte van het terrein waarop de NVMM actief is én het grote aantal leden dat daarin actief is, betekent dat het bestuur steeds minder op de hoogte kan zijn van de details van de verschillende dossiers waarmee al die leden zich bezighouden. Ieder NVMM-lid zal dan ook in hoge mate autonoom opereren, maar zich wel steeds moeten afvragen: wat verwachten de NVMM-leden hier van mij? Dat moeten we natuurlijk wél van elkaar weten. Dat vereist dat we op gezette tijden met elkaar praten over waar we met de NVMM heen willen en dat goed met elkaar communiceren.

We zullen elkaar nog vaak spreken.

**Dr. G.J.H.M. Ruijs, arts-microbioloog, voorzitter Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten, Isala klinieken, Rhijnvis Feithlaan 62, 8021 AM Zwolle.**

# Stap uit de tredmolen

Zo luidt de titel van hoofdstuk 1 in het boek *De strijd om de toekomst* van G. Hamel en C. Prahalad. In hun boek worden traditionele managementwerkwijzen, strategiemodellen en groeiverwachtingen omvergeworpen. Nogal wat organisaties sturen hoofdzakelijk op kosten en steken (te) veel energie in herstructurering en re-engineering. Met 'denk anders' en 'doe anders' worden nieuwe kansen geschapen.

Je ziet tegenwoordig managers die de pretentie hebben alles en iedereen te managen. Enige kennis van de inhoud van het werk wordt niet meer nodig gevonden. Managen is voor hen een zelfstandige discipline geworden met geheel eigen drijfveren. Het tevreden stellen van aandeelhouders wordt belangrijker gevonden dan interne betrokkenheid bij de organisatie. Zonder vakinhoudelijke kennis voeren ze reorganisaties en kostenbesparingen door. Als een medewerker iets daarvan zegt, is het weerwoord dat deze te emotioneel met *zijn zaak* bezig is. Mintzberg *et al*, onder andere Staute, spreken van een 'managerscoupe' die verder wordt gekenmerkt door meer vertrouwen te stellen in de kennis van ingehuurde consultants dan in de kennis die in de eigen organisatie aanwezig is. Door te schermen met adviezen van consultants ontlopen managers hun eigen verantwoordelijkheid. Als Raden van Bestuur of Raden van Commissarissen op hun beurt ook zijn gecharmeerd van die 'kennis', dan is de kring gesloten. En gaat het eventjes niet goed, dan verdwijnen ze met de aandeelhouders, de medewerkers (de belangrijkste 'grondstof' van de organisatie) achterlatend. En daarmee stopt alle innovatie.

Venkata Raman werd in 1888 geboren in Trichinopoly, India. Hij studeerde natuurkunde in Madras. Na het afronden van zijn studie ging hij voor zijn brood werken op het Ministerie van Financiën. De Association of Cultivation of Science te Calcutta bood hem daarnaast de gelegenheid onderzoek te verrichten. In 1917 kreeg hij een aanstelling als natuurkundige aan de universiteit in die stad. Hij deed onderzoek op het gebied van licht en geluid en in 1928 verscheen in de *Indian Journal of Physics* zijn artikel 'A new radiation', onderzoek waarvoor hij in 1930 de Nobelprijs voor Natuurkunde ontving.

Over anders denken en doen gesproken: twee van de drie artikelen (Maquelin *et al* en Klaassen *et al*) behandelen twee methoden die op de onderzoeken van Raman zijn gebaseerd, namelijk de identificatie van micro-organismen met behulp van licht. Stappen zij daarmee uit de tredmolen? Immers, de biochemie bepaalt tot op de dag van vandaag grotendeels de identificatie van bacteriën. Wulf *et al* bespreken nieuwe moleculair biologische technieken voor de diagnostiek van CMV. Kullberg schetst in zijn oratie een duaal model (daar waar het gaat om artsen-microbioloog en infectiologen, ieder met ruimte voor zijn eigen voorkeuren) in een continuüm (daar waar het gaat om het vakgebied infectieziekten). Wertheim *et al* bespreken aan de hand van een casus een artefact dat kan voorkomen bij microscopische diagnostiek.

In het laatste nummer van 2004 wil de redactie iedereen bedanken die een bijdrage heeft geleverd aan de twaalfde jaargang van het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie. Een goed 2005 toegewenst.

## Referenties

G. Hamel, C. Prahalad. *De strijd om de toekomst*. Scriptum Management; M. Weggeman. *Leiding geven aan professionals*. Kluwer; H. Mintzberg. *Managers not MBAs*. Pearson Education; J. Staute. *Het consultancy rapport*. Longman.

**Alphons M. Horrevorts, afdeling voor Medische Microbiologie en Infectieziekten, tevens Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Postbus 9015, 6500 CS Nijmegen.**

# De kleur van een micro-organisme

K. MAQUELIN, H.P. ENDTZ, G.J. PUPPELS, A. VAN BELKUM

## Samenvatting

**In het laatste decennium is de interesse voor biofysische methoden bij het bestuderen van micro-organismen sterk toegenomen. Deze technieken hebben enkele duidelijke voordelen in vergelijking met conventionele methoden, zoals snelheid en eenvoud. In dit artikel richten we ons op Ramanspectroscopie, een methode die wij aan het optimaliseren zijn voor routinematige microbiologische diagnoses. Eerst worden de theoretische achtergronden, gebruikte apparatuur en data-analysemethoden belicht. Daarna zullen enkele toepassingsvoorbeelden van de techniek worden gegeven. We concluderen dat Ramanspectroscopie op den duur haar weg kan vinden naar het klinisch microbiologisch laboratorium. Deze methode is een alternatief voor de huidige geautomatiseerde fenotypische identificatiemethoden.**

Trefwoorden: identificatie, karakterisatie, Ramanspectroscopie

## Inleiding

Een snelle zoektocht door de recente literatuur over de snelle identificatie van micro-organismen levert een steeds verdere uitbreiding op van het aantal PCR-bepalingen. Gedurende de laatste jaren komen daar echter ook meer biofysische methoden bij voor het karakteriseren en typeren van micro-organismen. Het best vertegenwoordigd zijn diegene die zijn gebaseerd op massaspectrometrie en vibratiespectroscopie, maar ook technieken die gebruikmaken van nucleaire magnetische resonantie winnen terrein. Biofysische technieken hebben een aantal duidelijke voordelen ten opzichte van conventionele identificatiemethoden:

- één protocol voor een groot aantal organismen;
- minimale monsterbereiding;
- geen kleurstoffen of labels nodig;
- snel;
- eenvoudig te automatiseren.

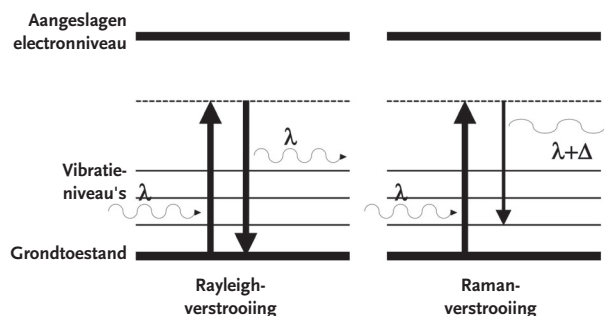
In dit artikel zullen we ons richten op Ramanspectroscopie, die samen met infrarood(IR)-spectroscopie valt onder de noemer vibratiespectroscopie. Die term heeft betrekking op het fundamentele fenomeen van deze technieken: moleculaire vibraties. Vibratiespectra van micro-organismen zijn samengesteld uit signaalcontributies van alle aanwezige componenten in de cel en zijn daardoor een representatie van de totale moleculaire samenstelling. Naumann *et al.*<sup>1</sup> hebben laten zien dat Fourier transform infrarood(FTIR)-spectroscopie kan worden gebruikt voor de identificatie van een groot aantal micro-organismen. Recentelijk is aangetoond dat Ramanspectroscopie over vergelijkbare eigenschappen beschikt.<sup>2,3</sup> Omdat vibratiespectroscopie informatie verschaft over de totale moleculaire samenstelling van cellen op een niet-destructieve manier, biedt dat grote voordelen voor het bestuderen van micro-organismen. Bovendien zijn er geen exogene toevoegingen als labels of kleurstoffen nodig om de metingen te verrichten. In onze laboratoria optimaliseren we Ramanspectroscopie voor microbiologische diagnostiek. Onze prioriteit was het faciliteren van snelle identificatie van bacteriën en gisten. In dit artikel worden enkele basisaspecten en toepassingen van Ramanspectroscopie gepresenteerd.

## Theoretische achtergrond

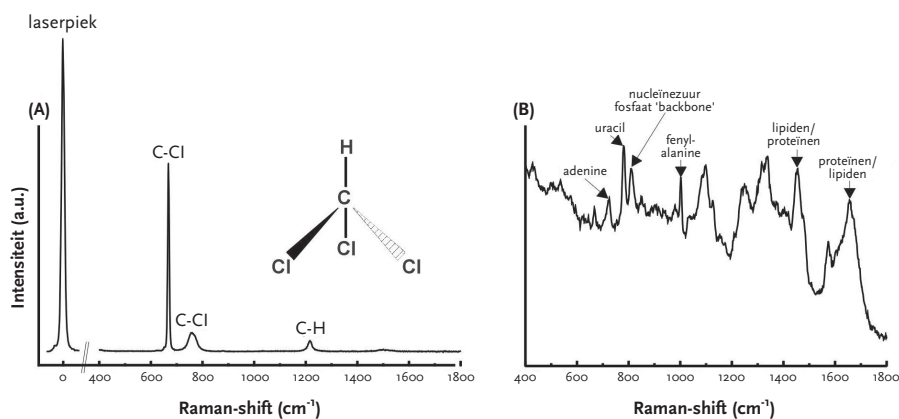
Ramanspectroscopie is genoemd naar de ontdekker ervan, de Indiase fysicus Chandrasekhara Venkata Raman. In 1928 was Raman de eerste die experimenteel bewijs vond voor de inelastische verstrooiing van licht aan een materiaal.<sup>4</sup> Voor zijn uitvinding 'of extraordinary great importance for our knowledge of the structure of molecules'<sup>5</sup> ontving Raman in 1930 de Nobelprijs voor natuurkunde.

Wanneer licht interactie heeft met moleculen, die leidt tot verstrooiing van licht, zal het overgrote deel van het verstrooide licht dezelfde golflengte hebben als het ingestraalde licht (*figuur 1*). Dit proces heet Rayleigh of elastische verstrooiing. Een kleine fractie van het licht zal echter inelastisch worden verstrooid, met als gevolg een andere golflengte dan het initiële licht. Tijdens deze laatste interactie treedt er een energieoverdracht op tussen het opvallende foton en het molecuul waarmee het een interactie aangaat. Door deze energieuitwisseling komt het molecuul in een ander vibratieniveau terecht; vandaar de naam vibratiespectroscopie. Om de veranderingen tussen de excitatiegolflengte en die van het verstrooide licht precies te analyseren, wordt gebruikgemaakt van monochromatisch (één enkele golflengte) laserlicht voor de excitatie van een monster. In *figuur 2a* is het Ramanspectrum van chloroform weergegeven. Op de x-as

*Figuur 1.* Schematische weergave van energieniveaus in een molecuul en de verandering als gevolg van de interactie met licht. *Links:* na een interactie met een molecuul zal het meeste licht ( $\lambda$ ) zonder kleurverandering worden verstrooid. *Rechts:* een klein deel van het licht zal door de interactie met het molecuul energie verliezen en daardoor van kleur veranderen ( $\lambda+\Delta$ ). Het molecuul zal door de toename in energie een hoger vibratieniveau bereiken dan voor de interactie.



Figuur 2. In een Ramanspectrum wordt de kleurverschuiving ten opzichte van de laser, waarmee een monster is belicht, weergegeven in golfgetallen ( $\text{cm}^{-1}$ ) waarbij de lasergolflengte op nul wordt gesteld. A. Relatief eenvoudig Ramanspectrum van een relatief eenvoudig molecuul (chloroform, zie inzet). B. Ramanspectrum van een micro-organisme (*Enterococcus faecalis*). Van een aantal posities in het spectrum is aangegeven welke biomoleculen bijdragen aan de pieken.



staan de golflengtes van de verschillende Ramanpieken in een spectrum; deze worden weergegeven in relatieve golfgetallen of Raman-shift-eenheden.

De positie van een lijn in het Ramanspectrum correspondeert met de energie die nodig is om een molecuul tot een bepaalde vibratietoestand aan te slaan. Een molecuul kan verschillende vibratietoestanden hebben, afhankelijk van het aantal atomen in dat molecuul.<sup>6</sup>

Elke piek in het Ramanspectrum correspondeert met een specifieke moleculaire vibratie en het Ramanspectrum is daardoor molecuul-specifiek (figuur 2a). Een bacteriële cel is samengesteld uit een veelvoud van complexe biomoleculen en het Ramanspectrum is daardoor erg complex. Door de spectra van gezuiverde stoffen te vergelijken met het spectrum van micro-organismen is het mogelijk om pieken in het spectrum toe te kennen aan specifieke componenten in de cel (figuur 2b). Het Ramanspectrum van een micro-organisme is een representatie van de gehele moleculaire samenstelling van de cel.

### Apparatuur

De instrumenten in ons laboratorium zijn relatief eenvoudig. Omdat de intensiteit van Raman verstrooid licht veel lager is dan dat van Rayleigh verstrooid licht (~ factor  $10^6$ ), wordt gebruikgemaakt van een laser met hoog vermogen. Het is van groot belang om het intense laserlicht ten opzichte van het Raman verstrooide licht te onderdrukken. Dit voorkomt dat de detector (een infrarood geoptimaliseerde *charge-coupled device* (CCD)-camera) verzadigd met het laserlicht en dat zo het Ramansignaal onzichtbaar wordt. Hiervoor wordt een optisch filter gebruikt, waarvan de transmissie van de laser minimaal is en het Ramansignaal optimaal wordt doorgelaten. Vervolgens worden de verschillende golflengtes van het Raman verstrooide licht gescheiden met behulp van een tralie en geprojecteerd op de CCD-detector. Een praktische opstelling is de combinatie van een microscoop en een Ramanspectrometer. Het laserlicht wordt via het microscoop-objectief gefocust op het monster en het verstrooide licht wordt opgevangen door hetzelfde objectief. Door daarbij gebruik te maken van een confocale opstelling is het mogelijk om een zeer klein meetvolume, van enkele kubieke micrometers, te bereiken.<sup>7</sup>

### Monsterbereiding en metingen

De bereiding van een microbiologisch monster voor Ramanmetingen is eenvoudig. Er zijn twee methoden die het meest worden toegepast en die eenvoudig in een traditioneel

kweekprotocol te passen zijn. Ten eerste is het mogelijk om biomassa van een vast kweekmedium (of de pellet na centrifugeren van een vloeibare kweek) over te brengen op een preparaatglas. Metingen kunnen direct op dit preparaat worden gedaan.<sup>8</sup> Ten tweede is het mogelijk om metingen te doen op kolonies, direct op een vast kweekmedium.<sup>9</sup> Een snelle identificatie wordt bereikt door middel van een confocale opstelling en Ramanmetingen te verrichten op microkolonies, die meestal al na enkele uren kweken ontwikkelen.<sup>3,10</sup> Zonder gebruik te maken van kleurstoffen of labels, kunnen Ramanspectra van het natief monster op een niet-destructieve manier worden gemeten. Typische meettijden liggen in de orde van minuten (1 tot 5) en de verdere analyse hangt af van de specificaties van de desbetreffende pc.

### Data-analyse

De analyse van Ramanspectra vertoont grote overeenkomsten met de analyse van zeer complexe DNA-restrictiepatronen, die zijn weergegeven als densitogrammen van een elektroforesepatroon. De positie, intensiteit en breedte van een piek bevatten informatie over specifieke moleculaire vibraties. Verschillende micro-organismen zullen een verschillende biochemische samenstelling hebben, hetgeen tot uiting zal komen in het Ramanspectrum. Biochemische verschillen tussen organismen kunnen dus indirect worden bestudeerd door de analyse van de Ramanspectra. Het is echter ook mogelijk om de spectra te beschouwen als spectroscopische fingerprints. Chemometrische en multivariate statistische technieken worden vaak toegepast voor de analyse van de complexe spectra, op dezelfde manier als wordt gebruikt bij patroonherkenningsalgoritmen. Met de constante toename van de reken capaciteit van pc's zijn deze technieken beschikbaar voor eenieder die bereid is te investeren in een spectrometer. Een uitgebreid overzicht van de beschikbare analysemethoden valt buiten het kader van dit artikel, maar eerder heeft Lavine hierover gepubliceerd.<sup>11</sup> Voor microbiële identificaties worden twee basale werkwijzen onderscheiden. De eerste is gebaseerd op *unsupervised*-methoden, waarbij geen voorkennis wordt gebruikt voor de identificatie. Voorbeelden zijn factoranalyse, principal-componentanalyse (PCA) en hiërarchische clusteranalyse (HCA). Deze technieken hebben objectieve groepeeringscriteria om de metingen in te delen in groepen die van nature voorkomen in de dataset. Door goed gekarakteriseerde referentiestammen te includeren kunnen onbekende stammen worden geïdentificeerd op grond van de eigenschappen van deze referentiestammen.

Een tweede groep van technieken die geregeld bij microbiële identificatie wordt toegepast is die van de *supervised*-methoden die gebruikmaken van a-priori-kennis van de monsters. Met een set van goed gedefinieerde stammen wordt een computermodel getraind om de identiteit van onbekende stammen te voorspellen aan de hand van hun Ramanspectra. Voorbeelden van dergelijke technieken zijn lineaire discriminantanalyse (LDA) en artificiële neurale netwerken (ANN's).

### Toepassingen van Ramanspectroscopie voor microbiologische analyses

Ramanspectroscopie maakt het mogelijk om snel bacteriën en gisten te identificeren door metingen te doen aan zes uur oude microkolonies op een vast kweekmedium.<sup>3,10</sup> Jonge culturen van *Candida*-species bijvoorbeeld, kunnen met een nauwkeurigheid van 97-100 procent worden geïdentificeerd. Conventionele methoden zoals het API-systeem van bioMérieux, hebben daarvoor 24 tot 48 uur nodig. Bovendien kunnen met behulp van Ramanspectroscopie ook na zes uur identificaties worden verricht van positieve bloedkweken (Bactec, Becton Dickinson).<sup>3,10</sup> In een diagnostisch laboratorium zijn voor de *Candida*-identificatie 1-4 dagen nodig; 24-48 uur op een ChromAgar en 24-48 uur voor een conventionele identificatie als een non-albicans-species wordt gekweekt.

Recentelijk hebben Hutsebaut *et al* de invloed bestudeerd van kweekcondities op de identificatie van *Bacillus*-species met behulp van Ramanspectroscopie.<sup>12</sup> Dertig stammen van drie species werden gekweekt onder twaalf verschillende condities. Er bleek nog steeds voldoende scheidende informatie in de dataset aanwezig te zijn voor een nauwkeurige discriminatie (92 procent). Dit liet zien dat Ramanspectroscopie een robuuste methode is en dat kleine variaties op een *standard operating protocol* (SOP) van een diagnostisch laboratorium waarschijnlijk geen invloed hebben op de identificatieresultaten.

Identificatie lijkt bovendien niet beperkt te zijn tot het speciesniveau. De analyse van *Acinetobacter*-isolaten lijkt veelbelovend voor epidemiologische onderzoeken.<sup>13</sup> In dit onderzoek werd een set goed gekarakteriseerde isolaten gebruikt die afkomstig waren uit vijf verschillende uitbraken. Hiërarchische clusteranalyse van de Ramanspectra van deze isolaten vertoonde hoge overeenkomsten met een clusteranalyse van AFLP-fragmenten. Biomassa van een overnacht-kweek werd gebruikt in dit onderzoek en Ramanmetingen van 30 seconden per isolaat bleken voldoende te zijn.

De unieke eigenschap van Ramanspectroscopie in vergelijking met andere biofysische technieken is de mogelijkheid om metingen te doen aan zeer kleine onderwerpen. Het confocale meetvolume, in de ordegrrootte van  $\mu\text{m}^3$  maakt het mogelijk om metingen te doen aan enkele bacteriële cellen<sup>14</sup> en zelfs endosporen.<sup>15,16</sup> Microbiële cellen kunnen worden vastgehouden in de laserfocus, als een optische pincet, om zo de cel over tijd te kunnen bestuderen. De directe klinische relevantie van deze specifieke toepassing is misschien niet erg groot, maar het biedt wel nieuwe onderzoeksmogelijkheden.

### Conclusie

Het aantal onderzoekslaboratoria dat vibratiespectroscopie toepast bij microbiologische analyses neemt langzaam toe. Op dit moment zijn ongeveer 20 tot 30 laboratoria actief op het gebied van microbiële classificatie met FT-IR- of Raman-spectroscopie. Hiervan zijn er ongeveer vijf die Ramangebaseerde onderzoeken publiceren. Met de verdere verbetering

van apparatuur en met het oog op de hoge informatiedichtheid van de spectra, kan Ramanspectroscopie op den duur haar weg vinden naar het klinisch microbiologisch laboratorium als een alternatief voor de huidige geautomatiseerde fenotypische identificatiemethoden.

### Summary

*Over the last decade, biophysical methods have gained in popularity among microbiologists. With some distinct advantages over conventional diagnostic methods, these techniques offer rapid and simple alternatives. In this article we will focus on Raman spectroscopy, a method that we are optimising for routine microbiological diagnosis. An introduction will be given to the theory behind the technique, as well as the required instrumentation and data analysis. Finally, some application examples will be presented. We conclude that Raman spectroscopy may eventually find its way to the clinical microbiology laboratories as an alternative to current automated phenotypic identification methods.*

### Referenties

1. Naumann D. Infrared spectroscopy in microbiology. In: Meyers RA (eds.). Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. p. 102-31.
2. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith L, Braak N van den, Endtz H, Naumann D, et al. Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *J Microbiol Methods* 2002;5:255.
3. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, Vreeswijk T van, Stammler M, et al. Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:324-29.
4. Raman CV, Krishnan KS. A new type of radiation. *Nature* 1928;121:501-02.
5. Pleijel H (1930) Nobel Prize in Physics 1930. In: The Nobel Foundation.
6. Tu AT. Raman Spectroscopy in Biology. New York: John Wiley & Sons Ltd., 1982.
7. Puppels GJ, Mul FFM de, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ, et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microscopy. *Nature* 1990;347:301-03.
8. Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum GD, et al. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J Clin Microbiol* 2001;39:1763-70.
9. Maquelin K, Choo-Smith LP, Vreeswijk T van, Endtz, HP, Smith B, Bennett R, et al. Raman spectroscopic method for identification of clinically relevant microorganisms growing on solid culture medium. *Anal Chem* 2000;72:12-9.
10. Maquelin K, Choo-Smith, LP, Endtz HP, Bruining HA, Puppels GJ. Rapid Identification of *Candida* Species by Confocal Raman Microspectroscopy. *J Clin Microbiol* 2002;40:594-600.
11. Lavine BK. Chemometrics. *Anal Chem* 1998;70:209R-28R.
12. Hutsebaut D, Maquelin K, Vos P de, Vandenabeele P, Moens L, Puppels GJ. Effect of culture conditions on the achievable taxonomic resolution of Raman spectroscopy disclosed by three *Bacillus* species. *Anal Chem* 2004;76:6274-81.
13. Maquelin K, Dijkshoorn L, Reijden TJK van der, Puppels GJ. Rapid epidemiological analysis of *Acinetobacter* spp. by Raman spectroscopy. Submitted. 2004.
14. Schuster KC, Urlaub E, Gapes JR. Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J Microbiol Methods* 2000;42:29-38.
15. Alexander TA, Pellegrino PM, Gillespie JB. Near-infrared surface-enhanced-Raman-scattering-mediated detection of single optically trapped bacterial spores. *Appl Spectrosc* 2003;57:1340-5.
16. Scully MO, Kattawar GW, Lucht RP, Opatry T, Pilloff H, Rebane A, et al. FAST CARs: engineering a laser spectroscopic technique for rapid identification of bacterial spores. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10994-11001.

**Dr. K. Maquelin<sup>1</sup>, medisch microbiologisch onderzoeker**

**Dr. H.P. Endtz<sup>2</sup>, medisch microbioloog**

**Dr. ir. G.J. Puppels<sup>1</sup>, fysisus**

**Prof. dr. A. van Belkum<sup>2</sup>, moleculair microbioloog**

- 1 Erasmus MC, afdeling Algemene Heelkunde, Rotterdam.
- 2 Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Rotterdam.

*Correspondentieadres: dr. K. Maquelin, Centrum voor Optische Diagnostiek & Therapie, Kamer Wk 331 (Westzeedijk), Dr. Molwaterplein 40, 3015 GD Rotterdam, tel.: (010) 408 71 17, fax: (010) 408 76 71, e-mail: k.maquelin@erasmusmc.nl.*



# Identificatie van klinisch relevante micro-organismen met behulp van Fourier transform infrarood-spectroscopie

C.H.W. KLAASSEN, A.M. HORREVORTS

## Samenvatting

*Fourier-transform infrarood(FTIR)-spectroscopie is een techniek waarmee het mogelijk is van een micro-organisme een absorptiespectrum in het infrarode deel van het elektromagnetisch spectrum op te nemen. Het afgelopen decennium is meerdere malen gedemonstreerd dat micro-organismen op species- en subspecies-niveau van elkaar kunnen worden onderscheiden aan de hand van verschillen in hun infraroodspectrum. De praktische bewerking van FTIR-spectroscopie is snel, eenvoudig en economisch. Door deze bijzondere toepassingsmogelijkheden kan FTIR-spectroscopie een revolutie binnen de dagelijkse praktijk van het medisch microbiologisch laboratorium teweegbrengen.*

Trefwoorden: FTIR-spectroscopie, identificatie, micro-organismen

## FTIR-spectroscopie voor beginners

Met behulp van FTIR-spectroscopie kan een absorptiespectrum in het midden-infrarode gebied van het elektromagnetische spectrum worden opgenomen (golflengtes van 2,5 - 25  $\mu\text{m}$ ). In dit deel van het spectrum vindt absorptie plaats door intramoleculaire vibraties in de vorm van chemische bindingen. Een chemische binding tussen twee atomen is geen star verband. Beide atomen zullen ten opzichte van elkaar echter continu bewegen waarbij bewegingen langs de lengte-as van de binding (strekvibraties) en loodrecht daarop (buigvibraties) kunnen worden onderscheiden. Net zoals gekleurde stoffen zichtbaar licht absorberen, zijn chemische bindingen dus in staat om infrarode golflengtes te absorberen. De precieze golflengte waarbij dit gebeurt, is afhankelijk van het karakter van de chemische binding (C-H, N-H, O-H, C-O, C=O enz.) en de directe microcontext daarvan. Het infrarode spectrum van een micro-organisme weerspiegelt daarom de biochemische samenstelling van de gehele cel en kan als biochemische vingerafdruk worden beschouwd. De meest prominente pieken in een infraroodspectrum van een micro-organisme zijn terug te vinden in het gebied van 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  (N-H en O-H uit eiwitten), 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  (C-H, vooral in lipiden), 1500-1700  $\text{cm}^{-1}$  (amide-I- en amide-II-bindingen in eiwitten) en 900-1200  $\text{cm}^{-1}$  (C-O, vooral in koolhydraten).<sup>1</sup>

## FTIR-spectroscopie en micro-organismen

Onderzoek op beperkte verzamelingen micro-organismen heeft meerdere malen aangetoond dat FTIR-spectra van verschillende microbiële soorten genoeg verschillen bevatten om op basis daarvan een identificatie mogelijk te maken

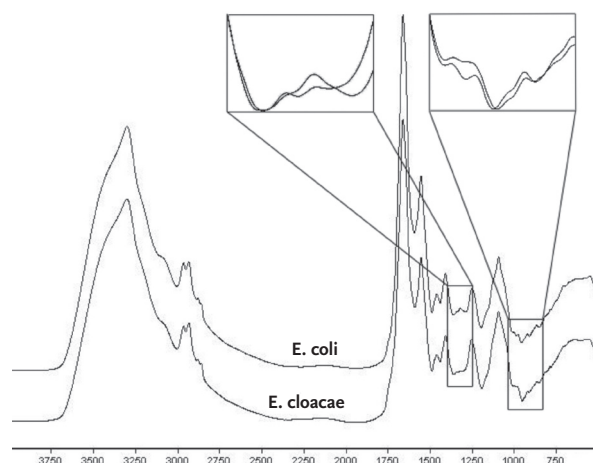
<sup>1</sup> Binnen de FTIR-spectroscopie is het gebruikelijk om in plaats van in golflengtes in golfgetallen te rapporteren (=golflengtes per cm). De eenheid is reciproque centimeters ( $\text{cm}^{-1}$ ). Een golflengte van 10  $\mu\text{m}$  komt dus overeen met 1000  $\text{cm}^{-1}$ .

(figuur 1).<sup>1-7</sup> Zelfs binnen een soort blijken vaak genoeg verschillen op stamniveau te bestaan om op subspecies-niveau onderscheid tussen stammen te kunnen maken.<sup>8</sup> Deze toepassingen zijn niet voorbehouden aan bacteriën, maar zijn tevens van toepassing op gisten en schimmels.<sup>9-12</sup> Dit maakt FTIR-spectroscopie een interessant en universeel toepasbaar alternatief om micro-organismen te identificeren.

## Praktische bewerking van FTIR-spectroscopie

Toepassing van FTIR-spectroscopie op micro-organismen is kinderlijk eenvoudig. Uitgaande van een verse reine kweek op een vaste voedingsbodem wordt hiervan met een entooog een suspensie gemaakt in een kleine hoeveelheid gedemineraleerd water. Afhankelijk van de koloniegrootte zijn hiervoor 4-30 kolonies nodig. Slechts een geoefend oog of een

Figuur 1. FTIR-spectra van een *Escherichia coli* en een *Enterobacter cloacae*. Op het eerste gezicht lijken de spectra identiek. Uitvergroting van een aantal details (kaders) laat zien dat tussen beide spectra toch verschillen zichtbaar zijn. Dergelijke verschillen, hoe miniem ook, blijken uiterst reproduceerbaar te zijn en staan aan de basis van de mogelijkheid om onderscheid tussen deze soorten te maken.



korte training zijn nodig om een suspensie van de juiste dichtheid te verkrijgen. Enige variatie hierin is echter zeker toegestaan. Van deze suspensie wordt een klein gedeelte (5 µl) opgebracht op een monsterplaat van silicaat (SiO<sub>2</sub>). Afhankelijk van de gewenste doorvoer kan gebruik worden gemaakt van een monsterplaat met 96 of 384 posities. De keuze voor het materiaal SiO<sub>2</sub> is gebaseerd op de eigenschap dat het voldoende transparant is voor infrarode golflengten om transmissiemetingen te kunnen verrichten. Na het opbrengen van de monsters dient de plaat te worden gedroogd. Dit is een essentiële stap, aangezien water infrarood licht sterk absorbeert en als zodanig voor een enorme achtergrondabsorptie zou zorgen. Aangezien slechts een geringe hoeveelheid monster hoeft te worden opgebracht, zullen de aanwezige watermoleculen al bij kamertemperatuur binnen korte tijd zijn verdampt, waarna de monsterplaat gereed is om te worden doorgemeten. De meting zelf neemt per monster minder dan twee minuten in beslag. Een computerprogramma kan (delen van) het opgenomen spectrum vergelijken met (delen van) spectra uit een database van bekende soorten en berekenen hoezeer het opgenomen spectrum overeenkomt met de bekende spectra uit de referentiebibliotheek. Dit neemt slechts luttele seconden in beslag. Dit proces kan de basis vormen voor identificatie van een micro-organisme. Afhankelijk van het aantal te testen monsters kan de gehele procedure binnen één tot enkele uren worden afgerond. Na de meting kan de monsterplaat eventueel eenvoudig worden schoongemaakt voor hergebruik.

### Voordelen van FTIR-spectroscopie

Gezien de praktische invulling van de techniek biedt FTIR-spectroscopie een aantal belangrijke voordelen boven zowel de commerciële als zelfgemaakte klassieke biochemische fenotypische identificatiemethoden. Hiervan is het economische aspect niet een van de minste. Dankzij de zeer eenvoudige bewerking zijn qua gebruiksartikelen slechts een reactievatje met gedemineraliseerd water en een pipetpuntje nodig om de bacteriesuspensie op de monsterplaat te brengen. Zelfs indien deze monsterplaat niet zou worden hergebruikt, zou de prijs per monster tot enkele dubbeltjes beperkt blijven. Hergebruik is echter vele malen mogelijk. Naast de prijs per analyse is echter ook de prijs van de FTIR-spectrometer slechts een fractie van de prijs voor de bekende andere identificatiesystemen. Een tweede belangrijk voordeel is dat de hoeveelheid schadelijk afval tot een minimum beperkt blijft. We kennen allemaal de problemen en kosten die zijn gemoeid met de verwerking van schadelijk ziekenhuisafval. Gebruik van FTIR-spectroscopie voor identificatie van micro-organismen zou de hoeveelheid afval van een microbiologisch laboratorium in potentie kunnen decimeren. Als derde punt zouden wij onder de aandacht willen brengen dat aan de hand van één opgenomen FTIR-spectrum zowel een identificatieresultaat als typeringsresultaat kan worden verkregen. Hiermee zouden dus ook potentiële uitbraaksituaties vroeg gesignaleerd en onderzocht kunnen worden. Met deze laatste toepassing is echter nog maar op beperkte schaal ervaring opgedaan. Maar initiële resultaten zien er veelbelovend uit.

### Beperkingen van FTIR-spectroscopie

Gezien het bovenstaande lijkt FTIR-spectroscopie een wondermiddel om micro-organismen te identificeren. Er kleeft echter ook een aantal beperkingen aan. Een belangrijk aspect

aan FTIR-spectroscopie is de noodzaak om zeer gestandaardiseerd te werk te gaan. Aangezien FTIR-spectroscopie een fenotypische identificatiemethode is, dienen omgevingsinvloeden zoveel mogelijk te worden uitgesloten. Dit betekent in de praktijk dat zaken als voedingsbodems, incubatietijden en -temperaturen, atmosfeer en dergelijke zoveel mogelijk constant gehouden dienen te worden. Deze aspecten gelden overigens voor alle fenotypische identificatiemethoden. Aangezien de meeste microbiologische laboratoria reeds gewend zijn dergelijke aspecten van microbiële kweken onder gestandaardiseerde condities uit te voeren, zou dit niet voor onoverkomelijke problemen hoeven te zorgen. Onzes inziens is de grootste beperking voor grootschalige invoer van FTIR-spectroscopie voor routinematige identificatie van micro-organismen, de afwezigheid van voldoende referentiespectra van betrouwbaar geïdentificeerde micro-organismen. Dit zou betekenen dat eenieder die van deze techniek gebruik zou willen maken zelf een referentiebibliotheek zou moeten aanleggen. Dit is voor de meeste microbiologische laboratoria geen optie. Vanwege de enorme potentie die deze techniek heeft, zijn de firma Bruker Optics (producent van infraroodspectrometers) en het laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten van het Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis een samenwerkingsverband aangegaan om een dergelijke bibliotheek van FTIR-spectra aan te leggen.

### Constructie van een referentiebibliotheek van FTIR-spectra voor routinematige identificatie van klinisch relevante micro-organismen

Tot op heden is in FTIR-identificatieonderzoeken bij micro-organismen vooral gewerkt met beperkte verzamelingen species. Ofwel zijn meerdere species uit één geslacht getest, danwel is een beperkte mix van species uit verschillende geslachten getest. In de meeste gevallen was dus vooraf al bekend tot welk(e) geslacht(en) de geteste stammen behoren. De cruciale vraag is natuurlijk of FTIR-spectroscopie ook betrouwbare identificatieresultaten levert bij omvangrijkere projecten met minimale informatie voorhanden, zoals slechts een Gram-preparaat en de morfologie van een stam. Deze aspecten dienen vaak in ieder geval te worden beoordeeld alvorens verdere testen in te zetten. Zoals gezegd is voor een dergelijk experiment een uitgebreide referentiebibliotheek nodig met daarin minstens de te verwachten soorten vertegenwoordigd. Bij het opzetten van een referentiebibliotheek voor routinematige identificatie van micro-organismen is een aantal aspecten van belang voor de keuze van de te includeren soorten. De ideale bibliotheek zou natuurlijk alle species bevatten waarmee we in praktijk kunnen worden geconfronteerd. Vanwege de omvang die een dergelijke bibliotheek zou krijgen, hebben wij onze aandacht in eerste instantie gericht op die soorten die het meeste voorkomen. Inventarisatie van hetgeen op een gemiddeld microbiologisch laboratorium wordt gevonden, leert dat slechts een beperkt aantal soorten al meer dan 80 procent van het totaal aantal kweken vertegenwoordigt. Hierbij gaat het vooral om de familie van *Enterobacteriaceae*, de Gram-positieve kokken (stafylokokken, streptokokken en enterokokken) en de non-fermenters. In eerste instantie hebben wij ons daarom op deze soorten gericht. In een later stadium zou een initiële bibliotheek kunnen worden uitgebreid met minder frequent voorkomende soorten. Bij de keuze van de

te includeren stammen zijn de volgende twee punten van groot belang:

- Van ieder species dienen meerdere stammen in de bibliotheek te worden verwerkt. Aangezien ook binnen soorten variatie in de spectra optreedt, is het van belang om de van nature voorkomende variatie ook in de bibliotheek te vertegenwoordigen. De bibliotheek mag dus niet louter zijn gebaseerd op de bekende referentiestammen, zoals die van de *American Type Culture Collection* en dergelijke, maar dient vooral gewone klinische isolaten te bevatten;
- Het is van essentieel belang dat alle stammen in de bibliotheek betrouwbaar zijn geïdentificeerd. Bij gebruik van een bibliotheek die is gebaseerd op verkeerd geïdentificeerde stammen zal dezelfde identificatiefout steeds weer worden gemaakt!

Bij de identificatie van klinische stammen die in de bibliotheek worden verwerkt, lopen we echter tegen een groot probleem aan. Immers, hoe zeker zijn we ervan dat de gebruikte identificatiemethoden ons ook de juiste naam geven? De cruciale vraag is wat als gouden standaard moet worden gehanteerd. Mede dankzij de sterke opkomst van moleculair biologische technieken is de laatste jaren steeds meer gebleken dat de klassieke fenotypische identificatiemethoden vaak tekortschieten. Om iedere omgevingsinvloed op een fenotypisch identificatiestramien uit te sluiten zou een genotypische identificatiemethode meer voor de hand liggen. In eerste instantie hebben wij daarom gekozen om sequentie-analyse van het 16S-rRNA-gen als gouden standaard te hanteren voor de identificatie van klinische isolaten. Echter, wegens gebrek aan voldoende betrouwbare referentie-sequenties is het bijzonder moeilijk gebleken om vooral binnen de familie van *Enterobacteriaceae* eenduidige identificatieresultaten te verkrijgen. Bijkomend probleem is dat het bij sommige genera steeds moeilijker wordt om een harde grens tussen verschillende species te hanteren. Daarnaast zijn er steeds meer voorbeelden bekend van verschillende soorten die dezelfde 16S-rRNA-gensequentie hebben. Verder vinden wij steeds vaker sequenties in klinische isolaten die onvoldoende overeenkomst hebben met bekende sequenties om op basis daarvan een betrouwbare identificatie te kunnen afgeven. Momenteel hanteren wij een combinatie van verschillende moleculair-biologische technieken om tot betrouwbare identificatieresultaten te komen. Hierover zullen we in een later stadium meer rapporteren.

### Stand van zaken en vooruitblik

De afgelopen anderhalf jaar is door ons gewerkt aan het aanleggen van een verzameling FTIR-spectra voor inclusie in een referentiebibliotheek. Deze bibliotheek bevat tot op heden vooral de eerder vermelde soorten die het meeste voorkomen in een doorsnee microbiologisch laboratorium. Met specialistische zelflerende software is het mogelijk gebleken om alle soorten die in deze bibliotheek zijn vertegenwoordigd op basis van hun infraroodspectrum te onderscheiden. Deze bibliotheek, die inmiddels vele duizenden spectra bevat, zal als uitgangspunt fungeren voor een praktijktest van de toepasbaarheid van deze methode op een tweede onafhankelijke verzameling teststammen. Daarna ligt het voor de hand om een interlaboratoriumvergelijking te starten. Deze testen zullen op korte termijn worden geïnitieerd. Het moge duidelijk zijn dat onze verwachtingen hieromtrent hooggespannen zijn!

### Summary

#### **Identification of Clinically Relevant Micro-Organisms by Using Fourier Transform InfraRed (FTIR) Spectroscopy**

*FTIR spectroscopy is a technique to measure absorption spectra from microorganisms in the infrared part of the electromagnetic spectrum. In the last decade it has been demonstrated on multiple occasions that micro-organisms can be distinguished at the species and sub-species level, based on differences in their infrared spectra. Experimentally, FTIR spectroscopy is rapid, simple and economical. These unique applications of FTIR spectroscopy may result in a revolution in the daily practice in a medical microbiological laboratory.*

### Referenties

1. Mei HC van der, Naumann D, Busscher HJ. Grouping of oral streptococcal species using Fourier-transform infrared spectroscopy in comparison with classical microbiological identification. *Arch Oral Biol* 1993;38:1013-9.
2. Goodacre R, Timmins EM, Rooney PJ, Rowland JJ, Kell DB. Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks. *FEMS Microbiol Lett* 1996;140:233-9.
3. Goodacre R, Timmins EM, Burton R, Kaderbhai N, Woodward AM, Kell DB, et al. Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology* 1998;144:1157-70.
4. Lin SF, Schraft H, Griffiths MW. Identification of *Bacillus cereus* by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). *J Food Prot* 1998;61:921-3.
5. Oberreuter H, Seiler H, Scherer S. Identification of coryneform bacteria and related taxa by Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002;52:91-100.
6. Winder CL, Carr E, Goodacre R, Seviour R. The rapid identification of *Acinetobacter* species using Fourier transform infrared spectroscopy. *J Appl Microbiol* 2004;96:328-39.
7. Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, Ngo-Thi NA, Vreeswijk T van, Stammler M, et al. Prospective study of the performance of vibrational spectroscopy for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2003;41:324-9.
8. Seltmann G, Beer W, Claus H, Seifert H. Comparative classification of *Acinetobacter baumannii* strains using seven different typing methods. *Zentralbl Bakteriol* 1995;282:372-83.
9. Kummerle M, Scherer S, Seiler H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:2207-14.
10. Wenning M, Seiler H, Scherer S. Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:4717-21.
11. Sandt C, Sockalingum GD, Aubert D, Lapan H, Lepouse C, Jaussaud M, et al. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of *Candida albicans* strains isolated in intensive care units. *J Clin Microbiol* 2003;41:954-9.
12. Lemmer K, Naumann D, Raddatz B, Tintelnot K. Molecular typing of *Cryptococcus neoformans* by PCR fingerprinting in comparison with serotyping and Fourier transform infrared-spectroscopy-based phenotyping. *Med Mycol* 2004;42:135-47.

**Dr. C.H.W. Klaassen<sup>1</sup>, moleculair bioloog**

**Dr. A.M. Horrevorts<sup>1</sup>, medisch microbioloog**

1. Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, tevens Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Nijmegen.

Correspondentieadres: dr. C.H.W. Klaassen, tel.: (024) 365 75 14, fax: (024) 365 75 16, e-mail: c.klaassen@cwz.nl.

### Dankwoord

*De totstandkoming van dit werk is mede mogelijk gemaakt met de hulp van J. Schmitt en M. Eiden van Synthon GmbH te Heidelberg, Duitsland en A. Piry en M. Boese van Bruker Optics GmbH te Ettlingen, Duitsland.*

# Betekenis van moleculaire technieken voor de diagnostiek van CMV-ziekte

M.W.H. WULF, J.S. KALPOE, J.M.D. GALAMA, A.C.M. KROES, W.J.G. MELCHERS, E.C.J. CLAAS

## Samenvatting

**Cytomegalovirus (CMV) kan bij immunogecompromiteerde patiënten ernstige infecties veroorzaken. Succesvolle pre-emptieve behandeling staat of valt met de beschikbaarheid van goede diagnostische tests. Kwantitatieve CMV-DNA-bepalingen (virale load) lijken een goed alternatief voor de toe nu toe gebruikte pp65-bepaling. De precieze correlatie tussen deze twee tests is niet bekend, maar zeker is dat de kinetiek van de CMV-load moet worden gebruikt bij de interpretatie van deze tests.**

Trefwoorden: Cytomegalovirus; viral load; CMV-pp65-antigeen; moleculaire diagnostiek

## Inleiding

Humaan Cytomegalovirus is een algemeen voorkomend herpesvirus. In Nederland heeft circa 80 procent van de volwassen bevolking antistoffen tegen het virus, wat aangeeft dat zij latent drager zijn. Infecties bij immunocompetente personen komen in uiteenlopende vormen voor en verlopen in het algemeen mild. Bij patiënten met een ernstig gestoorde cellulaire immuunrespons kunnen zowel primo-infecties als reactivaties een ernstig beloop hebben. Het ontbreken van een adequate cellulaire immuunrespons leidt tot een ongecontroleerde replicatie van het virus met uitgebreide weefselschade tot gevolg. Dit proces wordt aangeduid als CMV-ziekte. Vooral patiënten met een orgaan- of beenmergtransplantatie lopen dit risico.

In de afgelopen decennia is grote vooruitgang geboekt in de preventie en behandeling van CMV-infectie en CMV-ziekte. Antivirale behandeling met middelen als (val)ganciclovir en foscarnet speelt een grote rol bij het beheersen van dit probleem. Profylactische toediening van deze middelen is sinds het beschikbaar komen van valganciclovir mogelijk, maar aan het toedienen van dit middel aan grote groepen hoogrisicopatiënten kleefft het risico van toxiciteit, met name bij beenmergtransplantatiepatiënten, en geeft een verhoogd risico op resistentievorming. Bovendien is valganciclovir duur (preventieve dosering 900 mg 1 dd kost € 49,26 per dag).<sup>1</sup> Een alternatieve benadering is pre-emptieve therapie. Pre-emptieve therapie is het starten van de medicatie bij een vroeg diagnostisch signaal van CMV-infectie c.q. reactivatie. Deze strategie staat of valt met de beschikbaarheid van een diagnostische test met een goede voorspellende waarde voor CMV-ziekte. De komst van de CMV-antigeenbepaling (pp65) was hierin een belangrijke stap voorwaarts. Deze test is echter arbeidsintensief, moet worden uitgevoerd op vers materiaal en het aflezen vereist een zekere expertise. Bovendien is deze test minder betrouwbaar bij leukopene patiënten.<sup>2</sup> Inmiddels is duidelijk geworden dat moleculaire technieken hier een belangrijke bijdrage kunnen leveren.

## Moleculaire technieken en de diagnostiek van CMV-ziekte

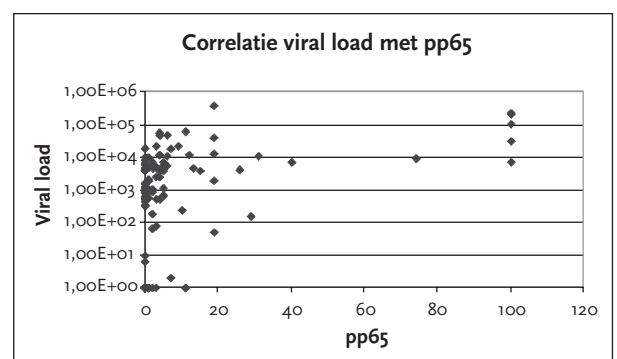
De ideale diagnostische test voor CMV in de context van pre-emptieve therapie bij transplantatiepatiënten zou aan de

volgende criteria moeten voldoen: gemakkelijk uit te voeren, reproduceerbare resultaten, geschikt voor leukopene patiënten en zodanig sensitief dat op tijd kan worden gestart met therapie. Bovendien moet de bepaling snel kunnen worden uitgevoerd, omdat de tijd tussen de detectie van CMV-DNA en het ontwikkelen van CMV-ziekte kort kan zijn (< 7 dagen). Aan de andere kant moet onnodige behandeling met toxische middelen worden voorkomen.

Kwalitatieve *polymerase chain reactions* (PCR's) op CMV-DNA op bloed en plasma gaven tegenstrijdige resultaten<sup>3</sup> en bleken een slechte voorspellende waarde te hebben voor de ontwikkeling van CMV-ziekte.<sup>4</sup> Immers, een positieve CMV-DNA-PCR is niet direct gerelateerd aan actieve replicatie. Een kwalitatieve amplificatie van mRNA, zoals pp67-NASBA-assay is dat wel. Niettemin blijft het resultaat kwalitatief.

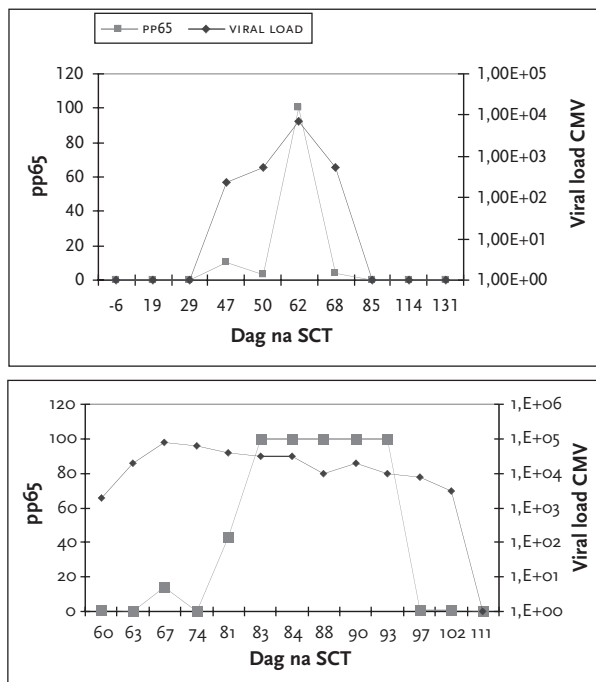
Kwantitatieve essays (CMV-DNA-loadbepalingen) zijn veelbelovend, hoewel een directe koppeling tussen de pp65-waarde en de hoogte van de virale load niet eenvoudig blijkt. Dat een eenvoudig lineair verband niet bestaat, laat een zogeheten 'scatter-plot' van een analyse van alle monsters van pp65-positieve patiënten in Nijmegen zien over een periode van zes maanden (figuur 1). Bij longitudinale analyse per patiënt, wanneer het verloop van load en pp65 in de tijd worden gevolgd, blijkt er wel een goede correlatie te zijn. Alle patiënten met een positieve pp65 (> 3) hebben ook een posi-

Figuur 1. Scatter-plot van retrospectieve analyse van pp65 versus CMV-load (kopieën/ml) van alle patiënten met een positieve pp65 over een periode van zes maanden (in het totaal 224 monsters van 32 patiënten). Opvallend is dat regelmatig een positieve virale load wordt gevonden bij een negatieve pp65.



Figuur 2. Longitudinale analyse stamceltransplantatiepatiënten.

Twee analyses van CMV-reativatie bij stamceltransplantatiepatiënten. X-as = dag na stamceltransplantatie, linker Y-as pp65-uitslag (aantal positieve cellen/150.000), rechter Y-as viral load (kopieën/ml).



tieve viral load. Ter illustratie in *figuur 2* het verloop van CMV-load en pp65 in de tijd bij twee stamceltransplantatiepatiënten. Duidelijk is dat de dynamiek van pp65 en CMV-load verschilt, ook tussen patiënten.

Bij een prospectieve evaluatie waarbij van alle patiënten bij wie een pp65 werd aangevraagd ook een CMV-load werd gedaan, bleek echter dat ook patiënten die geen positieve pp65 kregen en die geen CMV-ziekte ontwikkelden, wel positieve viral load kunnen hebben. Daarom moet een grenswaarde worden bepaald voor het starten van pre-emptieve therapie. Door gebruik te maken van een *receiver operating characteristic* (ROC)-curve kan een indruk worden gekregen van afkappunten.<sup>5</sup> Voorts blijkt niet alleen de hoogte van de load, maar ook de mate van stijging belangrijk voor het risico op CMV-ziekte.<sup>5-9</sup>

In het al eerder aangehaalde artikel van Kalpoe *et al*<sup>5</sup> wordt vermeld dat bij *solid organ transplant*-patiënten (SOT) in Leiden, indien sprake is van een primaire infectie, iedere load een indicatie is voor behandeling. Het betreffende manuscript beschrijft het pre-emptieve beleid zoals dat in Leiden strikt op geleide van CMV-DNA-loads wordt gevoerd. In Nijmegen wordt bij de niertransplantatiepatiënten een ander beleid gevoerd. Na transplantatie krijgen alle patiënten met een verhoogd risico op primaire CMV-infectie (seropositieve donor en een seronegatieve ontvanger) gedurende drie maanden profylactisch valganciclovir. Indien na drie maanden de immuunsuppressie kan worden afgebouwd, waarbij in het bijzonder middelen met een sterke anti-T-celactiviteit worden gestopt, wordt ook de valganciclovir gestopt. Bij deze groep was het voorheen gebruikelijk om op indicatie – dat wil zeggen bij kliniek passend bij CMV-ziekte<sup>10</sup> – een pp65-bepaling te doen. Indien deze positief was, werd aan de hand van de kliniek en het verloop van de pp65 besloten of de patiënt al dan niet therapeutisch ganciclovir kreeg. Bij in totaal vijf van deze patiënten werd vier maal een symptomatische milde infectie doorgemaakt, waarbij CMV loads vari-

erden van 0 tot 10<sup>3</sup> kopieën/ml. De twee patiënten met een negatieve viral load lieten wel een seroconversie zien, de patiënten met een positieve load een snelle daling. Slechts bij één patiënt werd een load gevonden van 10<sup>4</sup> kopieën/ml die binnen één week doorsteeg naar 10<sup>5</sup> kopieën/ml. Bij deze patiënt gaf deze stijging in combinatie met een achteruitgang van de nierfunctie en een persisterende koorts aanleiding tot behandeling. Bij primaire infecties geldt weliswaar dat een positieve viral load een bewijs is voor infectie, maar dat het van de omstandigheden afhangt of er een indicatie voor behandeling is. Wel lijkt het raadzaam bij patiënten een intensieve monitoring te doen van twee keer per week een viral-loadbepaling.

### Kwantitatieve PCR: eisen aan een betrouwbare bepaling

Kwantitatieve bepaling van CMV DNA met de real-time PCR-techniek verdient de voorkeur. Voordeel van de real-time-PCR-techniek is onder andere dat grote aantallen monsters tegelijk worden gedraaid zonder risico op kruisbesmettingen. De hoeveelheid CMV-DNA kan worden gekwantificeerd met behulp van een bekende standaard, waardoor ook reproduceerbaarheid tussen ziekenhuizen mogelijk zou moeten zijn. Daarnaast heeft deze bepaling ook een groot dynamisch bereik en een snel resultaat.

Een interne controle op de DNA-isolatieprocedure en remming in de amplificatie zal vals-negatieve uitslagen voorkomen. In diverse instituten wordt hierbij gebruikgemaakt van het zeehondenherpesvirus (PhHV).<sup>11</sup> Deze controle heeft geen invloed op de sensitiviteit van de test en kruisreageert niet met de bekende andere humane herpesviridae.<sup>5</sup>

Voor het bepalen van de CMV-DNA-load kan gebruik worden gemaakt van plasma of volbloed. De sensitiviteit hiervan lijkt vergelijkbaar.<sup>5,7</sup> Plasma heeft als voordeel dat het homogener is dan volbloed, dat immers variatie binnen de leukocytenaantallen kent.

### Conclusies

De kwantitatieve CMV-DNA-bepaling lijkt een goede manier van monitoren voor CMV-ziekte mits er duidelijke drempelwaarden bekend zijn, gekoppeld aan gegevens over het verloop van de viral load in de tijd. Voor de interpretatie van de uitslag blijft een goede communicatie met de kliniek en bekendheid met lokaal toegepaste protocollen essentieel wat betreft gebruik van antivirale middelen en toegepast immuunsuppressie.

### Summary

#### *Impact of molecular diagnostic tests on the management of Cytomegalovirus infection*

*Successful pre-emptive CMV therapy in transplant patients depends on the availability of sensitive, specific and timely diagnostic tests for CMV infections. The pp65 antigenemia assay has been used for this purpose with considerable success. Quantitative molecular diagnostic tests based on real-time CMV-DNA PCR is currently regarded to be an alternative diagnostic approach. Precise relationship between those methods has still to be defined. Kinetic criteria need to be included in clinical guidelines.*

### Referenties

1. Kroes ACM, Valganciclovir. Orale behandeling van infecties door Cytomegalovirus. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde* 2004;25:1236-9.
2. Manteiga R, Martino R, Sureda A, Labeaga R, Brunet S, Sierra J, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided pre-emptive treatment with ganciclovir

- after allogeneic stem transplantation: a single-center experience. Bone Marrow Transplant 1998;22:899-904.
3. Grundy JE, Ehrnst A, Einsele H, Emery VC, Hebart H, Prentice HG, et al. A three-center European external quality control study of PCR for detection of Cytomegalovirus DNA in blood. J Clin Microbiol 1996;34(5):1166-70.
  4. Boeckh M, Boivin G. Quantitation of Cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. Clin Microbiol Rev 1998;11:533-4.
  5. Kalpoe JS, Kroes AC, Jong MD de, Schinkel J, Brouwer CS de, Beersma MF, et al. Validation of clinical application of Cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. J Clin Microbiol 2004;42:1498-504.
  6. Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschning M, Enzinger G, Eibl M, Linkesch W, Dornbusch HJ, et al. Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays. Journal of clinical virology 2001;20:49-57.
  7. Boeckh M, Huang ML, Ferrenberg J, Stevens-Ayers T, Stensland L, Garrett Nichols W, et al. Optimization of Quantitative Detection of Cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology 2004;42:1142-8.
  8. Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop Cytomegalovirus disease after transplantation. The Lancet 2000;355:2032-6.
  9. Cortez KJ, Fischer SH, Fahle GA, Calhoun LB, Childs RW, Barrett AJ, et al. Clinical trial of quantitative real-time polymerase chain reaction for detection of Cytomegalovirus in peripheral blood of allogeneic hematopoietic stem-cell recipients Journal of Infectious Diseases 2003;188:967-72.
  10. Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of Cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. Clin Infect Dis 2002;34:1094-7.
  11. Doornum GJJ van, Guldemeester J, Osterhaus ADME, Niesters HGM. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. J Clin Microbiol 2003;41:576-80.

**M.W.H. Wulf, arts-microbioloog i.o.**

**J.S. Kalpoe<sup>2</sup>, arts-microbioloog i.o.**

**Prof. dr. J.M.D. Galama<sup>1</sup>, arts-viroloog**

**Prof. dr. A.C.M. Kroes<sup>2</sup>, arts-viroloog**

**Dr. W.J.G. Melchers<sup>1</sup>, moleculair bioloog**

**Dr. E.C.J. Claas<sup>2</sup>, moleculair bioloog**

- 1 Nijmeegs Universitair Centrum voor Infectieziekten, Afdeling Medische Microbiologie, UMC St Radboud, Nijmegen.
- 2 Leids Universitair Medisch Centrum, Afdeling Medische Microbiologie, Leiden.

*Correspondentieadres: M.W.H. Wulf, Postbus 9101, 5600 HB Nijmegen, tel.: (024) 361 43 56, fax: (024) 354 02 16, e-mail: m.wulf@mmb.umcn.nl.*

## The Need for Speed in Medical Microbiology

Donderdag 17 februari 2005

12e symposium

Nederlandse Vereniging  
Arts-assistenten Medische Microbiologie



Locatie  
Koninklijke Nederlandse Academie van  
Wetenschappen Amsterdam

### DOELGROEP

Artsen-microbioloog, infectiologen, moleculair biologen, allen die voor een van deze specialismen in opleiding zijn en overige belangstellenden.

### ACCREDITATIE

Dit symposium is geaccrediteerd door de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (5 punten). Accreditatie is aangevraagd bij de Nederlandsche Internisten Vereniging.

### INSCHRIJVING

Maak 40 euro over op bankrekening 46.07.21.194 t.n.v. de stichting O.A.M.M. te Utrecht. Deelname is gratis voor leden van de NVAMM. Vermeld uw e-mailadres bij mededelingen. Indien uw werkgever betaalt uw naam laten vermelden! Aanmelding via e-mail naar: NVAMM2005@hotmail.com onder vermelding van deelname symposium NVAMM, uw naam en de instelling waar u werkzaam bent.

### INLICHTINGEN

NVAMM2005@hotmail.com of telefonisch met Bram Diederens, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Tilburg. Telefoon: 076-595 15 16

# Dikke druppel: malaria en een worm?

H.F.L. WERTHEIM, A. PRONK, L. VAN LIESHOUT, R.W. VREEDE

## Casus

Een 20-jarige Afrikaanse man uit Malawi wordt gezien door de huisarts in verband met subfebriele temperatuur. De man is sinds één week in Nederland en zal twee maanden hier verblijven in het kader van een hulpverleningsprogramma. De patiënt meldt zelf dat hij malaria heeft. Het is echter anamnestic niet te achterhalen welk soort malaria en of deze ooit medicamenteus is behandeld. Verdere anamnese en uitgebreid lichamelijk onderzoek leveren geen bijzonderheden op. De huisarts besluit wel een dikke druppel en een uitstrijk in te sturen voor malariadiagnostiek.

De preparaten komen tijdens het pinksterweekend van 2004 binnen. De preparaten worden gekleurd volgens de methode van Giemsa. De analist vindt na lang zoeken één gametocyt in de dikke druppel, gelijkend op die van *Plasmodium falciparum* (figuur 1). In de uitstrijk worden geen trofozoïeten aangetroffen. Wel is de malaria-sneltest (NOW malaria-antigeentest, Binax, Portland, Maine, VS) zwak positief. De huisarts wordt geïnformeerd over deze uitslag, met de interpretatie dat er geen uitsluitel kan worden gegeven of er sprake is van een actieve malaria-infectie. Het advies is om opnieuw bloed in te sturen voor malariadiagnostiek.

Overige laboratoriumdiagnostiek: bezinkingssnelheid 13 mmol/l, leukocyten  $4,6 \times 10^9/l$ , erythrocyten  $5,5 \times 10^{12}/l$ , hemoglobine 9,4 mmol/l, hematocriet 0,46 l/l, MCV 83 fl, trombocyten  $168 \times 10^9/l$ . Differentiatie: 50 procent neutrofiële granulocyten, 1 procent eosinofiele granulocyten, 40 procent lymfocyten, en 9 procent monocyt. Creatinine 83  $\mu\text{mol}/l$ .

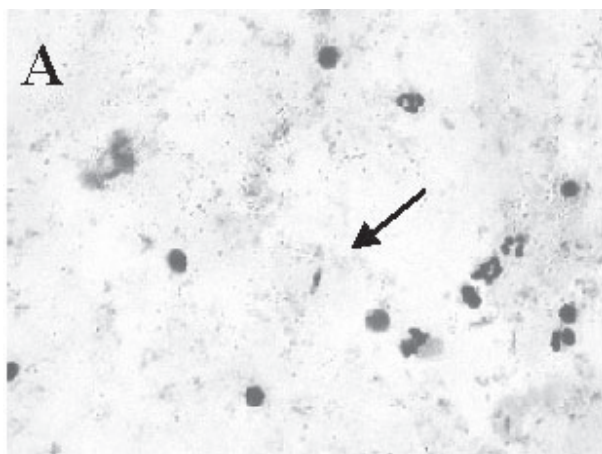
Echter, de volgende dag werd door de aandachtsanalist een trofozoïet aangetroffen in de dikke druppel, gelijkend op die van *P. falciparum*. Nu luidde de diagnose: actieve malaria-infectie met *P. falciparum*. Gezien de geringe ernst van de infectie en zeer lage parasitemie, werd besloten om deze patiënt op het logeeraadres drie dagen te behandelen met atovaquon/proguanil 250/100 mg (1 dd 4 tabletten).

De aandachtsanalist had echter nog een structuur aangetroffen in de dikke druppel, die hem deed denken aan microfilaria (figuur 2). Ook de dienstdoende microbioloog beoordeelde de structuur als suggestief voor microfilaria. De Giemsa-kleuring belette ons de schede te beoordelen. Er waren geen preparaten meer beschikbaar voor een hematoxiline-eosinekleuring. Echter, er was twijfel over de diagnose vanwege de afwijkende morfologie en besloten werd een foto van het preparaat te laten beoordelen door de afdeling Parasitologie van het Leids Universitair Medisch Centrum (zie figuur 2). Aldaar wordt geconcludeerd dat dit geen microfilaria betreft, maar een schimmel behorende tot de groep *Helicosporum*. Deze is te onderscheiden van microfilaria vanwege de kleinere afmeting, de ligging, het ontbreken van duidelijke kernen alsmede een kop- of staartstructuur.

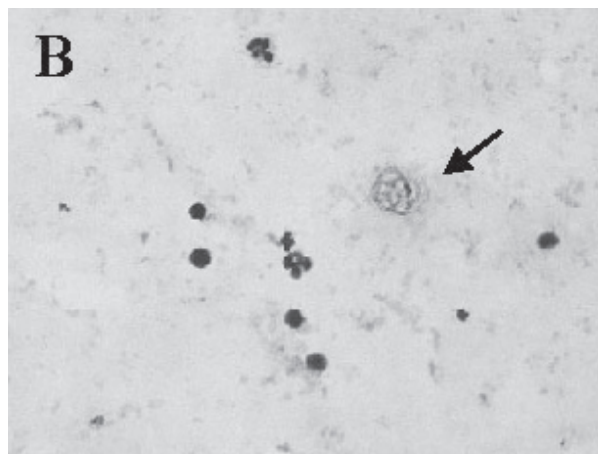
## Bespreking

Gezien de twijfel die kan ontstaan rondom een dergelijk artefact, lijkt het ons zinnig deze casus met u te delen. *Wuchereria bancrofti* is endemisch in Malawi, waar de patiënt woonachtig is. Reden te meer om te twijfelen. *Helicosporum* komt wijdverspreid voor en is een berucht artefact in hematologiepreparaten.<sup>1</sup> In het algemeen zijn deze conidia (niet mycelium) van *Helicosporum* spp. relatief klein en hebben ze onregelmatige kernen, in tegenstelling tot die van microfilaria. Via aerogene verspreiding kunnen zij op objectglaasjes terecht komen en uiteindelijk worden meegekleurd in de routinediagnostiek van onder andere de hematologie. Dat deze schimmel vaker wordt verward met microfilaria, werd recentelijk geïllustreerd door de uitkomst van monster A298 in de parasitologische rondzending van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (2004-2). Er zaten geen parasieten in het rondgestuurde materiaal. Toch meenden drie van de 88 deelnemers microfilaria te zien in de dikke druppel en/of de uitstrijk. Een bijgeleverde foto maakte duidelijk dat het ook hier een *Helicosporum* betrof (J.P. Verhave, brief aan de deelnemers van deze rondzending

Figuur 1. Gametocyt in dikke druppel (Giemsa 1000 x).



Figuur 2. Microfilaria? (Giemsa 1000 x).



2004-2). Voor meer informatie over dit artefact verwijzen we u naar de website van het CDC (zie: [http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/ImageLibrary/Filariasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/DPDX/HTML/ImageLibrary/Filariasis_il.htm)). De patiënt heeft zijn atovaquon/proguanil-kuur afgemaakt. Een controlepreparaat liet geen malariaparasieten meer zien, noch artefacten.

#### Referenties

1. Daly JJ et al. Free-living fungi as artifacts on hematology preparations. *Am J Med Technol.* 1978;44(12):1160-62.

**H.F.L. Wertheim<sup>1</sup>, arts-microbioloog i.o.**

**A. Pronk<sup>2</sup>, analist**

**Dr. R.W. Vreede<sup>2</sup>, arts-microbioloog**

**L. van Lieshout<sup>3</sup>, parasitoloog**

- 1 Erasmus MC, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam, e-mail: [h.wertheim@erasmusmc.nl](mailto:h.wertheim@erasmusmc.nl) (correspondentieadres).
- 2 Reinier de Graaf Groep, Locatie Diagnostisch Centrum SSDZ, Delft.
- 3 Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.

## INGEZONDEN

# RIVM vernieuwt en intensificeert MRSA-surveillance

Het Nederlandse MRSA-beleid is tot nu toe zeer succesvol en wordt in toenemende mate door het buitenland op zijn waarde geschat. In Nederland wordt dit beleid gevoerd op basis van de richtlijnen van de NVMM voor de detectie van MRSA en van de Werkgroep Infectiepreventie (WIP) voor het voorkomen van verspreiding in zorginstellingen. De surveillance wordt uitgevoerd door het RIVM op basis van de ingestuurde isolaten vanuit de microbiologische laboratoria. Deze surveillance vormt een belangrijke schakel voor het met succes continueren van het Nederlandse MRSA-beleid. De uitkomsten zijn immers onmisbaar voor de evaluatie en bijstelling van de richtlijn van de WIP. Het aantal MRSA-isolaten in Nederland neemt de laatste jaren toe. Recente cijfers van het RIVM laten zien dat er in 2003 bijna drie keer zoveel MRSA-isolaten waren als in 2001 en 2000. Enerzijds kan deze toename worden verklaard door een verbeterde detectie en inzending van isolaten na de introductie van de NVMM-richtlijn voor de detectie van MRSA in Nederland in 2002. Anderzijds wordt deze toename deels verklaard door een uitgebreide epidemie in de regio Rijnmond. Deze is dankzij een intensief search- en destroy-beleid inmiddels onder controle. Opvallend is dat het aantal MRSA-isolaten dat direct aan een verblijf in een ziekenhuis in het buitenland kan worden gerelateerd, sterk is gedaald van 65% in 1990 tot circa 20% in 2003. Dit zou kunnen betekenen dat er meer zogenaamde 'Nederlandse' stammen circuleren, maar het kan ook een andere, nader te identificeren oorzaak hebben. In toenemende mate wordt in binnen- en buitenland melding gemaakt van zogenaamde *community-acquired* MRSA. Indien dit een substantieel aantal wordt of indien MRSA endemisch wordt in de Nederlandse ziekenhuizen, zou dit een aanpassing van het beleid noodzakelijk kunnen maken. Daarom is het van belang een nauwkeurig beeld te hebben van de omvang en de aard van het voorkomen van MRSA in Nederland.

De surveillance is derhalve geoptimaliseerd. De vragenlijst is herzien en de nieuwe versie is sinds 1 mei 2004 digitaal beschikbaar op [www.rivm.nl/MRSA](http://www.rivm.nl/MRSA). Gevraagd wordt de ingevulde vragenlijst tezamen met het aanvraagformulier en het MRSA-isolaat naar het RIVM te zenden. Door de vragenlijst via de website toegankelijk te maken, is het ook mogelijk

geworden om de vragenlijst digitaal in te vullen en via e-mail te versturen. Als drie weken na het verzenden van het MRSA-isolaat de vragenlijst nog niet bij het RIVM is ontvangen of onvolledig is ingevuld, zal de aanvrager worden opgebeld met het verzoek de ingevulde vragenlijst alsnog te verzenden. Op deze manier hopen we de kwaliteit van de gegevens te verbeteren en de respons op de vragenlijst te vergroten, zodat we in de toekomst meer inzicht zullen verkrijgen in de epidemiologie van MRSA in Nederland. Regelmatig zal er een overzicht van de gegevens worden gepresenteerd in het Infectieziekten Bulletin en op de genoemde website. Daarnaast is het voor deelnemers natuurlijk altijd mogelijk contact op te nemen met het RIVM om specifieke vragen over MRSA te stellen. Alleen met de medewerking van alle artsen-microbioloog en ziekenhuishygiënist kunnen wij een succesvol nationaal MRSA-beleid blijven realiseren!

Desiree Beaujean, beleidsmedewerker MRSA-surveillance RIVM, Bilthoven

Wim Wannet, microbioloog RIVM, Bilthoven

Jan Kluytmans, arts-microbioloog Amphia Ziekenhuis, Breda



# Infectieziekten en Medische Microbiologie: in medio virtus?

PROF. DR. B.J. KULLBERG

**Benoemd tot hoogleraar Interne Geneeskunde, in het bijzonder de Infectieziekten, aan het Universitair Medisch Centrum St Radboud te Nijmegen. Oratie uitgesproken op 3 september 2004.**

Meneer de rector magnificus, meneer de voorzitter van het College van Bestuur, dames en heren,

Mijn eerste opleider, Dr. Han Roos, liep op vrijdagochtend visite. Met enkele nadrukkelijk geformuleerde en goedgekeurde vragen aan de patiënt placht hij dan de cruciale informatie los te krijgen die tot dat moment onopgemerkt was gebleven, om zo niet zelden uit een diagnostische impasse te komen. Speciaal voor dat doel droeg de hoofdzuster op vrijdag tijdens de visite een krukje mee, dat naast het bed gezet werd voor dokter Roos, wanneer hij zijn anamnestiche expertise zou inzetten.

Recentelijk, ruim twintig jaar later, hoorde ik één van de door mij opgeleide staffleden de internist in opleiding terugsturen naar een patiënte, met de opdracht een betere anamnese af te nemen naar de mogelijke oorzaken van haar holtevormende longafwijkingen. De patiënte bleek op vakantie in Amerika grotten met vleermuizen te hebben bezocht, een detail dat voor eerdere artsen onopgemerkt was gebleven. De diagnose histoplasmose, een zeldzame schimmelinfectie die in Nederland niet voorkomt, kon kort daarna worden bevestigd met gericht onderzoek naar het antigeen van de schimmel en een speciale kweek.

Deze metafoor van het krukje naast het bed omvat alle ingrediënten voor een inaugurele rede: de kunst van de anamnese die vaak meer relevante gegevens oplevert dan veel kostbaar diagnostisch onderzoek; de waarde van een specialistische vervolgopleiding door experts; de verbetering van de kwaliteit door extra aandacht voor de patiënt van de ervaren consulent op een krukje naast het bed, in plaats van een telefonisch advies; en de uitdaging om tot een precieze diagnose te komen, in plaats van het receptenblok te trekken en op goed geluk antibiotica voor te schrijven, die in dit geval niet geholpen zouden hebben.

Het is dus geen toeval dat het thema van vanmiddag niet de leunstoel van de kamergeleerde is, noch de Bank van de vrijgevestigde specialist, maar het krukje naast het bed van de patiënt.

Op dit historische moment, waarop de eerste leeropdracht officieel aanvaard wordt aan de nieuwe Radboud Universiteit Nijmegen, vraagt u zich wellicht af of die nieuwe naam Radboud niet juist is gekozen vanwege de toonaangevende rol van Nijmegen op het gebied van infectieziekten. Immers, de dichter en wetenschapper Sint Radboud, in het jaar 899 benoemd tot bisschop van Utrecht, had daar te kampen met een bezetting door de Noormannen. Met behulp van een vervloeking zond hij een epidemie naar de belegeraars, waaraan de indringers ten onder gingen. Helaas heeft het speur-

werk van Dr. Vincent Hunink aan onze universiteit geen aanwijzingen gevonden aan de hand waarvan we de verwekker van die epidemie alsnog kunnen achterhalen.

In de recentere geschiedenis heeft de Raad van Bestuur van het Universitair Medisch Centrum St Radboud de wijsheid en visie gehad om infectieziekten te identificeren als onderwerp van één van de vier topcentra aan het UMC. Die keuze is enerzijds gestoeld op de sterke Nijmeegse onderzoekstraditie en toonaangevende positie in de infectieziekten, dankzij personen als Van der Meer, De Pauw en Sauerwein, en anderzijds op het weer toenemend belang van infectieziekten in de wereld.

Dit topcentrum, het Nijmeegs Universitair Centrum voor Infectieziekten (NUCI) bundelt alle activiteiten op het gebied van infectieziekten, op de drie klassieke academische werkkterreinen: kennisontwikkeling (onderzoek), kennisoverdracht (onderwijs) en kennis-toepassing (patiëntenzorg). Het NUCI vervult nationaal en internationaal een voortrekkersrol op het gebied van infectieziekten en vormt zo één van de speerpunten van het UMC St Radboud.

Het NUCI heeft vijf thema's geïdentificeerd waarop zijn activiteiten zich concentreren; alle vijf zullen vandaag kort aan de orde komen.


**UMC St Radboud**  
 Nijmeegs Universitair Centrum voor Infectieziekten

## NUCI Onderzoeksthema's

NUCI 1 - Pathogenesis and inflammatory response

NUCI 2 - Invasive mycoses

NUCI 3 - Compromised host

NUCI 4 - Infection epidemiology and control

NUCI 5 - Poverty-related infections

## NUCI 5 - Poverty-related infections

Eén van die thema's is het gebied van *poverty-related infections*, armoede-gerelateerde infecties in ontwikkelingslanden. Het UMC St Radboud heeft een lange traditie op het gebied van de tropische geneeskunde en *international health*. Een belangrijk deel daarvan werd uitgevoerd in het Nijmegen Institute for International Health (NIIH), door onder meer de collegae Van Asten, Barten, Dolmans en Keuter. Maar er zijn vele andere, pluriforme activiteiten op dit terrein en er bestaat samenwerking met een groot aantal landen. Om die activi-

teiten te bundelen en te versterken, heeft het NUCI het initiatief genomen alle activiteiten op gebied van international health samen te brengen binnen in één centrum met een gecoördineerde beleidsvisie: NUCI-International Health, het nieuwe gezicht van het Nijmegen Institute for International Health. Hiermee wordt de internationale medische activiteit van het UMC St Radboud gefocust op één duidelijk omschreven aandachtsgebied, de tropische infectieziekten, in het bijzonder de poverty-related diseases, malaria, tuberculose en aids, en de daaraan gerelateerde gezondheidsproblematiek. Dat is belangrijk, nu internationaal infectieziekten opnieuw onder de aandacht zijn gekomen als een belangrijke rem op economische ontwikkeling van vele derde-wereldlanden. Deze bundeling van expertise in NUCI-International Health is gericht op intensieve, langdurige samenwerking van de verschillende afdelingen binnen het UMC St Radboud met een beperkt aantal buitenlandse instituten, zodat de kritische massa wordt vergroot. Deze bundeling en versterking heeft inmiddels geleid tot de toekenning van de coördinatiefunctie van het door NWO-WOTRO ingestelde internationale researchcentrum Poverty Related Infection-Oriented Research (PRIOR), onder leiding van collega Dr. André van der Ven.

### NUCI 3 - Compromised host

Een ander thema van het Nijmeegs Universitair Centrum voor Infectieziekten is dat van de immuungecompromiteerde patiënt. De dreiging van infectieziekten is de afgelopen decennia toegenomen, en dat is ten dele – hoe gek het misschien ook klinkt – toe te schrijven aan de medische vooruitgang. Hierbij gaat het in de westerse wereld vooral om de infectieuze complicaties van geavanceerde geneeskunde, zoals beenmerg- en orgaantransplantaties, traumatologie, oncologie en intensive care. Steeds ingewikkelder behandelingen gaan soms gepaard met infecties als complicatie, door tijdelijke onderdrukking van het afweersysteem. In de oratie van collega Verweij wordt hier in meer detail aandacht aan besteed. Deze ontwikkeling betekent dat in de ziekenhuizen steeds meer en geavanceerdere specialistische kennis nodig is om zulke complicaties op te vangen. Hier wordt bij uitstek het synergisme tussen de arts-microbioloog en de internist-infectioloog duidelijk.

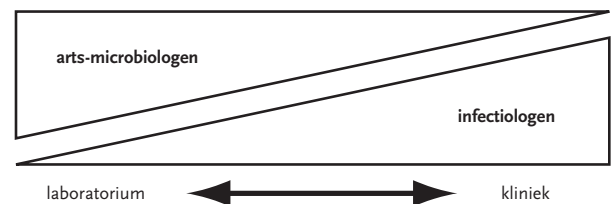
### In medio virtus?

Waarom eigenlijk twee specialisten binnen één vakgebied? In het begin van mijn voordracht heb ik u laten zien wat de meerwaarde is van de klinisch ervaren consultant op een krukje naast het bed. Het duale model, zoals dat in ons topcentrum werkt en dat mijns inziens voorbeeld moet staan voor een landelijke ontwikkeling, gaat uit van artsen-microbioloog en infectiologen die samen in één afdeling of expertisecentrum werken. Een dergelijke afdeling profiteert optimaal van de verschillende expertise van de betrokkenen.

De verdeling van klinische en paraklinische taken tussen de beide specialismen is daarbij niet dwingend en het vakgebied dient eerder als een continuüm gezien te worden dan als twee afzonderlijke entiteiten, waarbij iedere medewerker zich naar behoefte, persoonlijke voorkeur en talent profileert op een plaats in het spectrum tussen de twee uitersten van laboratorium en kliniek (zie *figuur 1*).

Uiterst links staat degene die door de één misschien een nerd genoemd zou worden, maar door de ander met recht een

Figuur 1.



topwetenschapper. De arts-microbioloog die excelleert in de moleculaire biologie, die zich thuis voelt in het laboratorium, en die patiëntenzorg maar een lastige bijzaak vindt. Via het spectrum van de meer praktijkgerichte diagnosticus en de klinische consultant aan de telefoon komen we aan het andere einde van het spectrum bij de arts-microbioloog die zijn consulterende rol vindt in de kliniek en dan bij voorkeur niet in de artsenkamer, maar werkelijk aan het ziekbed.

Andersom omvat het spectrum van infectiologen aan de uiterste rechterzijde de clinicus die geen idee heeft of *Brucella* Gram-positief of -negatief is, maar wel de gedreven en invloed begeleider is van zijn chronisch zieke aidspatiënten. Via de microbiologisch goed onderlegde clinicus komen we uiterst links in het spectrum de infectiologen tegen die in het laboratorium een volwaardige gesprekspartner zijn, maar die niet extra gelukkig worden van een hele dag op de polikliniek.

Juist dit spectrum van specialisten binnen één centrum vormt een team dat het hele veld van de infectieziekten bestrijkt. Dat daarbij in één team een meer basaal geïnteresseerde infectioloog verder naar links op de schaal zit dan een klinisch gedreven arts-microbioloog, doet niet ter zake. Sterker nog, dat illustreert bij uitstek dat individueel talent en interesse de beste basis vormen voor een optimale ontplooiing en satisfactie in het werk. De voortreffelijkheid (virtus) ligt hier dus niet in het midden (in medio), maar juist in de uitersten.

Dit model, waarbij ieder zich inzet daar waar zijn talent optimaal wordt benut, is uiteraard breder toepasbaar dan alleen in de medische microbiologie en infectiologie. Ook binnen de interne geneeskunde, bij uitstek een specialisme met vele deelgebieden, zijn de talenten en interessegebieden gelukkig gespreid.

Laat mij u twee academische ziekenhuizen schetsen. Het eerste staat bij buitenstaanders bekend om zijn harde interne verhoudingen. De internist in opleiding die een patiënt met een schildklierandoening ziet, krijgt er genadeloos van langs als hij de lokale, internationaal vermaarde schildklierexpert niet informeert en raadpleegt over de patiënt. Maar doet hij dat wel, dan is hij in een half uur weer bijgepraat over het laatste internationale nieuws op schildkliergebied, en wordt de patiënt volgens die nieuwste inzichten behandeld. Zo profiteren alle drie de betrokkenen: assistent, expert, en vooral patiënt.

Het tweede ziekenhuis afficheert zichzelf graag als gemoedelijk. Hier hoeven wij niet zo nodig onze collega's op de vingers te kijken. Sterker nog, het is een blamage om hulp te moeten vragen bij een moeilijke patiënt. Zo behandelt de internist in opleiding zijn patiënt met een schildklierandoening zelf wel, met behulp van zijn oude collegedictaat en hij hoort er trots op te zijn dat hij de expert met diens nieuwlichterij buiten de deur heeft gehouden. Eergevoel wint het hier van leergierigheid en innovatie. Zo zijn onder het mom van gemoedelijkheid de muren tussen de afdelingen hoger dan ooit tevoren en de patiënt die aan de verkeerde kant van

de muur terecht is gekomen krijgt basiszorg in plaats van academische topzorg.

Dames en heren, het spreekt vanzelf dat beide voorbeelden fictief zijn; dit soort dingen komt natuurlijk niet in Nederland voor. Deze voorbeelden lijken meer op verhalen uit de mythologie, want het probleem is al duizenden jaren oud. Toen de Griekse held Theseus in dienst kwam van het Universitair Medisch Centrum Eleusis op Attika, waar professor Procrustes de leiding had, vond hij in dat ziekenhuis slechts één bed. Het bed had precies de juiste maat voor iedere patiënt. Wat er niet bijgezegd werd, is dat daartoe de patiënt die te lang was voor het bed werd afgezaagd, en wie te kort was, werd opgerekt. Een buitengewoon efficiënt model, dat moderne ziekenhuismanagers moet aanspreken en dat de minister waarschijnlijk graag door de kamer zou loodsen onder de pakkende term Zorg op Maat.

Het moderne UMC heeft vele bedden, waar de inzet en stimulering van een breed scala van talenten de waarborg biedt voor topzorg op ieder gebied. Die synergie gaat bovendien samen met maximale zelfontplooiing en arbeidssatisfactie van de medewerkers. Hoewel beide legenden, die van de schildklier en van Procrustes, geheel aan de fantasie ontsproten zijn, moge de les duidelijk zijn: vooruitgang is alleen te boeken door benutten van de diversiteit aan talenten. Opnieuw geldt hier dat de voortreffelijkheid (de virtus) niet bij de middelmaat ligt.

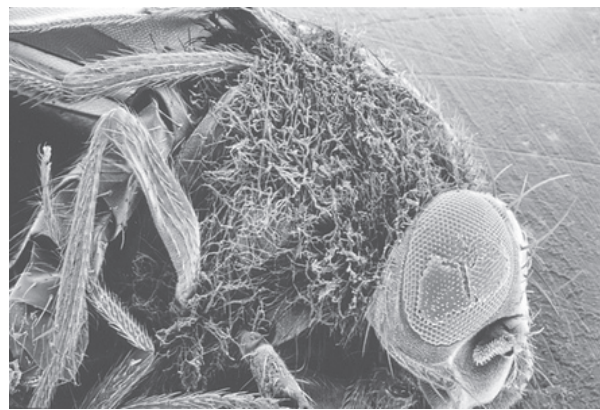
Een dergelijke omgeving is alleen te creëren door het vroegtijdig opsporen en koesteren van talenten. Een voorbeeld daarvan laat ik u zien aan de hand van twee andere aandachtsgebieden van het Nijmeegs Universitair Centrum voor Infectieziekten, dat van fundamenteel onderzoek naar het aangeboren afweersysteem en dat van invasieve, vaak levensbedreigende schimmelinfecties.

### **NUCI 1 - Pathogenesis and inflammatory response** **NUCI 2 - Invasive mycoses**

Terwijl voor veel mensen de schimmelsoort *Candida* slechts een lastige bewoner is van de nagels, de huid of de slijmvliezen, kan *Candida* species bij bepaalde patiëntengroepen in het ziekenhuis een dodelijke veroorzaker van sepsis zijn; *Candida* staat in de Verenigde Staten zelfs in de top vier van verwekkers bij sepsis, en is wereldwijd het micro-organisme met de hoogste sterfte wanneer het eenmaal in de bloedbaan zit. Terecht richt de aandacht in het NUCI zich daarom op het voorkómen van invasieve schimmelinfecties, onder leiding van professor Andreas Voss, het vroegtijdig opsporen daarvan, het terrein van professor Paul Verweij, en de aanpak bij patiënten met beenmergtransplantaties, door de groep van professor Ben de Pauw. Bovenal doen wij in het NUCI onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen tegen invasieve schimmelinfecties, zoals recentelijk met onze wereldwijde studie naar voriconazol en naar de rol van het afweersysteem tegen dergelijke infecties. Immers, alleen door het functioneren en het falen van de afweer te begrijpen, is het mogelijk ons beter te wapenen tegen zulke bedreigende infecties.

In dat onderzoek is collega Mihai Netea een centrale rol gaan spelen. Na het openen van de grenzen kwam hij destijds in de vakanties als medisch student uit Roemenië naar Nijmegen, om later hier cum laude te promoveren, de opleiding tot internist en infectioloog te volgen, en intussen richting te geven aan het wetenschappelijk onderzoek, eerder deze

Figuur 2.



week bekroond met een prestigieuze Vidi-subsidie. Eén van de meest cruciale ontdekkingen die wij de afgelopen jaren deden is de rol van Toll-like-receptoren in de afweer tegen schimmelinfecties.

Oorspronkelijk werd Toll als signaalstof voor de afweer ontdekt bij het fruitvliegje, en kunstmatig uitschakelen van Toll leidt ertoe dat de vlieg in de natuur binnen de kortste keren wordt overgroeid door schimmels; hier te zien als een net van *Aspergillus*-draden, die een verstikkende winterjas vormen (zie *figuur 2*).

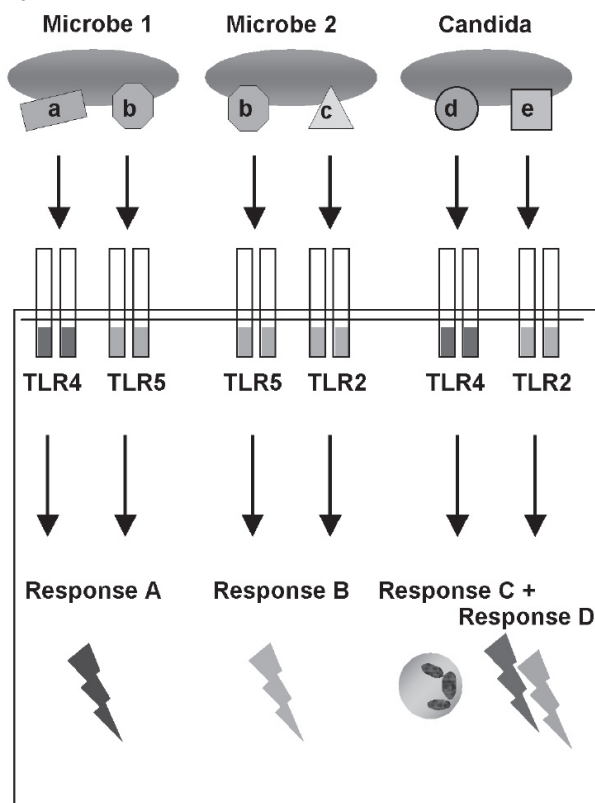
Wij weten nu dat de Toll-like-receptoren ook bij de mens wellicht de belangrijkste oppervlaktেমoleculen zijn om het binnendringen van infecties te detecteren. In ons onderzoek beschreef Mihai Netea niet alleen als eerste dat de Toll-like-receptoren, of TLRs, ook een rol spelen bij schimmelinfecties van de mens, maar hij droeg ook bij aan een drietal elementaire ontdekkingen.

Aangenomen werd dat de verschillende TLRs van de mens (er zijn er inmiddels tien beschreven), als ze indringers detecteren, alle tot dezelfde afweerreactie leiden. Maar uit het onderzoek van Mihai en anderen werd duidelijk dat de verschillende TLRs, afzonderlijk of in specifieke combinaties, verschillende functies van het immuunsysteem activeren. Zo leidt herkenning van het binnendringen van *Candida* door TLR2 tot het produceren van een groep van activerende moleculen, cytokinen, en herkenning door TLR4 tot het aantrekken van leukocyten om de infectie op te ruimen.

Op die manier kan een relatief klein arsenaal aan receptoren, door combinaties te vormen, een groot aantal verschillende indringers herkennen en van elkaar onderscheiden (iedere bacterie past op een verschillende combinatie van receptoren, als een sleutel in een slot), en anderzijds een grote diversiteit aan effecten teweeg brengen, specifiek gericht op iedere herkende verwekker, door aan het afweersysteem een specifieke combinatie van codes af te geven (zie *figuur 3*). Dit combineren van een zeer beperkt aantal bouwstenen tot een veelheid aan pluriforme signalen doet enigszins denken aan het vernuft achter de genetische code.

Een belangrijke ontdekking van Mihai was dat micro-organismen dit verdedigingssysteem kunnen ondermijnen wanneer zij de gastheer, de mens, binnendringen. Zo kan de schimmel *Aspergillus* (de winterjas van de fruitvlieg), door uit te groeien in de vorm van schimmeldraden (de harige jas), zich vermommen zodat hij niet meer herkend wordt door de afweerreceptor TLR4, maar alleen nog door het minder effectieve TLR2.

Figuur 3.



Candida kan in die misleiding van de gastheer nog een stap verder gaan, door bij herkenning via TLR2 juist de stof interleukine 10 te stimuleren en IFN-gamma te remmen, een zogenaamd T-helper2-profiel, dat de afweer tegen dit soort infecties onderdrukt in plaats van activeert. Juist door zich te laten herkennen misleidt de indringer dus het systeem, en verzwakt hij de afweer, in plaats van die te activeren. Dat is dus heel geraffineerd: niet stiekem binnensluipen als spion en onopgemerkt blijven, maar je juist laten herkennen en daarmee het systeem van binnenuit ontwrichten.

Dit bracht ons tot een tweede belangrijk nieuw inzicht, namelijk dat het stimuleren van een bepaalde combinatie van Toll-like-receptoren, de juiste code, bepaalt of er een gunstige Th1 dan wel een ongunstige, ziekmakende, Th2-respons ontstaat en – belangrijker nog – dat voor het sturen van die respons een andere groep lymfocyten ingezet wordt, de T-regulatorische cellen. Dit zijn cellen die tot nu toe gedacht werden alleen een rol te spelen bij de verworven, specifieke afweer, zoals pas verkregen wordt door bijvoorbeeld vaccinatie.

Een derde cruciale ontdekking is dat de werking van dit soort afweerreceptoren door genetische invloeden tussen mensen onderling kan verschillen, en wij vonden dat de genetische opmaak van de receptor TLR4 ten dele bepaalt wie wel en wie niet een Candida-sepsis zal krijgen in het ziekenhuis. Het is opvallend dat mensen met de genetische aanleg voor een heftige ontstekingsreactie juist in het voordeel zijn, zoals ook door Westendorp en Van Dissel was beschreven voor andere vormen van sepsis. En dat terwijl in de wereld van de intensive care juist geprobeerd wordt die sterke ontstekingsreactie te onderdrukken, omdat die verantwoordelijk geacht werd voor sepsis. Het model van Netea verklaart deze ogenschijnlijke paradox door duidelijk te maken dat de ontstekingsreactie juist in de vroegste fase van sepsis tekortschiet, en dat zal betekenen dat juist stimulatie van deze ontste-

kingsmediatoren, in plaats van onderdrukking, in de toekomst een belangrijker rol zal krijgen. Dit voorbeeld onderstreept hoe belangrijk het is te investeren in basaal onderzoek en zindelijk denken, voordat miljoenen uitgegeven worden aan klinische studies en behandelingen, die gedoemd zijn te mislukken of zelfs averechts werken.

Dus (i) oppervlaktereceptoren herkennen, door combinaties te vormen, specifieke indringers, (ii) ze geven speciaal op die indringers toegesnedene afweersignalen af, (iii) op het niveau van de combinatie van TLRs blijkt de bron te liggen van de al langer bekende sturing van afweer in gunstige of juist ongunstige richting, de T-helper1/T-helper2-balans, (iv) daarbij worden T-lymfocyten gebruikt die we alleen kennen van de verworven immuniteit, en (v) het micro-organisme, de schimmel, kan door vermommingen dit systeem de verkeerde kant op sturen.

Dit soort ontdekkingen betekent dat de zogenaamde aspecifieke afweer tegen infecties helemaal niet aspecifiek is, en dat die aspecifieke of innate immuniteit en dat wat we verworven, specifieke immuniteit noemen in werkelijkheid zeer nauw met elkaar verweven zijn. Zo wordt de hele immunologie, die in het beschrijvende denken van de mens voor het gemak was opgedeeld in afzonderlijke gebieden, een ondeelbaar en geraffineerd netwerk.

### Opleiding

Dames en heren studenten en specialisten in opleiding. Hoe maak je zo'n carrière van zomerstudent tot specialist, toponderzoeker, en winnaar van internationale onderzoeksprijzen?

In de eerste plaats is er de keus van universiteit. De discussie over het al dan niet instellen van topuniversiteiten in Nederland is deze week weer opgelaaid. Maar die discussie wordt op dit moment vooral gevoerd met defensieve argumenten, die gebaseerd zijn op de angst om een daluniversiteit genoemd te worden. Bovendien wordt de kern van de zaak vertroebeld door discussies over selectie aan de poort of hoogte van collegegeld. Het is een oude marketingtruc om kwaliteit en exclusiviteit te suggereren door beperking van de oplage of verhogen van de prijs, ongeacht de inhoud. Dat doen boekenclubs en modieuze kledinglabels, maar de Radboud Universiteit hoeft daar niet aan mee te doen. Echte kwaliteit moet van binnenuit zichtbaar worden. Daarom is het verheugend dat de visitatie van de Vereniging van Samenwerkende Nederlandse Universiteiten de opleiding Geneeskunde in Nijmegen met de beste punten beoordeelde. Eerder al scoorden de andere twee opleidingen van het UMC St Radboud het hoogst in Nederland, Biomedische Wetenschappen en Tandheelkunde. Eén UMC, drie opleidingen als beste beoordeeld door vakgenoten. Oordeelt u zelf maar over die topuniversiteiten.

Zo'n inhoudelijke visitatie van het onderwijs is een heel andere manier van meten dan de scoring van de wetenschappelijke citaties van de UMC's, waarover u gisteren in de krant heeft gelezen, het zogenaamde Rapport Van Raan. Belangrijkste uit dat rapport is de indrukwekkende prestatie van de acht Nederlandse UMC's (de academische ziekenhuizen), die samen goed zijn voor éénderde van al het wetenschappelijke onderzoek in Nederland, éénderde van het hele veld, van Sanskriet tot natuurkunde, en die bovendien internationaal allemaal kwalitatief ver boven het gemiddelde scoren. We maken in Nederland dus geen Lada's, zelfs geen Volkswagens; de UMC's maken alleen Bentleys, Volvo's en

Mercedessen. Wat u helaas morgen in de wetenschapbijlagen niet zult lezen, is het verschil in prijs tussen de producenten. Ik voorspel u dat u zult lezen waar de Bentleys gemaakt worden en dat Volvo's en Mercedessen dus ver onder de maat zijn. Maar tegen welke prijs? Als je in een UMC maar genoeg geld stopt en heel veel handwerkslieden in dienst neemt, kun je Bentleys maken. Maar of de klant (de belastingbetaler in dit geval) dan meer waar voor z'n geld krijgt dan voor een Volvo of Mercedes die een kwart daarvan kost, is nog maar de vraag.

Ook hier ligt de waarheid niet in de gemiddelde score. En inderdaad – dat verwacht u natuurlijk hier te horen – op het gebied van immunologie, dat is de categorie waarin het infectie- en afweeronderzoek wordt ingedeeld, scoort Nijmegen vlak na Utrecht het hoogst; een bevestiging voor het instellen van onze onderzoeksinstituten als NCMLS en NUCI.

Topuniversiteiten, differentiëren en excelleren in Nederland: ja. Maar dan in kwaliteitsopleidingen en in topcentra, liever dan één, zichzelf als exclusief afficherende universiteit aan te wijzen, die het marketingprincipe hanteert dat wat als moeilijk toegankelijk, duur of schaars geadverteerd wordt, vanzelf ook goed gaat lijken. Het unieke wetenschappelijke jaarverslag van de Radboud Universiteit laat zien dat de Nijmeegse keus voor profileren in een aantal topcentra een zeer succesvolle is en toont opnieuw dat ook hier geldt dat de voortreffelijkheid niet bij de middelmaat ligt.

Dat betekent wel, dames en heren studenten en specialisten in opleiding, dat wij onderweg hoge eisen aan u stellen. Het aantal wetenschappelijke publicaties per jaar groeit exponentieel. Zelfs over een oeroude ziekte als tuberculose: 1.700 nieuwe wetenschappelijke publicaties in het jaar 1985, via 2.900 in 1995 naar bijna 4.000 nieuwe publicaties in het jaar 2003: meer dan een verdubbeling van de hoeveelheid nieuwe kennis per jaar. Daarom neemt ook de capaciteit van de hard disks in nieuwe computers per jaar exponentieel toe. Maar helaas neemt ons brein maar een heel klein beetje toe tijdens het ouder worden. Dat leidt dus tot een structureel en bijna onoplosbaar probleem, dat een nieuwe attitude vereist.

De nieuwe dokter houdt niet op met leren na zes jaar, zij kan niet meer de generalist zijn, die alles kan en niets hoeft bij te leren. Ook stellen patiënten andere eisen. Globaal vertrouwen is steeds minder de basis om voor een bepaalde arts of een bepaald ziekenhuis te kiezen. De patiënt vraagt om deskundigheid voor zijn specifieke probleem. De nieuwe dokter is dus iemand die zijn te krappe hard disk voortdurend ververs, die de door internet geïnformeerde patiënt kan bijhouden en die zorg op maat levert, soms generalistisch en soms specialistisch. In combinatie met de toegenomen kennis en kunde kan dit alleen als we differentiëren. Dat geldt voor huisartsenpraktijken waarin differentiatie in kennis en kunde optreedt; dat geldt ook binnen een specialisme. In plaats van encyclopedische maar tekortschietende kennis komt er een waaiertje van kennis en kunde in de groep, die bovendien onderhouden moet worden. Dat vereist het aanleren van blijvende nieuwsgierigheid. En dat heeft ook consequenties voor de opleiding. In de interne geneeskunde is deze richting ingezet met de differentiatie in aandachtsgebieden binnen de opleiding, waaronder die in de infectieziekten.

## De levertraan-organisatie

Naast die nieuwe dokter is er gelukkig ook een nieuwe patiënt, die een efficiënte, patiëntgerichte ziekenhuisorganisatie verwacht. Dokters beseffen niet dat de huidige organisatie is opgebouwd uit historisch gegroeide processen, waarin het systeem en niet de patiënt centraal staat. Waarom mag de patiënt, die in spanning zit, pas over drie weken terugkomen voor de uitslag; waarom is er vier weken wachttijd voor een CT-scan; waarom doen we achter elkaar wat ook tegelijk kan? Waarom weten we niet tevoren welke onderzoeken op welke dag zullen worden verricht als we een patiënt daarvoor opnemen, en waarom weten we niet wanneer de opgenomen patiënt weer naar huis zal gaan? Het ziekenhuissysteem lijkt te werken volgens het levertraanprincipe: als het vies is, moet het wel goed zijn.

Dit is wat in technische termen een *push*-systeem heet: de patiënt wordt door het systeem geduwd als in een black box, en we zien wel wanneer hij er weer uitkomt; dit in plaats van een *pull*-systeem, waarbij de vraag van de patiënt bepaalt wat er wanneer gebeurt. Opnieuw dringt zich de vergelijking met het bed van Procrustes op: de zorg is echt op maat, alleen wordt de patiënt op de maat van het systeem gebracht, in plaats van andersom. Het is niet baanbrekend, het is allemaal al eerder gezegd, maar kennelijk niet luid genoeg en dus terecht nog eens treffend verwoord door het heldere rapport van TPG-topman Peter Bakker, in het project *Sneller Beter*. Deze nieuwlichterij afdoen met de uitspraak dat patiënten nu eenmaal geen pakjes zijn is een vorm van kortzichtigheid en gemakzucht.

De post wordt geleid ('gepulld') door mijn eis als klant dat mijn brief morgen bezorgd moet zijn, en niet door de vraag wanneer de chauffeur in Amsterdam nog een plaatsje vrij heeft, en of die behulpzame postbode in mijn wijk volgende week iets voor me kan regelen. En dat is precies wat we doen in de gezondheidszorg: we doen net alsof iedere brief uniek is, en gaan op ieder postkantoor verrast, maar met veel toewijding, rondbellen met de vraag of er nog iets te regelen is voor onze brief, liefst met een beetje voorrang. We verwarren de unieke inhoud van de brief met het vaste gegeven dat er iedere dag 100 brieven dezelfde kant op moeten en dat we daar niet iedere dag opnieuw voor hoeven te improviseren. Ondanks het feit dat geen liefdesbrief hetzelfde is, en dat niemand kan voorspellen wanneer u weer verliefd wordt, zorgt de post ervoor dat die brief morgen bezorgd wordt. Door alle schakels op elkaar af te stemmen en zich af te vragen wat de vraag van de klant is. En ook bij de post is de kwaliteit minstens zo belangrijk als de tijdigheid: niemand wil dat de snelheid ten koste gaat van een zoekgeraakte of op het verkeerde adres bezorgde brief: ook daarin zijn wij in de gezondheidszorg niet uniek.

Dus als je maar genoeg bijzondere en complexe gevallen hebt, zijn die samen ook weer standaard. Zelfs in onze topreferente organisatie met alleen maar bijzondere gevallen weet ik dat wij op onze polikliniek per dag vijf echo's aanvragen, en dat ik per week twee patiënten met mogelijk een zeldzame chronische meningitis heb, die ik samen met de neuroloog wil zien. We weten alleen nog niet wie vandaag die unieke patiënt zal zijn, maar dat hij er zal zijn, is zeker. En het pad kan al uitgestippeld zijn, leidend tot een uitslag vandaag, of desnoods overmorgen, in plaats van over drie weken.

Een ziekenhuis is geen bedrijf, de patiënt is geen klant en gezondheidszorg is geen product. Maar ook zonder die modetermen wordt deze nieuwe manier van denken beloond. Beloond door besparing van tijd, ergernis en gevoelens van onmacht, door verbetering van het resultaat voor de patiënt, en door toename van het werkplezier en gevoel van controle voor de medewerkers. Verbeteren van de efficiency is dus geen kwestie van harder werken, maar van harder denken. Het eerste dat moet veranderen zijn het fatalisme en het gebrek aan zelfkritiek, de gedachte dat de organisatie nu eenmaal zo in elkaar zit omdat het zo hoort. In het onderwijs hebben wij in Nijmegen een dergelijk proces achter de rug. Niet de docent staat meer centraal, met zijn losse hoorcollege dat toevallig op de weg van de student komt, maar een vooraf uitgestippeld, weloverwogen traject, waar het eindpunt voor de student centraal staat. Van push naar pull, met de eerder genoemde bekroning als resultaat. Nu is de beurt aan de patiëntenzorg, met de patiënt in het midden, en de dokter op het krukje ernaast.

#### **NUCI 4 – Infection epidemiology and control**

Reflecties over de organisatie en de ombuiging van een traditioneel push-systeem, brengen ons op het vierde thema van het NUCI, dat zich richt op infectieziekten-epidemiologie en *public health*. De wereld van de infectieziekten is sterk in beweging. Die dynamiek komt vooral door nieuwe en sneller opeenvolgende dreigingen. Recente gebeurtenissen met nieuwe, opduikende pathogenen als *Legionella*, SARS en vogelinfluenza hebben duidelijk gemaakt hoe groot het

belang is van bundeling van deskundigheid en bestuurlijke besluitvaardigheid.

De infectieziektenbestrijding in Nederland behoeft dringend versterking. Kennis op centraal en uitvoerend niveau, capaciteit en afstemming zijn onder de maat.

Bij de voorbereidingen op bioterrorisme en SARS in Nederland waren initieel de belangrijke initiatieven van de individuele deskundigen afkomstig, pas in tweede instantie door de overheid gevolgd. Daarentegen heeft bij de vogelinfluenza het door deskundigen geleide Outbreak Management Team slagvaardig beleid gemaakt, het belang illustrerend van een beleid dat primair aangestuurd wordt door toppers uit de wetenschappelijke wereld.

Voor dergelijke situaties is het instellen van een centraal orgaan, de Infectieziektenautoriteit, van het grootste belang. Hierin dienen de wetenschappelijke kennis en informatie gebundeld te worden en te leiden tot adviezen en aanwijzingen in geval van incidenten. Ook hier dus van een push-naar-pull-systeem. Het is daarbij een bron van zorg dat de minister lijkt aan te sturen op een bestuurlijke organisatie, gevestigd in een van de wetenschap en beroepsgroepen geïsoleerd instituut. Juist bij nieuwe, onbekende infectieziekten is de koppeling van technische deskundigheid, de nieuwste wetenschappelijke inzichten en bestuurlijke slagvaardigheid essentieel.

Dames en heren, wat begonnen is met een krukje naast het bed eindigt met een leerstoel. Het doel van die stoel is niet wezenlijk anders dan die van het krukje: kwaliteitsverbetering door gedrevenheid, met de patiënt centraal.

# Jan Nouwen krijgt GSK ICAAC-award 2004

Ook dit jaar zijn tijdens de 44<sup>ste</sup> *Interscience Conference for Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (ICAAC) in Washington DC prijzen uitgereikt voor de beste Nederlandse presentaties. Deze ICAAC-prijs is voor de tiende keer mogelijk gemaakt door de firma GlaxoSmithKline.

Bij de selectie werd gekeken naar originele bijdragen in de vorm van posters of *slide sessions*. Winnaars konden alleen degenen zijn die werken in een Nederlandse instelling, eerste auteur zijn van het abstract en zelf de presentatie verzorgden.

De jury bestond uit dr. Nico Hartwig, kinderinfectioloog in het Erasmus MC, prof. dr. Andreas Voss, arts-microbioloog in het UMC St Radboud en prof. dr. John Degener, arts-microbioloog in het Academisch Ziekenhuis Groningen. De jury zag 83 abstracts waarbij auteurs uit Nederland waren betrokken. Dit was 4% van in totaal ruim 2.100 abstracts, waarmee Nederland internationaal op dit congres zeer hoog scoorde. Op grond van de criteria voor de prijzen kwamen 63 inzendingen in aanmerking. We hebben hierbij kunnen vaststellen dat de aanvankelijk neergaande trend in inzendingen van de laatste jaren, die overigens ook algemeen tijdens dit congres te zien was, nu lijkt te zijn gestabiliseerd. Naar we hopen is dit een aanzet voor een weer opgaande trend in de komende jaren.

Er is een verschuiving opgetreden in de verdeling over de verschillende deelnemende centra. We hebben kunnen zien dat de combinatie UMC St Radboud/Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis het UMC Utrecht ruim is voorbijgestreefd met 21 versus 14 abstracts. Het is niet uitgesloten dat dit berust op natuurlijke golfbewegingen, zoals we deze geregeld zien in de wetenschappelijke productie van onderzoeksinstellingen.

Voor een jury is het bemoedigend te zien dat de meeste mensen die eerder een GSK ICAAC-award in de wacht hebben gesleept, nog steeds heel productief zijn. Te noemen zijn hier Helen Leavis en dr. Marc Bonten uit Utrecht, dr. Johan Mouton, Mihai Netea en prof. dr. Paul Verweij uit Nijmegen, en Rachida el Moussaoui uit Amsterdam.

De abstracts van Nederlandse bodem tijdens de ICAAC gaven geen volledig beeld van de activiteiten op het gebied van medische microbiologie en infectieziekten. Er gaat een forse zuigwerking uit van andere congressen, zoals de *European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* en andere, meer gefocuste bijeenkomsten.

De eerste prijs is gegaan naar Jan Nouwen van het Erasmus MC te Rotterdam. Hij kreeg deze prijs voor vijf posterpresentaties en een *slide session*. Het ging hierbij om epidemiologische onderzoeken waarin scherp gedefinieerd dragerschap van *Staphylococcus aureus* wordt gerelateerd aan risico's op infectie, genetische factoren, rookgedrag en sterfte. Voorts werd aangetoond dat de aanwezigheid van tonsillen een verklaring is voor falen van eradicatietherapie bij werkers in de gezondheidszorg. Het is begrijpelijk dat dit laatste aanleiding gaf tot enige controverse. Ten slotte werd aangetoond dat interferentiebehandeling met een niet-pathogene stam een oplossing kan zijn voor het verdrijven van een pathogene stam. Nouwen promoveerde op 8 december 2004 op

dit onderzoek. De prijs bestond uit een cheque van € 2.500,- en een abstract beeldhouwwerkje in de vorm van een onontwarbare knoop.

De twee overige prijzen, beide bestaand uit een kunstwerkje, zijn gegaan naar Diederik van de Beek uit het Academisch Medisch Centrum te Amsterdam en Debbie te Dorsthorst uit het UMC St Radboud en het Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis te Nijmegen.

Van de Beek presenteerde een poster met een opvallend mooie lay-out over de klinische verschijnselen en prognose van meningitis bij volwassenen. Het betrof een prognostisch multicenter onderzoek bij een grote serie patiënten. Het onderzoek is gerealiseerd binnen een samenwerkingsverband van de afdelingen Neurologie en Medische Microbiologie in het AMC. Het grote internationale belang van dit werk werd geïllustreerd door de vrijwel gelijktijdige publicatie van een artikel over dit onderwerp van de groep van Van de Beek in *The New England Journal of Medicine* en de presentatie tijdens de ICAAC.

Te Dorsthorst ontving een prijs voor vijf posters en een uitstekende presentatie. Onder andere liet zij voor het eerst met antifungale middelen in een diersmodel zien hoe de relatie farmacokinetiek/farmacodynamiek zich verhoudt tot het succes van behandeling van diepe infecties door schimmels en gisten. Voorts was de toepassing van een kwantitatieve PCR, die zij heeft gebruikt om in een *in-vivo*-model de respons van caspofungine op *Rhizopus* te meten, uniek te noemen.

Dank gaat ten slotte uit naar, naast de stichter van de prijs, alle betrokken farmaceutische bedrijven voor hun support voor deze feestelijke prijsuitreiking in een sfeer 'The Willard' in Washington DC. Een zeer geslaagde avond en een goed voorbeeld van een evenwichtig samengaan van bedrijfsleven en wetenschappelijke professie.

Mede namens de jury,  
prof. dr. John Degener

Foto genomen bij de uitreiking van de tiende GSK ICAAC-award 2004 in The Willard Hotel te Washington DC. De prijswinnaars en de jury v.l.n.r.: Diederik van de Beek, Nico Hartwig, Jan Nouwen, Debbie te Dorsthorst, Andreas Voss en John Degener.



# Het nut van dubbele kweekafname bij screening op MRSA

De commissie MRSA dankt collega Leenders *et al.* hartelijk voor het publiceren van hun bevindingen met betrekking tot het aantal MRSA-kweken bij gebruik van een ophopingsmedium.<sup>1</sup> De literatuur hierover is beperkt en daarom is het belangrijk dat dergelijke berichten worden gepubliceerd.

Zoals ook al aangegeven in de NVMM-richtlijn *Detectie van meticillineresistente Staphylococcus aureus* in Nederland, is het aantal kweken dat moet worden afgenomen onderwerp van discussie.<sup>2</sup> Het is duidelijk dat het gebruik van een ophopingsmedium (bouillon) de kans op fout-negatieve uitslagen significant verlaagt. Veel onderzoeken zijn verricht naar de vraag welk medium het meest geschikt is voor de isolatie van MRSA. Naar het optimale aantal kweken bij het gebruik van een ophopingsmedium zijn tot op heden geen prospectieve onderzoeken verricht. Het onderzoek van collega Leenders *et al.* is retrospectief uitgevoerd. Helaas zijn daardoor – zoals zij zelf ook aangeven – wellicht belangrijke gegevens niet meer terug te vinden. Bijvoorbeeld of het nu juist de eerste of de tweede kweek betrof wanneer slechts één van de twee kweken positief is. Daarnaast is gekozen voor een selectief ophopingsmedium dat qua samenstelling afwijkt van het voorschrift dat in de richtlijn is weergegeven; door het ontbreken van aztreonam en het verlagen van de ceftizoximeconcentratie is de bouillon minder selectief. Hierdoor is met name te verwachten dat de groei van Gram-negatieve staven minder goed wordt geremd. Verder is gekozen om alleen ophopingsmedia waarbij kleuromslag had plaatsgevonden af te enten en niet om alle media blind af te enten. Hoewel de richtlijn aangeeft dat dit een optie is, blijkt inmiddels dat niet altijd alle ophopingsmedia die levensvatbare MRSA bevatten, resulteren in een kleuromslag. Wat voor invloed deze keuzes op de sensitiviteit van de methode hebben gehad is onduidelijk.

Een prospectief onderzoek zou uitsluitsel kunnen geven over de vraag hoeveel kweken noodzakelijk zijn voor een optimale detectie van MRSA bij het gebruik van een ophopings-

medium. Bij voorkeur zou hier een goed gedefinieerd medium moeten worden ingezet met een optimale gevoeligheid. De commissie is zich bewust van het feit dat het afnemen van meer dan één set kweken zal leiden tot extra positieve bevindingen. Er is op dit moment echter onvoldoende onderbouwing dat het voor het succesvol voortzetten van het Nederlandse MRSA-beleid noodzakelijk is om meer dan één set kweken af te nemen wanneer men gebruikmaakt van een ophopingsmedium. Een analoge situatie bestaat ten aanzien van het aantal af te nemen bloedkweekflesjes. De meeste laboratoria volstaan met twee sets, hoewel is aangetoond dat je dan een klein percentage van de bacteriëmieën mist. Kosten en baten spelen een doorslaggevende rol bij dit soort afwegingen.

Voor de onderbouwing van het huidige beleid ten aanzien van MRSA is een aantal benodigde gegevens niet bekend. Totdat dergelijke gegevens bekend zijn blijft de commissie MRSA bij haar standpunt zoals weergegeven in de richtlijn: “Bij gebruik van een ophopingsmedium kan in principe met één afname worden volstaan.” Het is goed om te realiseren dat het eenieder vrij staat om meer te doen dan wat de richtlijn adviseert. Met andere woorden: meer dan één kweekafname mag, maar hoeft vooralsnog niet.

Commissie MRSA,

Arjanne van Griethuysen  
Jan Kluytmans  
Han de Neeling  
Christina Vandenbroucke-Grauls  
Greet Vos

## Referenties

1. Leenders ACAP, Pelk M, Janssen M, Renders NHM. Het nut van dubbele kweekafname bij screening op MRSA. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2004;12:40-3.
2. Griethuysen A van, Neeling H de, Vandenbroucke-Grauls C, Vos G, Kluytmans J. Richtlijn Detectie van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* in Nederland. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2003;11:58-64.



**11 juni 2004 - P.M. Ellerbroek**

*Cryptococcus neoformans* and neutrophil migration. Promotor: prof. dr. I.M. Hoepelman. Co-promotor: dr. F.E.J. Coenjaerts. Universitair Medisch Centrum Utrecht, afd. Interne Geneeskunde & Infectieziekten.

**23 juni 2004 - S.U.C. Sankatsing**

Limitations of current antiretroviral therapy in HIV-infection: the search for new strategies. Promotor: prof. dr. J.M.A. Lange. Co-promotor: dr. J.M.Prins. Academisch Medisch Centrum, Nationaal AIDS Therapie Evaluatie Centrum, Amsterdam.

**30 juni 2004 - J.A. Bogaards**

Modeling AIDS control strategies. Promotores: prof. dr. J. Goudsmit, prof. dr. P.M.M. Bossuyt. Academisch Medisch Centrum, afd. Humane retrovirologie, afdeling Klinische Epidemiologie en Biostatistiek, Amsterdam.

**4 september 2004 - R.J.M. Perenboom**

Health expectancies in the Netherlands. Promotor: prof. dr. G.A.M. van den Bos. Co-promotor: dr. H.C. Boshuizen. Academisch Medisch Centrum, afd. Sociale Geneeskunde, Amsterdam.

**7 september 2004 - C.J. Weegink**

Hepatitis C infection: the quest for new treatment strategies. Promotor: prof. em. dr. G.N.J. Tytgat. Co-promotores: dr. H.W.Reesink, dr. M.G.H.M. Beld. Academisch Medisch Centrum, afd. Inwendige Geneeskunde, Amsterdam.

**20 september 2004 - Th. Huynh Van**

Glucose metabolism in falciparum malaria. Promotores: prof. dr. H.P. Sauerwein, prof. dr. P.A. Kager. Co-promotores: dr. ir. M.T. Ackermans, dr. G.J. Weverling. Academisch Medisch Centrum, afd. Inwendige Geneeskunde, Tropische Infectieziekten en AIDS, Amsterdam.

**20 september 2004- Ph. Trong Giao**

Artemisinin based combination therapy for malaria in Vietnam. Promotor: prof. dr. P.A. Kager. Co-promotores: dr. P.J. de Vries, dr. T. Quang Binh. Academisch Medisch Centrum, afd. Inwendige Geneeskunde, Tropische Infectieziekten en AIDS, Amsterdam en Universiteit van Vietnam.

**29 september 2004 - M.T.M. Vossen**

Immune responses to herpes virus infections in immunocompromised children. Promotores: prof. dr. T.W. Kuijpers, prof. dr. R.A.W. van Lier. Academisch Medisch Centrum, afd. Kinderimmunologie, Amsterdam.

**1 oktober 2004 - H.F. Berg**

Chlamydia pneumonia and atherosclerosis: facts or fiction. Promotor: prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls. Co-promotor: dr. J.A.W.J. Kluymans. VU medisch centrum, afd. Medische Microbiologie, Amsterdam.

**1 oktober 2004 – B. Maraha**

Chlamydia pneumonia and vascular diseases. Promotor: prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls. Co-promotor: dr. M.F. Peeters. VU medisch centrum, afd. Medische Microbiologie, Amsterdam.

**28 oktober 2004 - B. Rockx**

Norovirus infection: disease, antibody responses and susceptibility. Promotores: prof. em. dr. M.C. Horzinek, dr. M.P.G. Koopmans. Universiteit Utrecht, fac. Diergeneeskunde, hoofdafd. Infectieziekten en Immunologie, afd. Virologie.

**2 november 2004 - R. Zachariah**

Epidemiology and control of tuberculosis and sexually transmitted infections in Thyolo District, Malawi. Promotores : prof. dr. M.W. Borgdorff, prof. dr. A.D. Harries. Academisch Medisch Centrum, afd. Humane Retrovirologie, Amsterdam. University of Malawi.

**4 november 2004 - S. Verver**

Epidemiology of tuberculosis among immigrants in the Netherlands and in a high incidence area in South Africa. Promotor: prof. dr. M.W. Borgdorff. Co-promotor: prof. dr. N. Beijers. Academisch Medisch Centrum, afd. Inwendige Geneeskunde, Amsterdam en Stellenbosch Universiteit, Zuid-Afrika.

**4 november 2004 - E. van der Snoek**

STDs and HIV infection in men who have sex with men, Rotterdam cohort study. Promotor: prof. dr. H.A.M. Neumann. Co-promotores: dr. W.I. van der Meijden, dr. J. de Wit. Erasmus MC, afd. Dermatologie & Venereologie, Rotterdam.

**12 november 2004 - C.J.P.A. Hoebe**

Outbreak investigation and epidemiology - from practice to science. Promotores: prof. dr. R.A. Coutinho, prof. em. dr. F. Sturmans. Universiteit van Amsterdam, GGD, div. Volksgezondheid en Milieu. Erasmus MC, afd. Maatschappelijke Gezondheidszorg, Rotterdam.

**25 november 2004 - B.J. Bosch**

The coronavirus spike protein; mechanisms of membrane fusion and virion incorporation. Promotor: prof. dr. J.P.M. Rottier. Universiteit Utrecht, fac. Diergeneeskunde, hoofdafd. Infectieziekten en Immunologie, afd. Virologie.

**26 november 2004 - F.A. Koning**

Determinants of host HIV-1 susceptibility and R5 HIV-1 evolution. Promotores: prof. dr. F. Miedema, prof. dr. H. Schuitemaker. Academisch Medisch Centrum, Sanquin Research CLB, afd. Klinische Viro-immunologie, Amsterdam.

**9 december 2004 - A.S. de Jong**

Modification of host cell membrane permeability by the enterovirus 2B protein – molecular mechanism and cell biological consequences. Promotor: prof. dr. J.M.D. Galama. Co-promotores: dr. F.J.M. van Kuppeveld, dr. P.H.G.M. Willem. Universitair Medisch Centrum St Radboud, afd. Medische Microbiologie, Nijmegen.

#### 15 december 2004 – S. Kaptein

Characterization of rat Cytomegalovirus genes that play a crucial role in the pathogenesis of virus infection. Promotor: prof. dr. C.A. Bruggeman. Co-promotor: dr. C. Vink. Universiteit Maastricht, fac. Geneeskunde, vakgroep Medische Microbiologie.

#### 17 december 2004 – J.G. Duijvestijn-van Dam

Interactions between Cytomegalovirus and the immune system. Promotor: prof. dr. C.A. Bruggeman. Universiteit Maastricht, fac. Geneeskunde, vakgroep Medische Microbiologie.

#### 21 december 2004 - J.H. van Zeijl

Viruses and febrile seizures. Promotor: prof. dr. J.M.D. Galama. Co-promotor: dr. R.A. Mullaart. Universitair Medisch Centrum St Radboud, afd. Medische Microbiologie, Nijmegen.

### ORATIES

#### 18 maart 2004 - prof. dr. M.J.M. Bonten

Het Nederlandse antibioticumbeleid: je maintiendrai? Hoogleraar Moleculaire epidemiologie van infectieziekten. Universiteit Medisch Centrum Utrecht.

## PERSONALIA

### Nieuwe aanmeldingen

- Dhr. K.D.J. Beintema, Aventis Pharma B.V., Afdeling Specialist Care, De Beek 18, 3871 MS Hoevelaken.
- Mw. dr. H.J. Bootsma, Erasmus MC, Afdeling Kinderneeskunde, kamer EE 1571, Postbus 1738, 3015 GE Rotterdam.
- Mw. L. van den Broecke, BD Benelux, Afdeling Diagnostics (Microbiologie), Erembodegem - Dorp 86, B-9320 Erembodegem (Aalst), België.
- Dhr. B.L. Herpers, St. Antonius Ziekenhuis Nieuwegein, Afdeling Medische Microbiologie & Immunologie, Postbus 2500 3430 EM Nieuwegein.
- Mw. drs. T.T.N. Le, Cambridgelaan 507, 3584 DG Utrecht.
- Mw. M.J. Mooij, Terborchlaan 125, 1816 LC Alkmaar.
- Mw. J. Top, UMC Utrecht, Afdeling Eijckman Winkler Instituut G04.614, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht.

## AGENDA

\* = Nieuw

1-3 DECEMBER 2004 \*

### 6th European Congress of Chemotherapy and Infection & 24th French Congress of Chemotherapy

Palais des Congrès de Paris, Parijs.

Informatie: JCD Conseil /ICA, tel.: + 331 40 64 20 00, e-mail: ricai@jcdconseil.com, <http://www.ricai.org>.

6 DECEMBER 2004

### 307e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

Informatie: J.A. Kaan, tel.: 030-256 67 48.

16 DECEMBER 2004 \*

### Infectieziekten Symposium Amsterdam (IX), Casusbespreking infectieziekten met relevantie voor de dagelijkse praktijk

Academisch Medisch Centrum, collegezaal 5, Amsterdam.

Informatie: Nicolaes Tulp Instituut, tel.: 020-566 85 85, fax: 020-696 32 28, e-mail: [tulpinst@amc.uva.nl](mailto:tulpinst@amc.uva.nl).

4 MAART 2005 \*

### Dutch Annual Virology Symposium

Het Trippenhuis, KNAW, Tinbergenzaal, Kloveniersburgwal 29, Amsterdam.

Informatie: I.M. Stub, Virology Division, Utrecht, tel: 030-253 24 85, e-mail: [virology@vet.uu.nl](mailto:virology@vet.uu.nl).

7 MAART 2005 \*

### 308e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

Informatie: J.A. Kaan, tel.: 030-256 67 48.

15 MAART 2005 \*

### 15e Transmissiedag Infectieziekten

Congrescentrum De Eenhoorn, Amersfoort.

Informatie: Secretariaat Centrum voor Infectieziekten Epidemiologie, tel.: 030-274 3009, e-mail: [marion.bouwer@rivm.nl](mailto:marion.bouwer@rivm.nl).

2-5 APRIL 2005

### 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Kopenhagen, Denemarken

Informatie: 15<sup>th</sup> ECCMID 2005, c/o AKM Congress Service, P.O. Box, CH-4005 Basel, Zwitserland, email: [info@escmid.org](mailto:info@escmid.org).

27-29 APRIL 2005

**5th International Symposium on Antimicrobial Agents and Resistance (ISAAR) Seoul, Korea.**

Informatie: Asian-Pacific Research Foundation for Infectious Diseases (ARFID); 50 Ilwon-dong, Kangnam-ku, Seoul 135-710, Korea, tel.: +82 2 3410 0327, fax: +82 2 3410 0023, e-mail: isaar@ansorp.org.

27-30 MEI 2005 \*

**8th Annual Meeting of the ESCV**

World Meteorological Organization (OMM), Genève.  
E-mail: werner.wunderli@hcuge.ch, tel.: +41 22 372 40 86.

6 JUNI 2005 \*

**309e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie**

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.  
Informatie: J.A. Kaan, tel.: 030-256 67 48.

12 SEPTEMBER 2005 \*

**310e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie**

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.  
Informatie: J.A. Kaan, tel.: 030-256 67 48.

21-24 SEPTEMBER 2005 \*

**45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)**

New Orleans, Louisiana, USA.  
Informatie: ASM, 1752 N Street, NW Washington, DC 20036-2804, USA, e-mail: ICAAC@asmusa.org, <http://www.icaac.org/ICAAC.asp>.

12 DECEMBER 2005 \*

**311e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie**

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.  
Informatie: J.A. Kaan, tel.: 030-256 67 48.

