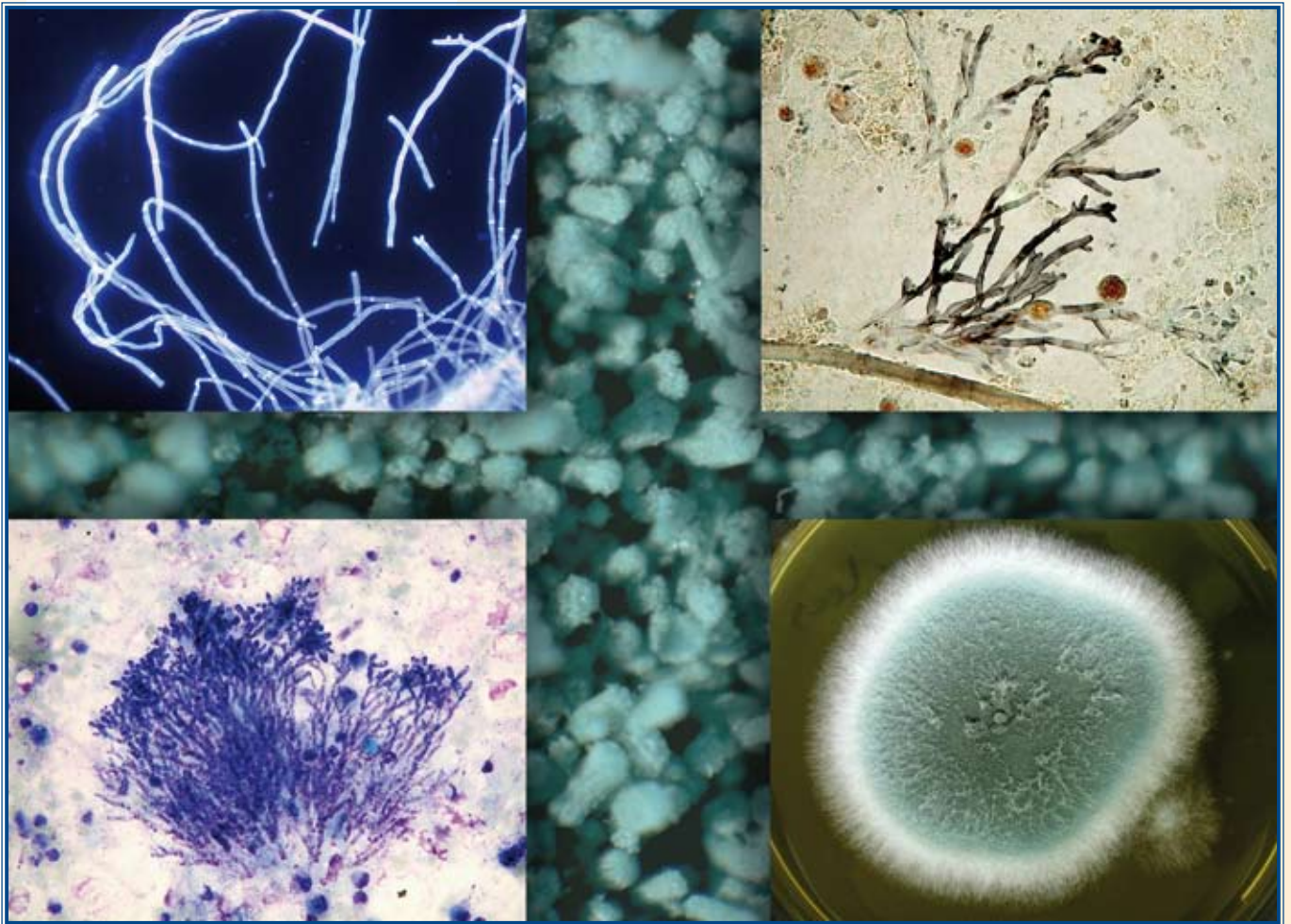


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Antimicrobiële gevoeligheid en resistentiemechanismen van *S. pneumoniae*

Verliezen we de parasieten uit het oog?

Posaconazol, een nieuw breed spectrum triazool

Colofon

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 (werkgroepen van de) vereniging.

NVMM-secretariaat

Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden
Tel. (058) 293 94 95
Fax. (058) 293 92 00
E-mail: nvmm@knmg.nl
Internet: www.nvmm.nl

Hoofdredactie

Dr. C.W. Ang en dr. M. van Rijn
Redactie
Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,
dr. A. Fleeer, dr. J.G. den Hollander,
J.A. Kaan, dr. J.S. Kalpoe,
mw. L.M. Kortbeek, dr. J.F.G.M. Meis,
dr. G.J.H.M. Ruijs, mw. dr. A. van 't Veen,
dr. C. Vink, dr. H.F.L. Wertheim

Redactiesecretariaat

Mw. G. Brouwer
Van Zuiden Communications B.V.
Postbus 2122,
2400 CC Alphen aan den Rijn
Tel. (0172) 47 61 91
Fax. (0172) 47 18 82
E-mail: ntmm@zuidencom.nl

Advertentie-exploitatie

Van Zuiden Communications B.V.
Dhr. P. Bakker
Tel. (0172) 47 61 91

Oplage en frequentie

900 exemplaren, 4x per jaar

Abonnementen

Gratis voor leden van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) en leden van de Vereniging voor Infectieziekten (VIZ). Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 35,- per jaar
Buiten Nederland, in Europa: € 42,50 per jaar
Losse nummers: € 10,20
Opgave abonnementen:
Tel. (0172) 47 61 91



VAN ZUIDEN
COMMUNICATIONS B.V.

© 2007, Van Zuiden Communications B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervaardigd, 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 redactie verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en redactie op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en redactie 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 die zijn gedeponneerd bij de Kamer van Koophandel te Leiden.

ISSN 0929-0176

Inhoud

In memoriam

Dr. A. Jansz 130

Van de redactie

Suggestief 131

Groeten uit Vietnam

Een bijzonder ziekenhuisontslag
H.F.L. Wertheim 132

Transmissieroute

Medische microbiologie moet uit de kast
Mw. dr. A.M.W. van Elsacker-Niele 133

Artikelen

Antimicrobiële gevoeligheid en resistentiemechanismen van *S. pneumoniae*,
H. influenzae en *M. catarrhalis*: de resultaten van het DUEM2-onderzoek
J.W. Mouton, S.M. Meijers, H.A. de Valk, C.H.W. Klaassen 134

Verliezen we de parasieten uit het oog? 140

Nieuwe ontwikkelingen in de fecesdiagnostiek
L. van Lieshout, R.J. ten Hove, E.A.T. Brienen, J.J. Verweij

Posaconazol, een nieuw breedspectrumtriazool 146

R.J.M. Brüggemann en P.E. Verweij

Samenvatting proefschrift

Op zoek naar nieuwe diagnostische mogelijkheden voor patiënten met de veteranenziekte
B.M.W. Diederer 154

Rubrieken

Boekbespreking 157

Aankondigingen 158

Personalia 160

Promoties 160

Agenda 162

Foto omslag: © Loes van Damme, Roel Verkooijen, Erasmus MC,
Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Erasmus MC, Rotterdam.

Aspergillus fumigatus

Links boven: CalcofluorWhite van een positieve bloedkweek 200x vergroot

Rechts boven: gomori-kleuring van een BAL 400x vergroot

Links onder: giemsa kleuring van een BAL 400x vergroot

Rechts onder: kolonie, 3 dagen oud op een Sabouraud-agar 1x vergroot

Achtergrond: kolonie, 3 dagen oud op een Sabouraud-agar ca. 30x vergroot

Dr. A. Jansz, arts-microbioloog

Op 15 oktober 2007 is de arts-microbioloog dr. Bob Jansz op 78-jarige leeftijd overleden. Jansz heeft vele beroepsmatige en maatschappelijke functies bekleed. Hij was een van de oprichters van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (1992). Bob Jansz werd geboren op 25 augustus 1929 in Jakarta (Indonesië), waar hij de lagere en middelbare school doorliep. Hij studeerde Geneeskunde aan de Universiteit van Amsterdam en legde in 1958 het artsexamen af. Bij prof. dr. A.B.F.A. Pondman aan de Rijksuniversiteit te Groningen specialiseerde hij zich tot laboratoriumarts, hoofdrichting Bacteriologie, zoals dat toentertijd heette. Zijn inschrijving in het specialistenregister vond plaats in maart 1962. Inmiddels was hij op 15 september 1960 bij professor Pondman gepromoveerd. De titel van zijn proefschrift luidde: "Een onderzoek naar de waarde van de Schultz-Daletechniek in de immunologie".

Jansz is vanaf begin jaren zestig tot zijn pensionering (eind 1994) zeer actief geweest op het gebied van de medische microbiologie, immunologie en hematologie. Zijn inspanningen waren niet alleen puur vakinhoudelijk (hij schreef talloze wetenschappelijke publicaties) maar ook organisatorisch. Zo was hij van 1978 tot 1982 voorzitter van de Nederlandse Vereniging voor Bloedtransfusie en van 1984 tot 1992 de (laatste) voorzitter van de Nederlandse Vereniging van Laboratoriumartsen.

Halverwege de jaren zestig heeft hij gewerkt in diverse laboratoria in de Verenigde Staten. In 1969 volgde een associatie met C.F.A. Heijen en werd hij een van de hoofden van het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Tilburg en het bacteriologisch/immunologisch laboratorium van het St. Elisabeth Ziekenhuis te Tilburg. Vanaf 1969 tot zijn pensionering heeft hij binnen het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Tilburg de hele immunologie op- en uitgebouwd. Ook was hij vanaf 1975 medisch directeur van de Rode Kruis Bloedbank Midden-Brabant.

Naast de immunologie en de hematologie beheerste hij ook de medische microbiologie op een hoog niveau. Van 1977 tot 1981 was hij consulent klinische bacteriologie en ziekenhuishygiëne in het Franciscus Ziekenhuis in Roosendaal, waar hij ook voorzitter van de infectiecommissie was. Van 1977 tot 1989 was hij consulent klinische bacteriologie en ziekenhuishygiëne in het St. Laurens Ziekenhuis en Diaconessenhuis te Breda; ook daar was hij voorzitter van de ziekenhuisinfectiecommissie. Van 1977 tot 1982 was hij secretaris van de Nederlandse Vereniging van Laboratoriumartsen, van 1980 tot 1990 A-opleider voor het specialisme medische microbiologie en tevens lid van het Concilium Medico Microbiologicum.

Ook het onderwijs voor medisch analisten ging hem aan het hart. Zo was hij van 1978 tot 1993 voorzitter van



de Gemengde Commissie Nederlandse Vereniging van Laboratoriumartsen/Vereniging van Medische Analisten in het kader van de opleiding tot medisch-microbiologisch analist. Bij een aantal analistenopleidingen was hij rijksgecommitteerde voor de microbiologie.

Binnen de organisatie van de gezondheidszorg in het algemeen en de medische microbiologie in het bijzonder heeft Jansz altijd een grote rol gespeeld. Zo was hij van 1980 tot 1986 lid van het hoofdbestuur van de Koninklijke Nederlandse Maatschappij tot bevordering der Geneeskunst (KNMG) en binnen het vakgebied Medische Microbiologie van 1982 tot 1989 bestuurslid van de Stichting Kwaliteitscontrole Medische Microbiologie (SKMM). Van 1983 tot 1990 was hij lid van de werkgroep Infectiepreventie (WIP) en, zoals eerder vermeld, vanaf 1984 tot 1992 voorzitter van de Nederlandse Vereniging van Laboratoriumartsen. In die laatste functie is hij een van de oprichters geweest van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie.

Als directe collega is Bob Jansz voor ons altijd een inspirerende persoonlijkheid geweest. Binnen de geneeskunde beheerste hij de microbiologie, immunologie en hematologie op hoog niveau, zowel wetenschappelijk, organisatorisch als op het gebied van onderwijs. Daarnaast had hij een bourgondische inslag. Met collega's en medewerkers ging hij regelmatig uit eten en hij was altijd vriendelijk in de omgang. Hij genoot van reizen.

Bij zijn pensionering eind 1994, waarbij hij werd benoemd tot officier in de Orde van Oranje-Nassau, waren de eerste verschijnselen van suikerziekte reeds aanwezig. De ziekte heeft grote invloed op hem gehad, vooral in de laatste jaren. Wij wensen zijn vrouw Adri en zijn (klein)kinderen veel sterkte toe om het verlies van deze markante man te verwerken.

Tilburg, 28 oktober 2007

M.F. Peeters,
Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Tilburg

Suggestief

Ik ben een slecht schrijver. Deadlines overschrijd ik eerder standaard dan bij uitzondering, en het is altijd weer een klein wonder dat ik het alsnog red een stukje geplaatst te krijgen. Ter verdediging voer ik altijd aan dat ik “er inspiratie voor moet hebben”, maar er is ook een onmiskenbare laksheid die maakt dat ik altijd te elfder uren mijn stukjes schrijf. Zo ook deze keer. Maar genoeg nu over mij.

“Veel salarissen van specialisten omlaag” schreeuwde “De Ziekenhuiskrant” op de voorpagina. Mijn aandacht werd vooral getrokken door de foto die onder de kop stond afgebeeld. Van het stukje tekst werd ik niet veel wijzer. Er stond geen auteur bij vermeld, bronnen voor de aangehaalde feiten ontbraken, en wat de foto met de tekst te maken had, werd ook nergens vermeld. Wat er wel stond, kunt u nalezen in het blaadje zelf. U vindt het eenvoudig: in mijn ziekenhuis lag het pontificaal bij de hoofdingang. Dan weet u ook welk van onderstaande afbeeldingen echt is, en welke gefotoshopt. Grappig detail overigens: het stukje gaat voor de verandering nu eens niet over vrijgevestigde specialisten maar juist over de collegae in loondienst.

De kracht van de suggestie wordt steeds vaker misbruikt. Wanneer mijn krant schrijft over de plannen van de Partij van de Arbeid om meer dan de helft van het zware materieel van defensie te verkopen, plaatst zij daar niet een foto bij van een militaire kapel die dan dreigt te verdwijnen of van een zware pantserhouwitser of F16. Nee, onder de kop staat dan een vijfkolomfoto van een Nederlandse infanterist die vanuit zijn tank (zwaar materieel immers) zijn pistool richt op een voorbijganger. Ook hier heeft de foto weinig met de boodschap te maken maar de suggestie is overduidelijk. Stelt u zich deze uitgave van NTMM eens voor met de foto van een hoestende clochard onder een brug aan de Seine bij het artikel van Mouton et al., bij het stuk van Van Lieshout et al. natuurlijk een goor oog met *Loa loa*, terwijl we bij het Posaconazolestuk van Brüggemann en Verweij een foto plaatsen van een oudere heer in rolstoel die dankbaar omhoog kijkt naar een man in een witte jas (stethoscoop losjes om de nek) die aandachtig in een dossier kijkt. Op de schoot van de oude man zit natuurlijk een klein meisje dat lachend naar opa kijkt. U zou het me niet vergeven en het zou zeer waarschijnlijk mijn laatste NTMM zijn geweest. Zoiets doen wij nu eenmaal niet in ons NTMM. In dit licht bezien is het natuurlijk vreemd dat de meesten onder ons liever de krant halen dan het NTMM. Misschien een goed voornemen voor 2008 om daar eens verandering in te brengen?



Bron: De Ziekenhuiskrant, jaargang 1, nummer 17, 24 oktober 2007.

Ah, daar was mijn inspiratie dus! Of u er kaas van kunt maken weet ik niet, maar het hoofdredactioneel is weer gevuld. En dat al één dag voor de absolute deadline! Omdat dit het laatste nummer van dit jaar is, wenst de redactie u tegelijk alle goeds voor 2008. Beware of headlines and deadlines!

Michiel van Rijn

Een bijzonder ziekenhuisontslag

H.F.L. Wertheim

Tot voor kort waren er in Vietnam geen nieuwe menselijke vogelgriepgevallen geconstateerd sinds 2005. Vanaf mei 2007 tot het moment dat ik deze column schrijf zijn er echter officieel zeven gevallen van vogelgriep gemeld in het noorden van Vietnam (zie http://www.who.int/csr/don/2007_06_29/en/index.html). Deze nieuwe meldingen vallen samen met een vijfde golf van H5N1-uitbraken onder kippen en eenden.

De eerste vier uitbraakgolven vielen steeds in de maanden januari en februari, net voor het Chinees Nieuwjaar (Tet). Rond Nieuwjaar is er altijd een grote vraag naar gevogelte om de feestdagen te vieren. De nieuwe, huidige golf van vogelgriep viel dit jaar echter een aantal maanden later, in de maanden mei en juni. Sinds maart 2007 mogen de boeren hun eenden weer vrij laten broeden, na het opheffen van het broedverbod. Het verbod werd opgeheven na een grote, landelijke massavaccinatiecampagne. Ondanks deze campagne graasden er in de maanden mei en juni, rond de oogst van de rijst, toch een hoop ongevaccineerde eenden op de rijstvelden. Dit is mogelijk een ideale situatie geweest voor het ontstaan deze vijfde griepgolf.



Van de zeven vogelgrieppatiënten hebben drie het overleefd. Het ziekenhuisontslag van de eerste twee overlevenden ging gepaard met de aanwezigheid van hoogwaardigheidsbekleders en genoot de belangstelling van veel media. Dat een patiënt deze virusziekte overleeft, wordt gezien als een nationale overwinning, en dat moet worden gevierd. Op woensdag 6 juni kon één van de vogelgrieppatiënten na een ziekenhuisopname van zes weken worden ontslagen. Deze patiënt was opgenomen in het Nationale Instituut voor Infectie- en Tropische Ziekten (NIITD), waar wij ook met onze Oxford Unit zijn gevestigd. (Een van onze hoofdtaken is het coördineren van grieponderzoek voor het *South East Asia Influenza Clinical Research Network*, zie www.seaclinicalresearch.org).

De plechtigheid begon met het ophalen van de patiënt en zijn moeder van de afdeling door ziekenhuisdirectie en journalisten. Wij mochten ook mee. Na een fotosessie en een televisie-interview ging de stoet richting de conferentieruimte. Deze ruimte was voor de ontslagplechtigheid opgeluisterd met een spandoek met de tekst "Gefeliciteerd met het ontslag van de H5N1-patiënt" (zie foto). De plechtigheid bestond voornamelijk uit speeches en een presentatie van het klinische beloop van de patiënt. In Vietnam is de duur van de toespraak afhankelijk van de status van de spreker. Hoe hoger de status van de spreker, hoe langer de spreektijd. Door de vele hoogwaardigheidsbekleders was deze bijzondere ceremonie dan ook een lange zit, maar ik had het voor geen goud willen missen.

Dit artikel is tevens verschenen in het Infectieziekten Bulletin 2007, nummer 9.

Dr. H.F.L. Wertheim, Oxford University Clinical Research Unit, National Institute of Infectious and Tropical Diseases, Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Hanoi, Vietnam, e-mail: hwertheim@oucru.org.

Medische microbiologie moet uit de kast

Mw. dr. A.M.W. van Elsacker-Niele

Met graagte neem ik het Transmissie-stokje over van Ron Hendrix, en borduur ik nog even voort op zijn thema *human resources*. Hij signaleert twee belangrijke ontwikkelingen. Enerzijds zijn er steeds meer mogelijkheden om het analytisch proces in onze laboratoria te robotiseren en daarmee een reductie in het benodigd aantal analisten te bewerkstelligen. Anderzijds zijn wij als arts-microbiologen en moleculair biologen van vitaal belang voor de medische microbiologie. Wij zullen immers uit de veelheid van informatie over ons vakgebied die informatie moeten halen die nuttig en nodig is voor de uitoefening van ons vak en de ontwikkeling van ons vakgebied. Wij zullen voor onze laboratoria de keuzes moeten maken ten aanzien van inhoudelijk beleid; wij zullen nieuwe ontwikkelingen moeten implementeren om de aanvragers van diagnostiek en consultatie in eerste, tweede en derde lijn en hun patiënten optimaal te ondersteunen. En wij zullen voor onszelf en onze laboratoria een weg moeten vinden in de nieuwe wereld die ontstaat nu de zorg grootschalig in het teken van marktwerking is komen te staan en laboratoriumbepalingen een wellicht niet altijd even welkom onderdeel van DBC's vormen.

Willen wij ons vakgebied staande houden in dit geheel, dan zullen wij voor zorgaanbieders uit eerste en tweede lijn een aantrekkelijker alternatief moeten blijven vormen voor commercieel ingestelde laboratoria uit binnen- en buitenland. Wij hebben in de Nederlandse medische microbiologie een relatief kleine en hechte groep professionals met over het algemeen uitstekende onderlinge relaties. Dat wij binnen en buiten onze laboratoria zo gemakkelijk en snel nieuwe ontwikkelingen implementeren is onlosmakelijk verbonden aan onze traditie kennis en protocollen met elkaar te delen en gezamenlijk aan productverbetering te werken. Wij zouden er goed aan doen – veel meer dan wij nu doen – duidelijk te maken wat onze meerwaarde is als het gaat om kwaliteit van diagnostiek; met name hoeveel vakkennis en inspanningen het kost de betrouwbare en kwalitatief hoogstaande uitslagen te genereren die wij nu bieden en waarop de behandelend specialisten zonder zorg hun beleid en behandeling van patiënten kunnen baseren. Onze consultatieve ondersteuning maakt dat behandelend huisartsen en specialisten (al dan niet in opleiding) niet zelf alle kennis hoeven op te bouwen en te onderhouden op het gebied

van interpretatie van serologische uitslagen, van moeilijke resistentiemechanismen, van exotische parasitaire aandoeningen die zij misschien maar eens in hun werkzame leven tegenkomen. Wij zouden zeker veel beter voor het voetlicht kunnen brengen hoezeer wij samen met de ziekenhuishygiënisten substantiële bijdragen leveren aan de zo gewenste kostenbeheersing door onze protocollering en ondersteuning op het gebied van hygiëne en infectiepreventie, niet alleen intramuraal, maar in toenemende mate ook transmuraal en zelfs extramuraal. Dat wij hierin zo succesvol zijn, is zeker niet in de laatste plaats te danken aan onze actieve opstelling in de ziekenhuizen. Onze grote en groeiende bijdrage aan de openbare gezondheidszorg kan alleen in stand blijven als we ons kunnen baseren op de laboratoriumgegevens zoals we die met elkaar genereren, verzamelen en bewaren.

Het NVMM-bestuur werkt hard aan de – in het licht van bovenstaande – broodnodige professionalisering van onze vereniging. Ook in onze statutaire commissies wordt veel werk verzet. Net als in de algemene maatschappij blijkt echter dat de vrouwelijke NVMM-leden naar verhouding duidelijk minder actief zijn dan de mannelijke. Binnen de commissies die bestaan uit arts-microbiologen is de verhouding man:vrouw 26:8, onder de totale groep arts-microbiologen 135:73. Binnen de commissies die bestaan uit moleculair biologen is de verhouding man:vrouw 13:2, waar die verhouding onder de moleculair biologen binnen de Werkgroep Moleculaire diagnostiek van Infectieziekten (WMDI) 29:17 is. Zoals ik uit eigen ervaring weet is het doen van commissie- en bestuurswerk buitengewoon boeiend en inspirerend. Daarbij is de inbreng van vrouwen vaak anders dan die van mannen. Daarom, en omdat wij net als onze mannelijke leden onze bijdrage aan de vereniging horen te leveren, roep ik hierbij de vrouwelijke leden die nog niet actief zijn binnen de vereniging op zich aan te melden voor verenigingswerk.

De transmissieroute leidt naar de heer Chr. Roggeveen, Laboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland.

Mw. dr. A.M.W. van Elsacker-Niele, arts-microbioloog, Afdeling Medische Microbiologie, Laboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland, Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden, e-mail: a.van.elsacker@lvf.nl.

Antimicrobiële gevoeligheid en resistentiemechanismen van *S. pneumoniae*, *H. influenzae* en *M. catarrhalis*

De resultaten van het DUEM2-onderzoek

J.W. Mouton, S.M. Meijers, H.A. de Valk, C.H.W. Klaassen

Samenvatting

In navolging van eerdere onderzoeken rapporteren wij hier de resultaten van een epidemiologisch onderzoek uit 2005 waarin de antimicrobiële resistentie in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* en *Moraxella catarrhalis* werd geïnventariseerd. De resistentiemechanismen in de macrolide- en quinolonresistente stammen werden nader geanalyseerd.

In het onderzoek participeerden 34 laboratoria. Elk laboratorium werd gevraagd uit opeenvolgende sputum- of bloedmonsters stammen te bewaren, 25 *S. pneumoniae*-stammen en 10 stammen van zowel *H. influenzae* als *M. catarrhalis*. De stammen werden in elk laboratorium geïdentificeerd volgens lokale richtlijnen. De identificatie van *S. pneumoniae*-stammen werd later geconfirmeerd. Aan het einde van de verzamelperiode werd de MRC van de stammen bepaald in ieder laboratorium, met behulp van de Etest voor levofloxacin, moxifloxacin, penicilline, amoxicilline, claritromycine, azitromycine, cefotaxim, cotrimoxazol en doxycycline. Resistentiegenen in *S. pneumoniae* werden bepaald met gevalideerde, op PCR gebaseerde methoden voor alle stammen met een MRC > 1 mg/l voor levofloxacin, > 0,5 mg/l voor claritromycine en > 0,06 mg/l voor penicilline.

Na heridentificatie waren 777 pneumokokkenstammen over voor analyse. Hiervan was 9,5 procent claritromycineresistent, 0,5 procent levofloxacineresistent en 3,9 procent penicillineresistent of intermediairgevoelig. 3,9 procent van de stammen had een MRC van > 1 mg/l voor levofloxacin, waarvan 25 procent een bekende *parC*- of *gyrA*-mutatie bleek te hebben. Van de claritromycineresistente stammen bezat 48 procent het *Erm*(B)-gen, 33 procent *mef*(A), 6 procent *mef*(E), 6 procent een 23S-mutatie en twee stammen een L4-mutatie. *Erm*(TR)- en L22-mutaties werden niet gevonden en bij vijf

stammen werd geen mechanisme gevonden. Er werden geen bijzondere resistenties gevonden in *H. influenzae* en *M. catarrhalis*.

De conclusie is dat macrolideresistentie in pneumokokken de 10 procent nadert. In de staart van de levofloxacinewildtypedistributie werd een significant aantal stammen gevonden met een eenstapsmutatie; dit wijst erop dat er onder de oppervlakte resistentie prevaleert.

Trefwoorden: macrolideresistentie, pneumokokken

Inleiding

Tussen 2002 en 2005 vonden, in navolging van eerdere onderzoeken,^{1,2} epidemiologische onderzoeken plaats naar de resistentie tegen een aantal antibiotica bij pneumokokken, *Haemophilus influenzae* en *Moraxella catarrhalis*. Bij analyses van deze onderzoeken was gevonden dat een incorrecte identificatie van pneumokokken had geleid tot een overschatting van de macrolideresistentie bij pneumokokken, omdat deze relatief hoger lag bij de niet-correct geïdentificeerde pneumokokken.³ De meeste van deze stammen leken te behoren tot de *Streptococcus mitis*-groep, wat werd aangetoond door zowel AFLP als een 16 rRNA-sequentieanalyse.⁴ Over het geheel genomen leek de macrolideresistentie echter wel toe te nemen, wat in overeenstemming is met de resultaten van de surveillance die het RIVM had uitgevoerd.⁵

J.W. Mouton, S.M. Meijers, H.A. de Valk, C.H.W. Klaassen,
Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen.
Correspondentieadres: dr. J.W. Mouton, afdeling Medische
Microbiologie en Infectieziekten, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis
Nijmegen C-70, Weg door Jonkerbos 100, 6532 SZ Nijmegen,
e-mail: mouton@cwz.nl.

Een tweede bevinding was dat het mechanisme van macrolideresistentie nogal verschilde van de landen om ons heen: ongeveer de helft van de resistentie werd veroorzaakt door effluxmechanismen en de andere helft door *Erm(B)*.

Wij rapporteren in dit artikel de resultaten van het onderzoek uit 2004/2005, waarbij ook specifiek werd gekeken naar quinolonresistentie. Resistentie tegen quinolonen ontstaat over het algemeen door een combinatie van twee mutaties, één in een van de gyrasegenen en één in een van de topo-isomerasegenen,⁶ en vormt wereldwijd een toenemend probleem.⁷ De aanwezigheid van één mutatie kan leiden tot een verminderde gevoeligheid, maar de MRC is meestal zodanig dat deze zich in de staart van de wildtypepopulatie bevindt, dat wil zeggen aan de rechterzijde van de normale MRC-distributie. Een tweede mutatie leidt vervolgens tot een sterk verhoogde MRC-waarde, en het probleem van quinolonresistentie kan worden onderschat als geen rekening wordt gehouden met de aanwezigheid van deze eenstapsmutanten. In deze onderzoeken werden daarom ook alle isolaten *gesequenced* die een MRC hadden in de staart van de wildtypeverdeling, om mogelijke eenstapsmutanten op te sporen.

Methoden

Stammen en gevoeligheidsbepalingen

In het onderzoek participeerden 34 laboratoria in Nederland. Elk laboratorium werd gevraagd om 25 *S. pneumoniae*-stammen, 10 *H. influenzae*-stammen en 10 *M. catarrhalis*-stammen te verzamelen van bloedkweken, sputum of bronchiaal lavages. De stammen werden geïdentificeerd door de laboratoria met behulp van routine-identificatiemethoden en bewaard bij -70 °C, waarna aan het einde van de verzamelperiode MRC's werden bepaald met behulp van de Etest (ABBIODISK, Solna, Zweden) voor levofloxacin, moxifloxacin, penicilline, amoxicilline, claritromycine, azitromycine, cefotaxim, trimethoprim/sulfamethoxazol en doxycycline volgens de instructies van de fabrikant. In het kort: Müller-Hintonplaten met 5 procent schapebloed (HTM voor *H. influenzae*) (Oxoid, Badhoevedorp, Nederland) werden geïnoculeerd met 0,5 McFarland, de teststrips werden opgebracht en geïncubeerd bij 35-37 °C zonder CO₂. De waarden werden na 24 uur afgelezen. *S. pneumoniae* ATCC 49619 en *H. influenzae* ATCC 49427 werden meegenomen als controle tijdens het testen volgens de richtlijnen van het CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*).⁸ Alle MRC's van resistente stammen werden later hergetest. Voor zover beschikbaar werden breekpunten van de EUCAST (*European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing*) aangehouden bij het bepalen van resistentiepercentages (www.eucast.org); in de overige gevallen werden de richtlijnen van de CRG (Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen) aangehouden.^{9,10}

Identificatie

Alle stammen werden geïdentificeerd in het lokale laboratorium. De *S. pneumoniae*-stammen werden later opnieuw geïdentificeerd in het centrale laboratorium. Voor alle *S. pneumoniae*-stammen met een verminderde gevoeligheid voor macroliden, penicilline en quinolonen (claritromycine MRC > 0,5 mg/l; penicilline MRC > 1 mg/l; levofloxacin MRC > 1 mg/l) werd de aanwezigheid van het *LytA*-gen bepaald en een AFLP-analyse uitgevoerd zoals eerder beschreven;^{3,4} bij alle overige stammen werd een buisgaloplosbaarheid uitgevoerd. Hiervan werd eerder beschreven dat de sensitiviteit en specificiteit op respectievelijk 99 en 96 procent lagen.¹¹

Bepaling van resistentiegenen

In *S. pneumoniae* werd de aanwezigheid van de macrolideresistentiegenen *Erm(B)* vastgesteld volgens de methode van Sutcliffe et al.,¹² de *Erm(A)*-subklasse *Erm(TR)* volgens die van Reinert et al.,¹³ en *mef(A)* en *mef(E)* volgens de methode zoals beschreven door Klomberg et al.¹⁴ Aanwezigheid van mutaties in het 23S-rRNA-gen en in de genen voor de ribosomale eiwitten L4 en L22 werd bepaald volgens de methode van Tait-Kamradt et al.¹⁵ Ook mutaties in de quinolonresistentiedeterminatieregio (QRDR) van *gyrA*, *gyrB*, *parC* en *parE* werden bepaald door middel van een standaardsequentie-analyseprotocol.

Analyse

De gegevens werden ingevoerd in en verwerkt met Whonet, versie 5.3 (WHO, Geneve, Zwitserland).

Resultaten

S. pneumoniae

In totaal werden 846 stammen verzameld. Hiervan bleken 69 stammen geen *S. pneumoniae* te zijn volgens de galoplosbaarheid en/of aanwezigheid van het *LytA*-gen en/of AFLP. De meeste van deze stammen waren claritromycine- of levofloxacinresistent. De 777 overgebleven stammen werden verder geanalyseerd. Tabel 1 laat de cumulatieve MRC-distributie zien voor de 10 geteste antibiotica. Hieruit valt af te lezen dat 96 procent van de stammen penicillinegevoelig was. Van de stammen die beschikbaar waren voor verdere analyse, waren er 24 met een MRC van 1,5 mg/l of hoger voor levofloxacin. Bij zeven ervan werden één of meer resistentiemechanismen gevonden (tabel 2). Bij de overige 17 stammen werd geen mutatie gevonden; deze werden verder beschouwd als behorende tot het wildtype. Van de zeven stammen met mutatie waren er twee die twee mutaties bezaten en – derhalve – een sterk verhoogde MRC hadden. De resistentiemechanismen die werden gevonden bij de 67 stammen beschikbaar voor analyse met een verminderde

Tabel 1. Cumulatieve frequentietabel van MRC's voor *S. pneumoniae* (n=777). De waarden bij de S-breekpunten (\leq) en R-breekpunten ($>$) zijn onderstreept. Hieruit zijn de resistentiepercentages direct af te leiden. Indien slechts één waarde is onderstreept, vallen de S- en R-breekpunten samen.

MRC MG/L	$\leq 0,008$	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	1,5	2	4	8	16	≥ 256
ANTIBIOTICUM														
Moxifloxacin	0,1	0,5	2,3	24,1	91,3	99,5	<u>99,7</u>	99,7	99,7	99,8	99,8	100	100	100
Levofloxacin	0	0	0	0,1	0,1	1,3	38,7	96,1	98,9	<u>99,5</u>	99,6	99,6	99,6	100
Penicilline G	23,2	83,6	94,7	<u>96,1</u>	96,2	97,3	98,1	<u>99,9</u>	100	100	100	100	100	100
Cefotaxim	23,3	87,2	95,5	96,4	96,7	98,1	<u>99,2</u>	100	100	<u>100</u>	100	100	100	100
Clarithromycine	0	3,6	14,5	51,2	86,6	89,9	<u>90,5</u>	90,8	91,3	91,9	92,3	93	93,8	100
Azitromycine	0	1,4	2,5	5,8	9,9	19,1	<u>47,9</u>	84,6	88,2	90,5	91,3	92,1	92,5	100
Cefuroximnatrium	0	77,9	92,3	94,8	96	96	<u>97,4</u>	<u>98,1</u>	98,7	99,5	100	100	100	100
Amoxicilline	0	91,5	95,1	95,6	96,2	97,6	98,4	<u>99,7</u>	100	<u>100</u>	100	100	100	100
Trimethoprim/sulfamethoxazol	0,1	0,3	1	5	51,8	87,5	<u>91,2</u>	93,1	93,7	<u>94,6</u>	97,2	98,5	99	100
Doxycycline	0	0,1	1,2	20,4	84,1	90,6	91,5	<u>92,4</u>	92,8	93,2	<u>95,2</u>	98,1	99,5	100

Tabel 2. Mutaties in de QRDR-regio's van de vier genen betrokken bij quinolonresistentie van de zeven *S. pneumoniae*-stammen met een MRC groter dan 1 mg/l voor levofloxacin. Van twee van de gevonden mutaties is het causale verband onduidelijk. Dit is aangegeven met een vraagteken.

GYRA	GYRB	PARC	PARE	MRC MG/L	BETEKENIS ¹
WT	WT	Ser 79 Tyr	WT	1,5	Ja
WT	WT	Asp 83 Val	WT	2	Ja
Met 52 Ile	WT	WT	WT	1,5	?
Ser 83 Tyr	WT	Ser 79 Phe	WT	32	Ja
Ser 83 Phe	WT	Ser 79 Phe	WT	32	Ja
WT	WT	Asp 83 Asn	WT	1,5	Ja
WT	WT	WT	Ile 460 Val	1,5	?

¹ja = bekende mutatie, zich uitend door een verhoogde MRC; ? = onbekende mutatie
WT = wildtype

Tabel 3. Resistentiemechanismen gevonden bij macrolideresistente *S. pneumoniae*-stammen.

MECHANISME	AANTAL STAMMEN	%	BIJZONDERHEDEN
<i>Mef</i> (A)	22	33	*
<i>Mef</i> (E)	4	6	
<i>Erm</i> (B)	32	48	*
<i>Erm</i> (TR)	0	0	
23S-mutatie	4	6	&
L4-mutatie	2	3	&
L22-mutatie	0	0	
Geen van bovenstaande	5	7	

* één stam bezat zowel *mef*(A) als *Erm*(B)
& één stam bezat zowel een mutatie in L4 als 23S

gevoeligheid voor een macrolide, staan vermeld in *tabel 3*. Opvallend is dat twee van deze stammen meer dan één macrolideresistentiemechanisme bezaten.

H. influenzae

Er werden 359 stammen verzameld en getest. *Tabel 4* laat de cumulatieve frequentietabel zien van deze stammen: 5,5 procent had een MRC > 4 mg/l en 8,3 procent een MRC > 2 mg/l voor amoxicilline. Alle stammen waren gevoelig voor cefotaxim en de quinolonen. Uit de tabel valt af te lezen dat de normale distributie van cotrimoxazol tot 0,25 mg/l loopt, en dat ongeveer 7 procent van de stammen MRC's boven de 16 mg/l heeft. De meeste stammen zijn resistent voor zowel claritromycine als azitromycine, met MRC's boven de 0,5 mg/l. De *in-vitro* gevoeligheid voor azitromycine is iets lager dan voor claritromycine.

Tabel 4. Cumulatieve frequentietabel van MRC's voor *H. influenzae* (n=359). De S-breekpunten (\leq) en R-breekpunten ($>$) zijn onderstreept. Hieruit zijn de resistentiepercentages direct af te leiden. Indien slechts één waarde is onderstreept, vallen de S- en R-breekpunten samen.

MIC	$\leq 0,008$	0,016	0,032	0,064	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	≥ 256
ANTIBIOTICUM													
Moxifloxacin	6,7	40,4	81	95,2	98,5	99,1	<u>100</u>	100	100	100	100	100	100
Levofloxacin	10,9	64,1	94,8	98,1	98,7	98,7	99,3	<u>100</u>	100	100	100	100	100
Clarithromycine	0	0	0,6	0,6	0,6	1,2	3,4	5,1	<u>12,6</u>	36,8	71,3	92,7	100
Azitromycine	0	0,3	0,6	1,5	2,1	3,8	9,4	28	64,2	91,4	98,1	99,2	100
Cefuroximnatrium	0,3	0,9	1,8	3,7	6,7	19,5	67,8	<u>90,7</u>	<u>98,5</u>	99,1	100	100	100
Cefotaxim	6,8	59,6	88,3	94,7	98,6	<u>98,6</u>	99,2	99,2	99,8	99,8	99,8	99,8	100
Amoxicilline	0	0,6	0,6	1,8	6,5	25,6	67,9	<u>84,7</u>	<u>91,7</u>	94,5	95,6	96,7	100
Amoxicilline/ clavulaanzuur	0	0,3	0,9	2,1	5,7	27,4	73,7	<u>91,3</u>	<u>98</u>	99,7	100	100	100
Trimethoprim/ sulfamethoxazol	0,9	1,7	11,5	52	84,1	88,3	89,4	<u>90,3</u>	<u>90,9</u>	91,2	91,5	92,9	100
Doxycycline	0	0,3	0,3	0,6	4,2	21,1	69,1	<u>92,7</u>	99,2	<u>100</u>	100	100	100

M. catarrhalis

Er werden in totaal 314 *M. catarrhalis*-stammen verzameld. De stammen waren alle gevoelig voor de geteste antibiotica met uitzondering van amoxicilline, trimethoprim/sulfamethoxazol en de macroliden. In de beide laatste gevallen lag het percentage rond de 5 procent.

Discussie

In dit onderzoek werd 9,5 procent macrolideresistentie gevonden bij pneumokokken. Dit is een waarde die in de buurt komt van 10 procent, een waarde die blinde therapie met macroliden minder attractief maakt. De helft van deze resistentie is het gevolg van een *Erm(B)*-mechanisme, wat overeenkomt met eerdere bevindingen.¹

Ook in dit onderzoek werd het resistentiepercentage onder pneumokokken in eerste instantie overschat doordat een deel van de stammen geen pneumokok in engere zin bleek te zijn. Het grootste deel van deze stammen werd geïdentificeerd als *S. mitis*, maar was vaak wel optochinegevoelig. Daardoor zijn deze stammen waarschijnlijk in eerste instantie als pneumokok gedeut. In een eerder onderzoek toonden we aan dat de specificiteit van optochine echter verre van optimaal is.¹¹

Van de stammen met een relatief hoge MRC voor levofloxacin, maar toch in de staart van de normale wildtypedistributie, bleek een significant deel een mutatie te hebben in één van de gyrase- of topo-isomerasegenen. Hoewel deze stammen formeel nog wel als gevoelig moeten worden beschouwd, wijst dit erop dat het percentage resistentie (in engere zin) hoger is dan op het eerste gezicht op fenotypische gronden het geval lijkt. Dit is inmiddels ook in een ander onderzoek gevonden.¹⁶

De gevoeligheid van zowel *H. influenzae* als *M. catarrhalis* vertoont weinig verschillen met waarden uit eerdere publicaties en lijkt vrij constant te zijn in de tijd. Een punt van discussie is de gevoeligheid van *H. influenzae* voor macroliden. Volgens de richtlijnen van de CRG en de binnenkort te verschijnen EUCAST-breekpunten is veruit de meerderheid van *H. influenzae*-stammen resistent voor de macroliden, of in ieder geval verminderd gevoelig. Het grote verschil met de CLSI-breekpunten verklaart het verschil in resistentiepercentages, zowel nationaal als internationaal. Er zijn echter geen onderzoeken die het hoge breekpunt van het CLSI rechtvaardigen. De discrepantie in resistentie tussen de verschillende macroliden is ook niet logisch; dit geldt ook voor de pneumokokken. In de conceptrichtlijn van de EUCAST (*expert rules*, www.eucast.org) wordt dan ook aanbevolen slechts één macrolide te testen (erytromycine) en de resultaten te vertalen naar de overige macroliden.

Wij concluderen dat de macrolideresistentie bij pneumokokken onder de 10 procent ligt maar deze grens wel dicht is genaderd. De 'echte' quinolonresistentie is nog relatief laag, maar de aanwezigheid van eenstapsmutanten laat zien dat er wel degelijk een vorm van resistentie aanwezig is.

Summary

Following earlier studies, we here report the results of a survey in 2005 in The Netherlands to monitor antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. In addition, we

determined the resistance mechanisms to macrolide and quinolone resistance in *S. pneumoniae*, if present.

34 laboratories equally distributed throughout the country participated in the study. Each lab was asked to collect, from consecutive samples, up to 25 strains of *S. pneumoniae* and 10 strains of *H. influenzae* and *M. catarrhalis* each. Only blood or sputum (including lavage) was allowed. Strains were identified by participating laboratories using their own standard identification technique. MICs were determined using the Etest on site for Levofloxacin, Moxifloxacin, Penicillin, Amoxicillin, Clarithromycin, Azithromycin, Cefotaxim, Cotrimoxazole and Doxycyclin. Afterwards, strains were collected by the central lab for further analysis and identification confirmation of *S. pneumoniae*. Resistance genes in *S. pneumoniae* were identified using validated PCR-based methods for all strains with a MIC of > 1 mg/L for Levofloxacin, > 0.5 mg/L for Clarithromycin and > 0.06 mg/L for Penicillin.

After identification validation, 777 *S. pneumoniae* strains were available for further analysis. 9.5 percent was Clarithromycin resistant, 0.5 percent Levofloxacin resistant and 3.9 percent Penicillin resistant or non-resistant. 3.9 percent of strains had a MIC of 1.5 or 2 mg/L for Levofloxacin. Of these, 25 percent had a known *ParC* or *GyrA* mutation. Of Clarithromycin resistant strains, 48 percent possessed the *Erm(B)* gene, 33 percent *Mef(A)*, six percent *Mef(E)*, six percent a 23S mutation, two strains a L4 mutation and no strains with *Erm(TR)* or L22 mutation. No mechanism was found for five strains. No significant resistance was found in *H. influenzae* and *M. catarrhalis*. Macrolide resistance in Pneumococci is still increasing in The Netherlands and approaches ten percent. Analysis of less susceptible Levofloxacin strains indicate that a *ParC* or *GyrA* mutation is present in a significant portion at the tail of the wildtype distribution.

Dankwoord

Wij zijn de volgende collega's uit onderstaande instellingen bijzonder erkentelijk voor deelname aan dit onderzoek:

- E.F.G.B. de Brauer, Atrium Medisch Centrum Heerlen, Heerlen;
- R.W. Brimicombe, Haga Ziekenhuis, locatie Leyenburg, Den Haag;
- Dr. A.G.M. Buiting, Streeklaboratorium, Tilburg;
- Dr Y.J. Debets-Ossenkop, VU medisch centrum, Amsterdam;
- Mw. Drs. A. Demeulemeester, Stichting Streeklaboratorium in Zeeland, Goes;
- B.J. van Dijke, St. Jans Gasthuis, Weert;
- Mw. Drs. J.M. van Duin, Ruwaard van Putten Ziekenhuis, Spijkenisse;
- Dr. H.Ph. Endtz, Erasmus MC, Rotterdam;
- Dr C. Fijen, Ziekenhuis De Heel, Zaandam;

- Dr A.J. van Griethuysen, Alysis Zorggroep, Locatie Rijnstate, Arnhem;
- B. Hendrickx, Ziekenhuis Zeeuws Vlaanderen, Terneuzen;
- M.G.R. Hendrix, Laboratorium Microbiologie Twente/ Achterhoek, Enschede;
- C. Hol, Meander Medisch Centrum, Amersfoort;
- Dr C.L. Jansen, Medisch Centrum Haaglanden, locatie Westeinde, Den Haag;
- A.R. Jansz, St. PAMM, Veldhoven;
- Drs J.A. Kaan, Diakonessenhuis, Utrecht;
- Dr J. Kluytmans, Amphia Ziekenhuis, locatie Molengracht, Breda;
- Drs Y.J. Kraat, Maaslandziekenhuis, Sittard;
- A.C.P. Leenders, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Den Bosch;
- P. de Man, St. Franciscus Gasthuis, Rotterdam;
- Dr W.L. Manson, Academisch Medisch Centrum Groningen, Groningen;
- Dr A.V.M. Moller, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Groningen en Drente, Groningen;
- Mw. Drs. E.A.N.M. Mooi-Kokenberg, Groene Hart Ziekenhuis, Gouda;
- Dr J.W. Mouton, Ziekenhuis Canisius Wilhelmina, Nijmegen;
- M.C.J. Persoons, Streeklab. voor de Volksgezondheid Groningen/Drenthe, Emmen;
- Mw. Drs. D.E.A. Potters, VieCuri Medisch Centrum voor N-Limburg, Venlo;
- T. Schulin, UMC St Radboud, Nijmegen;
- P.M.H. Schuur, Ziekenhuis Bethesda, Hoogeveen;
- F.W. Sebens, Deventer Ziekenhuis, Deventer;
- Dr. J.H. Sloos, Medisch Centrum Alkmaar, Alkmaar;
- F.S. Stals, Laurentiusziekenhuis, Roermond;
- Dr F. van Tiel, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Maastricht;
- Drs. C.P. Timmerman, Bacteriologisch Laboratorium, Hilversum;
- Dr. M Visser, UMC Utrecht, Utrecht;
- W.H.M. Vogels, Martini Ziekenhuis, Groningen;
- Dr. M.J.H.M. Wolfhagen, Isala Klinieken, Zwolle;
- J.H. van Zeijl, Laboratorium Volksgezondheid Friesland, Leeuwarden.

Wij danken Ton Smeets (S-Dimecon) voor de geboden ondersteuning bij dit onderzoek. Dit onderzoek werd mede mogelijk gemaakt door Bayer BV, Nederland.

Literatuur

1. Neeleman C, de Valk JA, Klaassen CH, et al. In-vitro susceptibility and molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolates in The Netherlands: the DUEL 2 study. *Clin Microbiol Infect* 2005;11(4):312-8.

2. Mouton JW, Jansz AR. The DUEL study: a multi-center in vitro evaluation of linezolid compared with other antibiotics in the Netherlands. *Clin Microbiol Infect* 2001;7(9):486-91.
3. Neeleman C, Klaassen CH, Klomberg DM, et al. Pneumolysin is a key factor in misidentification of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and is a putative virulence factor of *S. mitis* and other streptococci. *J Clin Microbiol* 2004;42(9):4355-7.
4. Neeleman C, Klaassen CH, de Valk HA, et al. Amplified fragment length polymorphism fingerprinting is an effective technique to distinguish streptococcus pneumoniae from other Streptococci and an efficient alternative to pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of pneumococci. *J Clin Microbiol* 2004 Jan;42(1):369-71.
5. SWAB (2007). Nethmap 2006 - Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in The Netherlands. RIVM, Bilthoven.
6. Tankovic J, Perichon B, Duval J, et al. Contributions in *gyrA* and *parC* genes to fluoroquinolone resistance of mutants of *Streptococcus pneumoniae* obtained in vivo and in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Nov;40(11):2505-10.
7. Shams WE, Evans ME. Guide to selection of fluoroquinolones in patients with lower respiratory infections. *Drugs* 2005 64:949-91.
8. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 14th international supplement. 2004 M100-S14 (M7). NCCLS, Wayne.
9. Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen. Interpretatie van gevoeligheidsonderzoek en breekpunten van antibacteriële middelen in Nederland. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2000;8:79-81.
10. Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen. Antimicrobiële breekpunten voor de gevoeligheidsbepaling van *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* en *S. pneumoniae*. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2000;8:89-90.
11. Derks MJH, Meijers SA, Mouton JW. Evaluation of 10 Widely used Routine Identification Methods for *Streptococcus pneumoniae*. In: ICAAC 2003. ASM.
12. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents and Chemother* 1996 Aug;40(8):1817-24.
13. Reinert RR, Franken C, van der Linden M, et al. Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany, 2002-2003. *Int J Antimicrob Agents* 2004 Jul;24(1):43-7.
14. Klomberg DM, de Valk HA, Mouton JW, et al. Rapid and reliable real-time PCR assay for detection of the macrolide efflux gene and subsequent discrimination between its distinct subclasses *mef(A)* and *mef(E)*. *J Microbiol Methods* 2005 Feb;60(2):269-273.
15. Tait-Kamradt A, Davies T, Cronan M, et al. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. *Antimicrob Agents Chemother* 2000 Aug;44(8):2118-25.
16. Morrissey I, Colclough A, Northwood J. TARGETed surveillance: susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated from community-acquired respiratory tract infections in 2003 to fluoroquinolones and other agents. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(4):345-51.

Verliezen we de parasieten uit het oog?

Nieuwe ontwikkelingen in de fecesdiagnostiek

L. van Lieshout, R.J. ten Hove, E.A.T. Brienen, J.J. Verweij

Samenvatting

In dit artikel worden enkele recente ontwikkelingen beschreven in de diagnostiek van intestinale parasitaire infecties, waarbij de nadruk ligt op de Nederlandse situatie. Evenals bij andere microbiologische disciplines wint de moleculaire diagnostiek, in het bijzonder de multiplex *real-time* PCR, steeds meer terrein. Lag de toepassing in eerste instantie bij de differentiatie van morfologisch niet te onderscheiden *Entamoeba*-species, nu wordt de PCR steeds meer ingevoerd als primaire diagnostiek voor de detectie van een verscheidenheid aan protozoa en wormen. Recente onderzoeksresultaten onderbouwen de gevoeligheidswinst van de moleculaire diagnostiek en laten opmerkelijke resultaten zien op het gebied van prevalentie en distributie van diarreeverwekkende protozoa. Tot voor kort waren deze parasitaire multiplex *real-time* PCR's voornamelijk beschikbaar binnen het Leids Universitair Medisch Centrum, maar de komende jaren wordt een toenemende implementatie in de routinediagnostiek verwacht, ook in de niet-academische laboratoria.

Trefwoorden: intestinale parasieten, diagnostiek, microscopisch onderzoek, multiplex *real-time* PCR

Inleiding

Het specifiek aantonen van parasitair DNA met behulp van de polymerasekettingreactie (PCR) blijkt een gevoelige en specifieke methode voor de detectie van intestinale parasieten. Het routinematig toepassen van dergelijke moleculaire diagnostische methoden binnen de patiëntenzorg is echter nog controversieel. Door de ontwikkeling van de *real-time* PCR zijn veel technische obstakels overwonnen, maar het laboratorium moet wel zijn ingericht op zorgvuldige uitvoering van de procedures. Bovendien dient men zich te realiseren dat met PCR alleen de specifieke DNA-targets worden gedetecteerd waarvoor de PCR is opgezet. Toevalsbevindingen zoals bij microscopisch onderzoek worden daardoor uitgesloten. In dit artikel worden de voor- en nadelen van zowel het

klassieke microscopische onderzoek als de moleculaire diagnostiek voor fecesparasieten besproken.

Microscopisch onderzoek in de Nederlandse praktijk

Microscopisch onderzoek vormt al sinds vele jaren de basis van de diagnostiek van darmparasieten. Door de variatie in grootte van en verscheidenheid aan morfologische kenmerken zijn de meeste darmprotozoa en wormen dusdanig karakteristiek dat ze na de nodige training en ervaring goed kunnen worden gedetermineerd (*figuur 1*). Daarbij heeft microscopisch onderzoek het belangrijke voordeel dat verschillende parasieten gelijktijdig in hetzelfde preparaat kunnen worden gezien. Ook zijn de meeste parasietenspecies die in de ontlasting aanwezig kunnen zijn, waarneembaar met behulp van een beperkt aantal procedures. Zo zal de concentratiemethode volgens Ridley in een meerderheid van de diagnostische laboratoria standaard worden toegepast in geval van ongefixeerde ontlasting met een verder niet gespecificeerde aanvraag op intestinale parasieten. Het sediment wordt daarbij deels, zonder verdere toevoegingen, gecontroleerd op wormeieren en larven, en deels, na toevoeging van jodium, onderzocht op protozoaire cysten. Bij een specifieke verdenking kan verder aanvullend onderzoek worden gedaan. Hierbij valt te denken aan een zuurvaste kleuring bij coccidiën zoals *Cryptosporidium* of *Isospora*, of een glycerinesedimentatie bij een mogelijke schistosomiasis.¹

Een bekend probleem bij ontlastingsonderzoek is echter dat veel parasieten in sterk wisselende en veelal lage concentraties worden uitgescheiden. Om de gevoeligheid te vergroten wordt daarom herhaald onderzoek geadviseerd.

Dr. L. van Lieshout, drs. R.J. ten Hove, E.A.T. Brienen en dr. J.J. Verweij, afdeling Parasitologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden.
Correspondentieadres: dr. Lisette van Lieshout, afdeling Parasitologie (P4-P), Leids Universitair Medisch Centrum, Postbus 9600; 2300 RC Leiden, e-mail: lvanlieshout@lumc.nl

Figuur 1. (A) Ei van dwerglintworm *Hymenolepis nana* (ongekleurd, circa 52 x 40 µm); (B) cyste van de darmprotozoa *Giardia lamblia* (JKJ-kleuring, circa 12 x 8 µm). Het zwarte balkje representeert een lengte van 10 µm.



Daarnaast heeft onderzoek van ongefixeerde ontlasting als nadeel dat de kwetsbare trofozoïetenstadia veelal zijn gedegeneerd voordat het materiaal het laboratorium heeft kunnen bereiken. Hierdoor is de parasiet *Dientamoeba fragilis*, die alleen een trofozoïetenstadium kent, niet meer aantoonbaar.

Om deze problemen te ondervangen wordt in Nederland in toenemende mate gebruikgemaakt van het zogeheten Triple Faeces Test (TFT)-protocol. Bij de TFT wordt op drie verschillende dagen ontlasting verzameld, waarbij op de eerste en de laatste dag het materiaal direct na lozing in het fixatief natriumacetaatzijnzuurformaline (SAF) wordt opgevangen.² Deze gefixeerde monsters zijn bijzonder geschikt voor het maken van permanent gekleurde preparaten, waarbij de verschillende protozoasoorten op basis van de trofozoïeten kunnen worden gedetecteerd. De ijzerhematoxyline-kinyounekleuring omvat een zuurvaste kleuring waardoor tevens de belangrijkste coccidiën kunnen worden gedetecteerd. Het ongefixeerde materiaal is vooral bedoeld voor het aantonen van wormeieren en larven. Ondanks de hogere werklust en de vereiste additionele training, heeft de TFT-procedure een aantal duidelijke voordelen. Niet alleen kan hiermee een

D. fragilis-infectie worden aangetoond, deze werkwijze verhoogt ook sterk de totaalopbrengst van het aantal parasieten vanwege het drievoudig verzamelen. Dit is vooral van belang voor de binnen Nederland belangrijke diarreeverwekker *Giardia lamblia*. De grotere winst aan apathogene protozoa, waaronder de veelvoorkomende *Blastocystis hominis*, maakt het voor de analisten aantrekkelijker om het onderzoek uit te voeren.³

Maar zelfs met de meest geavanceerde ophopings- en kleuringsmethoden blijven de bevindingen bij microscopisch onderzoek sterk afhankelijk van de individuele vaardigheden en ervaring van de betreffende analist. Uitkomsten zijn moeilijk controleerbaar en laten zich niet eenvoudig vastleggen in een kwaliteitscontrolesysteem. Analisten moeten voortdurend worden bijgeschoold om hun expertise te behouden, vooral omdat steeds meer parasieten nog slechts sporadisch in Nederland voorkomen.

Juist omdat het microscopisch onderzoek zo arbeidsintensief is, dient altijd kritisch te worden gekeken naar de waarschijnlijkheid van een parasitaire darminfectie bij de betreffende patiëntenpopulatie. Zo kunnen meer geavanceerde technieken, zoals een optisch-witfluorescentie voor de detectie van microsporidia, standaard worden toegepast, maar indien geen sprake is van enige vorm van immuunsuppressie, blijft de kans dat er met deze methode alsnog parasieten worden gevonden, uitermate klein. Zelfs bij routineonderzoek is het de vraag of herhaald en uitvoerig microscopisch ontlastingsonderzoek eigenlijk wel de meest efficiënte procedure is, gezien de dalende trend van het aantal parasitosen in Nederland. De lage detectiegraad wordt geïllustreerd door tabel 1 (zie pagina 142), waarin een overzicht wordt gegeven van de aantallen gevonden parasieten na eenmalig Ridley-sedimentonderzoek van ongefixeerde ontlasting. Dit betreft een groep patiënten ingestuurd voor microscopisch onderzoek vanuit drie middelgrote ziekenhuizen in de regio Den Haag. Een selectie werd gemaakt van die feces waarbij algemeen onderzoek naar wormeieren en cysten werd aangevraagd, zonder verdere anamnestiche gegevens over de reden van onderzoek of mogelijke expositie in het buitenland. Uit de tabel wordt duidelijk dat bij ruim 97 procent van de monsters geen pathogene parasieten werden aangetoond. *G. lamblia* komt als belangrijkste pathogeen naar voren, maar slechts met een prevalentie van 2 procent. Omdat in het Haagse onderzoek alleen ongefixeerde ontlasting werd onderzocht en geen zuurvaste kleuring werd uitgevoerd, zijn er geen gegevens over *D. fragilis* en *Cryptosporidium* spp. beschikbaar. De *G. lamblia*-prevalentie in de Haagse populatie lijkt laag vergeleken met de 9 tot 12 procent die op basis van dezelfde techniek eerder zijn gepubliceerd met betrekking tot patiënten van Nederlandse huisartsen,² maar komt geheel overeen met die van vergelijkbare onderzoeken uitgevoerd in academische ziekenhuizen in Amsterdam en Brussel.^{3,4} Het onderzoek in Brussel laat zien dat *G. lamblia* in een dergelijke populatie de meest frequente pathogene parasiet is (2,2 procent),

Tabel 1. Uitkomst van eenmalig microscopisch onderzoek naar een Ridley-sediment van ongefixeerde ontlasting. Alle patiënten werden zonder verdere anamnestiche gegevens ingestuurd voor onderzoek naar wormen en cysten. De gegevens betreffen de periode januari tot mei 2001, waarbij in totaal 1734 monsters vanuit drie ziekenhuizen in de regio Den Haag op deze wijze werden onderzocht.

	N	%
Potentieel pathogene protozoa		
<i>Giardia lamblia</i>	38	2,19
<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i> ¹⁾	6	0,35
Niet-pathogene protozoa		
<i>Entamoeba coli</i>	34	1,96
<i>Endolimax nana</i>	22	1,27
<i>Idamoeba butschlii</i>	5	0,28
<i>Entamoeba hartmanni</i>	3	0,17
<i>Blastocystis hominis</i>	3	0,17
<i>Chilomastix mesnili</i>	2	0,12
Wormen		
<i>Trichuris trichiura</i> ²⁾	1	0,06
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1	0,06
<i>Taenia spp.</i>	1	0,06

¹⁾ Na differentiatie met behulp van PCR: allen *Entamoeba dispar*.

²⁾ Bij navraag bleek deze patiënt afkomstig uit de tropen.

gevolgd door *D. fragilis* (2,0 procent) en *Cryptosporidium* spp. (1,1 procent).⁴ Daarnaast werden voornamelijk apathogene protozoa (inclusief *B. hominis*) gevonden. Deze werden gezien in 7,3 procent van het ongefixeerde materiaal en in 21,5 procent indien de TFT-procedure werd toegepast. Het aantal aangetoonde worminfecties was bijzonder laag, en verder onderscheid naar anamnestiche gegevens wordt in dit onderzoek niet gemaakt.⁴

Alternatieven

De logische vraag die uit dergelijke gegevens voortkomt, is of de aanpak niet valt om te draaien. Is het niet doeltreffender om op efficiënte en geautomatiseerde wijze gericht naar de meest relevante soorten te zoeken, voordat het arbeidsintensieve microscopische onderzoek wordt ingezet? De toepassing van copro-antigeendetectie is al een stap in deze richting en heeft voor *G. lamblia* bewezen zeer gevoelig en specifiek te zijn.⁵ Voor andere parasieten zijn dergelijke testen echter niet beschikbaar of hebben ze onvoldoende gevoeligheid om het microscopisch onderzoek daadwerkelijk volledig te vervangen.

Meer valt te verwachten van nucleïnezuuramplificatiemethoden, zoals de polymerasekettingreactie (PCR). Terwijl in het verleden, bij het gebruik van de conventionele PCR, het risico op contaminatie en de arbeidsintensieve procedures als problematisch werden ervaren, zien we door de ontwikkeling van *real-time* PCR, een sterke toename in de toepassing van moleculaire technieken binnen de laboratoriumdiagnostiek van infectieziekten.⁶ Bij *real-time* PCR wordt het product gedurende de amplificatie in een gesloten systeem gemeten, hetgeen niet alleen het risico op contaminatie sterk verkleint, maar ook het proces aanzienlijk minder arbeidsintensief maakt. Tevens maakt dit het mogelijk om een kwantitatieve uitslag te genereren. Hoe lager de *threshold cycle* (Ct-waarde) van de PCR, des te meer parasitair DNA in het uitgangsmateriaal aanwezig is. Door verschillende targets tot een zogenaamd multiplex *real-time* PCR te combineren, is het tevens mogelijk geworden een interne controle op zowel isolatie, amplificatie als detectie in te bouwen door middel van het toevoegen van niet-gerelateerd virus-DNA.⁷ Dit is belangrijk omdat ontlasting bekend staat om de aanwezigheid van remmende factoren voor de PCR, en bovendien een optimale controle op de uitvoering van de DNA-isolatieprocedure cruciaal is.

Entamoeba-PCR

De detectie van parasitair DNA in humane ontlasting is al vele jaren een landelijk geaccepteerde methode voor de differentiatie van *Entamoeba histolytica* en *E. dispar*. De cysten en niet-hematofage trofozoieten van deze twee soorten zijn namelijk morfologisch identiek, terwijl alleen *E. histolytica* amoebiasis kan veroorzaken en daarom adequaat dient te worden behandeld. Bij het aantonen van de niet-pathogene *E. dispar* is het zaak mogelijke andere oorzaken van de klachten te achterhalen. Van de bijna 2500 ontlastingmonsters die de afgelopen jaren vanuit heel Nederland bij ons laboratorium voor *Entamoeba*-differentiatie werden ingestuurd, kon in 5,8 procent *E. histolytica* worden aangetoond (Verweij et al., ongepubliceerde gegevens).^{8,9} Door de introductie van de multiplex *real-time* PCR voor de simultane detectie van *E. histolytica*, *E. dispar* en interne controle, kon deze differentiatie PCR verder worden geoptimaliseerd.¹⁰ Deze ontwikkeling opende de weg naar het toepassen van multiplex *real-time* PCR voor de detectie van andere intestinale parasieten.

PCR diarreeverwekkers

Hoewel de technische ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek nog steeds doorgaan, wordt in de meeste gevallen gewerkt met multiplex *real-time* PCR waarin maximaal vier targets binnen een test kunnen worden gecombineerd. Hierbij wordt steeds één plaats ingenomen door de interne controle. Bij de ontwikkeling van de eerste multiplex PCR voor de detectie van darmparasieten werd gekozen voor een combinatie van *E. histolytica*,

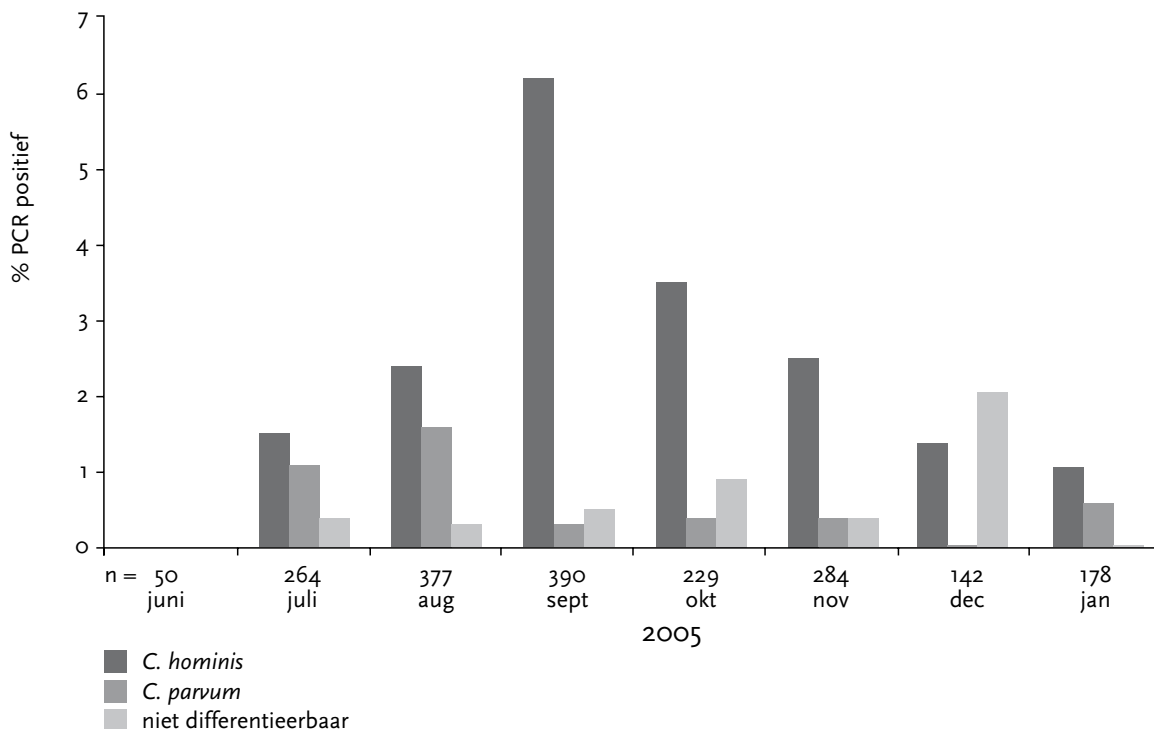
vanwege zijn potentieel ernstige beloop, met *G. lamblia* en *Cryptosporidium parvum*/*C. hominis* (HGC-PCR) als de twee meest algemeen voorkomende parasitaire diarreeverwekkers.¹¹ Uitgebreide technische evaluatie van deze HGC-PCR, inclusief het testen van een grote variatie aan negatieve controles en niet-gerelateerde controle-DNA's, lieten een specificiteit van 100 procent zien, in combinatie met een zeer hoge gevoeligheid. Juist bij een lage uitscheiding van parasieten vertoont de PCR op een enkel fecesmonster minimaal dezelfde gevoeligheid als microscopisch onderzoek bij drievoudige ontlasting.¹¹

Evaluatie in een huisartsenpopulatie

Recent werd de diagnostische waarde van de HGC-PCR onderzocht in feces-DNA-monsters afkomstig van 950 patiënten uit de regio Groningen, die tussen juni en september 2005 hun huisarts bezochten vanwege intestinale klachten.¹² De resultaten van de PCR werden vergeleken met routinematig uitgevoerd bacteriologisch (n=950) en parasitologisch (n=722) onderzoek. Dit onderzoek laat een aantal opmerkelijke resultaten zien. Met gebruik van de PCR werd aanzienlijk meer *G. lamblia* aangetoond (9,3 procent) vergeleken met microscopisch onderzoek (5,7 procent), met name in de leeftijd

van 5 tot 14 jaar, waar een verdubbeling van het aantal gedetecteerde infecties werd gezien. Een *G. lamblia*-infectie kon ook worden aangetoond in 6,6 procent van de 228 fecesmonsters die door de huisarts, waarschijnlijk vanwege de duur van de klachten, niet voor parasitair onderzoek werden ingestuurd. Routinematig microscopisch onderzoek leverde naast *G. lamblia* verassend weinig additionele pathogene parasieten op. *D. fragilis* werd bij 2,8 procent van de TFT-onderzochte patiënten gezien, en eenmalig werd een *Hymenolepis nana*-infectie geconstateerd. *E. histolytica* werd in deze populatie niet gevonden, maar het DNA van *C. parvum*/*C. hominis* kon in 4,3 procent van de monsters worden aangetoond. Bij 21,8 procent van de 110 kinderen jonger dan vijf jaar was de *C. parvum*/*C. hominis*-PCR positief.¹² Blijkbaar wordt deze parasiet nog door veel huisartsen en microbiologische laboratoria slechts geassocieerd met immuunsuppressie, in het bijzonder hiv/aids, en niet verwacht als belangrijke diarreeverwekker bij jonge kinderen. Verdere moleculaire differentiatie tussen *C. parvum* en *C. hominis* liet vooral bij de laatste soort een duidelijke seizoensinvloed zien, wat werd bevestigd door aanvullende analyse van nog eens 964 DNA-monsters, zoals weergegeven in *figuur 2* (Ten Hove et al., ongepubliceerde gegevens).

Figuur 2. Seizoensdistributie van *Cryptosporidium hominis*, *C. parvum* en ongedifferentieerde *Cryptosporidium* spp. in een huisartsenpopulatie in de regio Groningen. Feces (n=1914) werd verzameld tussen juni 2005 en januari 2006, en met behulp van PCR geanalyseerd op de aanwezigheid van *Cryptosporidium*. De differentiatie-PCR is minder gevoelig dan de detectie-PCR, waardoor bij een deel van de monsters geen onderscheid tussen *C. hominis* en *C. parvum* kon worden gemaakt. Gegevens zijn gedeeltelijk afkomstig uit de publicatie van Ten Hove, 2007.¹²



Tropenreizigers

Omdat de situatie naar verwachting anders is binnen een patiëntenpopulatie waarbij wel sprake is van intensief tropencontact, werd een vergelijkbaar onderzoek opgezet in samenwerking met het Instituut Tropische Geneeskunde in Antwerpen (Ten Hove et al., ongepubliceerde gegevens). In dit 13 maanden durende, prospectieve onderzoek werden wekelijks tussen de 40 en 100 ontlastingmonsters, die waren ingestuurd voor parasitologisch onderzoek, parallel geanalyseerd met behulp van zowel routinematig microscopisch onderzoek als via detectie van parasitair DNA. Vanwege het uitgesproken tropencontact van deze patiëntenpopulatie werd besloten naast de HGC-PCR ook een *real-time* PCR voor de detectie van *Strongyloides*-DNA in de wekelijkse analyse mee te nemen (Verweij et al., manuscript in voorbereiding). In totaal werden bijna 2600 monsters geanalyseerd, waarbij de sterk gereduceerde werklast van de moleculaire analyse ten opzichte van de microscopie als eerste in het oog sprong. Verder was ook hier de gevoeligheid van de toegepaste PCR's eenduidig hoger dan die van de microscopie. Opvallend genoeg bedroeg de prevalentie van microscopisch gevonden worminfecties maximaal 0,5 procent per parasieten-species, waaraan kan worden toegevoegd dat de gedetecteerde schistosomiasispatiënten tevens serologisch waren gediagnosticeerd. Uitkomsten van dit onderzoek worden momenteel verder geanalyseerd op een mogelijke associatie tussen de diagnostische bevindingen en reisanamnese of de aard van de klachten, zodat diagnostisch onderzoek in de toekomst mogelijk nog gericht kan worden ingezet. Zo kan het inzetten van een PCR voor de detectie van *Cyclospora cayatanensis* worden beperkt tot reizigers naar hoogrisicogebieden.^{13,14}

In ons laboratorium zijn recent ook additionele PCR's ontwikkeld voor verscheidene helminthen, te weten *Necator*, *Ancylostoma*, *Schistosoma*, *Ascaris*, *Trichuris* en *Opistorchis*. Enkele van deze PCR's werden al toegepast in epidemiologische onderzoeken in endemische gebieden in sub-Sahara Afrika, waarbij de kwantitatieve uitkomst van de PCR's additionele informatie opleverde.^{15,16} Een verdere kosten-batenanalyse moet uitwijzen op welke wijze deze PCR's eventueel als diagnostische methode in een Nederlandse setting kunnen worden ingezet.

Immuungecompromitteerde patiënten

Een bijzondere groep binnen de parasitaire fecesdiagnostiek vormen de opportunistische darmprotozoa, in het bijzonder de microsporidia.¹⁷ Microscopisch onderzoek naar deze groep parasieten is dermate specialistisch werk, dat dit slechts in een zeer beperkt aantal centra binnen Nederland naar behoren kan worden uitgevoerd. Daarom is binnen ons laboratorium gekozen voor een multiplex *real-time* PCR voor de detectie van *Enterocytozoon bienewsi* en *Encephalitozoon* spp., als eerstelijnsdiagnostiek van

microsporidiuminfecties, waarna microscopisch onderzoek slechts ter bevestiging wordt uitgevoerd.¹⁸ Zowel deze microsporidium-PCR, als een recent ontwikkelde PCR voor de detectie van *Isospora belli* (Ten Hove et al., submitted), blijken tevens een krachtige bijdrage te kunnen leveren bij het uitvoeren van wetenschappelijk onderzoek. Zo vonden we in een uitgebreid klinisch onderzoek naar diarreeverwekkers onder hiv/aidspatiënten in Malawi, een belangrijke associatie tussen de hoeveelheid aanwezig parasitair DNA, de ernst van de diarree en de immunestatus van de patiënt, weergegeven als aantal CD4-cellen (Van Lieshout et al., ongepubliceerde gegevens).

Recente ontwikkelingen

Door de snelle degeneratie van *D. fragilis*-trofozoïeten in ongefixeerde ontlasting lag het in de lijn der verwachting dat een PCR voor de detectie van deze parasiet weinig gevoelig zou zijn. SAF- of formalinegefixeerde feces, waarbij de trofozoïeten wel intact blijven, is namelijk niet geschikt voor PCR. Daarom werd een uitgebreide vergelijking gedaan in Ct-waarden van de *D. fragilis real-time* PCR, tussen ongefixeerde feces en feces opgenomen in ethanol. Hierbij werd aangetoond dat het DNA van deze parasiet nog uitstekend in ongefixeerde ontlasting aantoonbaar is, zelfs na opslag tot acht weken bij 4 °C.¹⁹ Deze bevinding maakt het zeer interessant een multiplex *real-time* PCR op te zetten waarin de detectie van *D. fragilis* wordt gecombineerd met de detectie van *G. lamblia* en *Cryptosporidium* spp. Verdere evaluatie zal duidelijk maken in welke mate deze multiplex *real-time* PCR geschikt is voor standaardtoepassing bij Nederlandse huisartsenpatiënten van wie ontlasting wordt ingestuurd met de verdenking op darmparasieten. Een aantal microbiologische laboratoria heeft de *D. fragilis*, *E. histolytica*, *G. lamblia*, en de *C. parvum/C. hominis real-time* PCR's al in hun diagnostisch pakket opgenomen. Tevens biedt het toepassen van deze PCR's veel mogelijkheden voor klinisch, epidemiologisch en therapeutisch wetenschappelijk onderzoek. Zo kan het een sterk diagnostisch instrument zijn bij het onderzoek naar de mate van pathogeniciteit van *D. fragilis*.²⁰ Naast het speciesspecifiek aantonen en kwantificeren van parasitair DNA, biedt de moleculaire diagnostiek veel onderzoeksmogelijkheden op het gebied van genetische typering.²¹

Conclusie

Uit het voorafgaande mag duidelijk zijn dat de moleculaire diagnostiek, net zoals in de andere (microbiologische) disciplines, terrein zal winnen binnen de parasitologische patiëntendiagnostiek. Steeds verdere vereenvoudiging en geautomatiseerde procedures van isolatie en amplificatie, maken het mogelijk *real-time* PCR op grote schaal toe te passen. In combinatie met een hoge sensitiviteit en specificiteit, de mogelijkheid verschillende DNA-targets te combineren tot één test, en het kwantitatief kunnen

meten, zorgt deze ontwikkeling ervoor dat de moleculaire diagnostiek een steeds aantrekkelijker alternatief wordt voor het klassieke morfologische onderzoek. Ook de toenemende eisen van een kwaliteitssysteem, waarbij bevindingen meetbaar, herhaalbaar en controleerbaar moeten zijn, stimuleert verdere implementatie van de PCR in de routinediagnostiek. Daarbij zien we de afgelopen jaren bij het fecesonderzoek naar wormen en protozoa een dalende prevalentie van parasieten, in het bijzonder van worminfecties. Er wordt dus relatief veel analistentijd gestoken in de morfologische detectie van een beperkt aantal pathogenen. De meest logische aanpak voor de toekomst lijkt het screenen door middel van *real-time* PCR op de meest voorkomende organismen *D. fragilis*, *G. lamblia* en *C. parvum/C. hominis*, om daarna, al dan niet met behulp van PCR, gericht te gaan zoeken bij die aanvragen waar anamnestic gegevens duiden op meer exotische parasieten, of wanneer de patiënt zeer specifieke vraagstellingen met zich meebrengt. Gedegen kennis over parasitaire infecties blijft daarbij essentieel, aangezien het moleculaire onderzoek zich geheel beperkt tot de detectie van die soorten die als DNA-targets in de test zijn opgenomen, en toevalsbevindingen niet meer zichtbaar zullen zijn.

Summary

This article describes recent developments in the laboratory diagnosis of intestinal parasites, focusing on the Dutch situation. Similar to other disciplines within medical microbiology, molecular techniques are increasingly used, in particular real time polymerase chain reaction (PCR). Initially, PCR's demonstrating parasitic DNA in human stool samples were employed to differentiate morphological identical *Entamoeba* species. However, during recent years multiplex real time PCR's have been increasingly used for the detection and quantification of DNA from a whole range protozoa and helminths species. The advantages of PCR diagnosis are illustrated by recent data, not only demonstrating high sensitivity and specificity compared to routine microscopy, but also showing real time PCR to be a powerful tool in epidemiological and clinical research. An increasing number of diagnostic laboratories within the Netherlands, including non-academic centres, seems to implement these molecular techniques for routine diagnostics.

Dankwoord

Onze dank gaat uit naar de diverse onderzoeksgroepen en microbiologische laboratoria, ondermeer in Antwerpen, Breda, Enschede, Groningen, Zwolle en verscheidene niet-Europese landen, voor de prettige en constructieve samenwerking in het kader van het onderzoek dat in dit artikel wordt samengevat.

Literatuur

- Polderman AM. Medische parasitologie. Arnhem: Syntax Media, 2005.
- Mank TG, Zaat JO, Blotkamp J, Polderman AM. Comparison of fresh versus sodium acetate acetic acid formalin preserved stool specimens for diagnosis of intestinal protozoal infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14:1076-81.
- Van Gool T, Weijts R, Lommerse E, Mank TG. Triple Faeces Test: an effective tool for detection of intestinal parasites in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003;22:284-90.
- Vandenberg O, Van LY, Souayah H, Kutane WT, Van Gool T, Dediste A. Improvement of routine diagnosis of intestinal parasites with multiple sampling and SAF-fixative in the triple-faeces-test. *Acta Gastroenterol Belg* 2006;69:361-6.
- Mank TG, Zaat JO, Deelder AM, van Eijk JT, Polderman AM. Sensitivity of microscopy versus enzyme immunoassay in the laboratory diagnosis of giardiasis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997;16:615-9.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:165-256.
- Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 3):S3-12.
- Verweij JJ, Van Lieshout L, Blotkamp J, Brienen EAT, Van Duivenvoorden S, Van Esbroeck M, et al. Differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* using PCR-SHELA and comparison of antibody response. *Archives of Medical Research* 2000;31:S44-S46.
- Visser LG, Verweij JJ, Van Esbroeck M, Edeling WM, Clerinx J, Polderman AM. Diagnostic methods for differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in carriers: performance and clinical implications in a non-endemic setting. *Int J Med Microbiol* 2006;296:397-403.
- Qvarnstrom Y, James C, Xayavong M, Holloway BP, Visvesvara GS, Sriram R, et al. Comparison of real-time PCR protocols for differential laboratory diagnosis of amebiasis. *J Clin Microbiol* 2005;43:5491-7.
- Verweij JJ, Blange RA, Templeton K, Schinkel J, Brienen EA, van Rooyen MA, et al. Simultaneous detection of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, and *Cryptosporidium parvum* in fecal samples by using multiplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004;42:1220-3.
- Ten Hove R, Schuurman T, Kooistra M, Moller L, Van Lieshout L, Verweij JJ. Detection of diarrhoea-causing protozoa in general practice patients in The Netherlands by multiplex real-time PCR. *Clin Microbiol Infect* 2007; in press.
- Verweij JJ, Laeijendecker D, Brienen EA, Van Lieshout L, Polderman AM. Detection of *Cyclospora cayetanensis* in travellers returning from the tropics and subtropics using microscopy and real-time PCR. *Int J Med Microbiol* 2003;293:199-202.
- Blans MC, Ridwan BU, Verweij JJ, Rozenberg-Arska M, Verhoef J. Cyclosporiasis outbreak, Indonesia. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1453-5.
- Verweij JJ, Brienen EAT, Ziem JB, et al. Semi-quantitative detection of *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, and *Oesophagostomum bifurcum* infection in fecal samples using multiplex real-time pcr. *Trop Med Int Health* 2007 12(51):25-146.
- Ten Hove R, Verweij JJ, Vereecken K, Polman K, Dieye L, Van Lieshout L. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in Northern Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; in press.
- Lewthwaite P, Gill GV, Hart CA, Beeching NJ. Gastrointestinal parasites in the immunocompromised. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:427-35.
- Verweij JJ, Ten Hove R, Brienen EA, Van Lieshout L. Multiplex detection of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon* spp. in fecal samples using real-time PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:163-7.
- Verweij JJ, Mulder B, Poell B, Van Middelkoop D, Brienen EA, Van Lieshout L. Real-time PCR for the detection of *Dientamoeba fragilis* in fecal samples. *Mol Cell Probes* 2007;21:400-4.
- Stumpel OFB, Tolboom JJM, Warris A, Beckers PJA, Draaisma JMTh. *Dientamoeba fragilis*, vooral bij kinderen pathogeen? *Tijdschrift voor Infectieziekten* 2006;1:155-9.
- Monis PT, Giglio S, Keegan AR, Thompson ARC. Emerging technologies for the detection and genetic characterization of protozoan parasites. *Trends Parasitol* 2005;21:340-6.

Posaconazol, een nieuw breed spectrum triazol

R.J.M. Brüggemann en P.E. Verweij

Samenvatting

Posaconazol is een nieuw breed spectrum triazol. In preklinisch onderzoek is activiteit aangetoond tegen gisten (waaronder *Candida* en cryptokokken), opportunistische schimmels (zoals *Aspergillus*, *Fusarium* en zygomyceten) en tegen verwekkers van endemische mycosen. Het middel is beschikbaar als orale suspensie en wordt het beste geabsorbeerd met een vetrijke maaltijd. Posaconazol heeft een gunstig bijwerkingenprofiel. In klinisch onderzoek bleek posaconazol effectief in het voorkomen van invasieve mycosen bij neutropene patiënten en patiënten met graft-versus-hostziekte. In niet-gerandomiseerde onderzoeken was posaconazol effectief tegen invasieve fusariose en invasieve zygomycose. Het middel lijkt een aanwinst voor de preventie en behandeling van moeilijk te behandelen schimmelinfecties.

Trefwoorden: posaconazol, breed spectrum triazol, schimmel-infecties, aspergillose, zygomycose, fusariose, itraconazol, voriconazol, fluconazol

Inleiding

Invasieve infecties door schimmels zijn een ernstige complicatie bij patiënten met een sterk verminderde weerstand. Invasieve infecties door *Candida* hebben sinds jaren een hoge letaliteit, ondanks de beschikbaarheid van nieuwe antifungale middelen zoals de echinocandines. *Aspergillus* blijft een belangrijke verwekker van invasieve infecties, met name bij patiënten die worden behandeld voor hematologische maligniteiten, hoewel de prognose van patiënten met deze infectie in de afgelopen jaren enigszins lijkt te verbeteren.¹ Naast *Aspergillus* lijkt de incidentie van infecties door andere schimmels toe te nemen, zoals de zygomyceten, waarvan het tijdig stellen van de diagnose vaak moeilijk is en de therapeutische mogelijkheden beperkt zijn. Andere schimmels die incidenteel invasieve infecties veroorzaken, zoals *Fusarium*-species en *Scedosporium* sp. zijn vaak therapieresistent voor de gangbare antimycotica.

Bij de behandeling van invasieve schimmelinfecties speelt de klasse van de azolen een belangrijkere rol.² Fluconazol is vaak eerstekeusbehandeling voor patiënten met invasieve en oppervlakkige gistinfecties, met

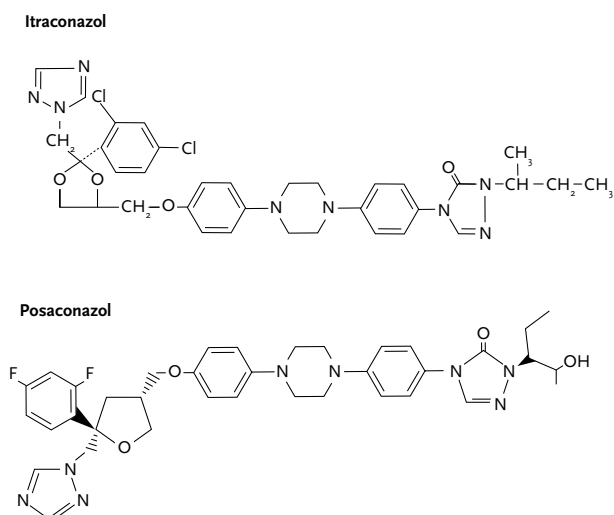
voriconazol als alternatief.³ Voriconazol neemt tevens een belangrijke plaats in als eerstekeusmiddel voor de primaire behandeling van invasieve aspergillose. Naast de azolen spelen de echinocandines een steeds belangrijkere rol. Caspofungine wordt veelal ingezet bij de behandeling van invasieve *Candida*-infecties, met name als de patiënt hemodynamisch instabiel is, recent is behandeld met azolen of in het geval dat de infectie wordt veroorzaakt door *Candida glabrata* of *C. krusei*. Recentelijk is in gerandomiseerd onderzoek aangetoond dat anidulafungine en micafungine eveneens effectief zijn bij de behandeling van invasieve *Candida*-infecties.^{4,5}

De rol van conventioneel amfotericine B lijkt beperkt, met name door het bijwerkingenprofiel van dit middel en de beschikbaarheid van minder toxische alternatieven.⁶ Voor de lipideformuleringen van amfotericine B is wel een rol weggelegd bij de behandeling van invasieve mycosen. De middelen kenmerken zich door een breed antifungaal spectrum en een duidelijk gunstiger bijwerkingenprofiel dan het conventionele amfotericine B. Lipideformuleringen van amfotericine B worden gebruikt bij de behandeling van invasieve candidiasis, voor primaire behandeling van invasieve zygomycose of bij patiënten met invasieve aspergillose die falen op primaire behandeling. Daarnaast zijn deze middelen effectief bij de behandeling van cryptokokkeninfecties.⁷ Liposomaal amfotericine B was tevens effectief bij de primaire behandeling van invasieve aspergillose, waarbij patiënten die enkele dagen werden behandeld met een dosis van 10 mg/kg, een vergelijkbare respons lieten zien als patiënten die een dosis kregen van 3 mg/kg per dag.⁸ Recentelijk is een nieuwe triazol geregistreerd in Nederland, posaconazol. In dit artikel willen wij een overzicht geven van dit nieuwe middel en ingaan op enkele specifieke kenmerken.

R.J.M. Brüggemann en P.E. Verweij, afdelingen Apotheek/Klinische Farmacie en Medische Microbiologie, Universitair Medisch Centrum St Radboud en Nijmeegs Universitair Centrum voor Infectieziekten. Correspondentieadres: prof. dr. P.E. Verweij, afdeling Medische Microbiologie, UMC St Radboud, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen, e-mail: p.verweij@mmb.umcn.nl.

Posaconazol is een tweedegeneratie breed spectrum triazol. Posaconazol blokkeert de synthese van ergosterol, een essentiële bouwsteen van de celmembranen van schimmels en gisten. Posaconazol inhibeert het lanosterol-14- α -demethylase (CYP51), een cytochroom P450-enzym dat wordt gecodeerd door *ERG11*.⁹ Posaconazol lijkt structureel sterk op itraconazol (figuur 1). Ten opzichte van voriconazol en fluconazol heeft posaconazol een langere zijketen. Dit maakt dat posaconazol een hogere bindingsactiviteit vertoont met het CYP51.

Figuur 1. Structuurformules van itraconazol en posaconazol.



Farmacologie

Posaconazol is beschikbaar als een orale suspensie en is geïndiceerd voor profylaxe en behandeling van invasieve schimmelinfecties bij volwassenen en adolescenten vanaf 12 jaar.⁹ Toepassing bij kinderen vanaf acht jaar valt buiten de officiële registratie maar is wel beschreven in de literatuur.¹⁰ Er zijn geen gegevens bekend over de toepassing van posaconazol bij grote groepen kinderen jonger dan acht jaar. De intraveneuze toedieningsvorm van posaconazol wordt tot op heden alleen toegepast binnen de setting van klinisch onderzoek.

De gebruikelijke dosering voor behandeling van invasieve schimmelinfecties met posaconazol bedraagt tweemaal daags 400 mg bij een regulier voedingspatroon. Bij patiënten met een slechte voedingstatus dient de dosering te worden gesplitst over de dag in viermaal daags 200 mg. Indien posaconazol als profylactisch middel wordt gegeven, zijn lagere doseringen van driemaal daags 200 mg beschreven.^{11,12}

Absorptie en distributie

Posaconazol wordt langzaam geabsorbeerd met een mediane T_{max} van vijf uur. Het verdelingsvolume bedraagt

circa 1700 liter en het middel is zeer sterk eiwitgebonden (meer dan 98 procent). De steady-state-concentratie wordt bereikt na een periode van 7 tot 10 dagen.

Toediening van een enkele orale dosis posaconazol variërend van 50 tot 800 mg aan gezonde vrijwilligers liet een lineair farmacokinetisch beeld zien.¹³ Bij doseringen boven de 800 mg werden geen verdere stijgingen van de plasmaconcentraties of totale blootstelling meer waargenomen. Daarnaast blijkt toediening van posaconazol in twee of vier giften per dag de blootstelling te verhogen met een factor 2 respectievelijk 3 in vergelijking met een dosering van eenmaal daags.

De aanwezigheid en samenstelling van voedsel zijn belangrijke determinanten in de absorptie van posaconazol. Na toediening van een enkele gift posaconazol aan gezonde vrijwilligers was de blootstelling 4 maal zo hoog indien gegeven met een vetrijke maaltijd en 2,6 maal zo hoog indien gegeven met een vetarme maaltijd ten opzichte van geen maaltijd.¹⁴

Metabolisme en eliminatie

Posaconazol wordt via een fase-II-reactie (UDP-glucuronosyltransferase-enzymstelsel) omgezet tot een niet-actieve metaboliet.^{15,16} Ongeveer 78 procent van het geneesmiddel wordt teruggevonden in de feces.¹⁶ Het merendeel van de door de lever gevormde metabolieten wordt met de urine uitgescheiden. De eliminatiehalfwaardetijd is gemiddeld 35 uur.¹³ (spreiding 20-66 uur). Posaconazol is een substraat voor p-glycoproteïne (P-gp)-efflux *in vitro* (tabel 1).

Tabel 1. Farmacokinetisch profiel van posaconazol.²⁵

PARAMETER	WAARDE
Absorptie	
Biologische beschikbaarheid (%)	Niet vastgesteld
Invloed voedsel	Voedsel verhoogt de biologische beschikbaarheid
Verdeling	
Verdelingsvolume (L)	1774
Plasmaeiwitbinding (%)	> 98
Tijd tot plasmapijkconcentratie (uur)	5
Tijd tot bereiken van steady-state-concentratie (dagen)	7-10
Metabolisme	Glucuronidering
Eliminatie	
Eliminatiehalfwaardetijd (uur) (spreiding)	35 (20-66)
Belangrijkste route van eliminatie	Hepatisch
	Metabolieten: urine

Posaconazol bij speciale patiëntenpopulaties

Posaconazol kent een redelijk grote interindividuele variatie van plasmaspiegels, wat mogelijk is toe te schrijven aan verschillen in absorptie (invloed voedsel, mucositis etc.) maar ook aan verschillen in metabolisme.¹⁰ Leeftijd, geslacht en ras hebben geen klinisch relevant effect op de steady-state-farmacokinetiek van posaconazol bij gezonde vrijwilligers.¹⁷ Dosisaanpassingen op basis van genoemde covariaten zijn dan ook niet noodzakelijk.

Toepassing bij leverfunctiestoornis

Leverenzymstijgingen zijn bij het gebruik van posaconazol gerapporteerd. De verhoogde waarden waren meestal reversibel bij het staken van de behandeling; in sommige gevallen normaliseerden deze waarden zonder onderbreking van de behandeling. Ernstige afwijkingen van leverenzymen zijn zelden waargenomen. Patiënten met pre-existente verhoging van leverenzymen vereisen een meer frequente controle bij behandeling met posaconazol. Door een vertraagd metabolisme kan bij deze patiënten de halfwaardetijd zijn verlengd, leidend tot een hogere blootstelling en derhalve een hogere kans op bijwerkingen.⁹

Toepassing bij nierfunctiestoornis

Chronische nierinsufficiëntie heeft geen invloed op de farmacokinetische eigenschappen van posaconazol en een dosisaanpassing is niet vereist.¹⁸ Posaconazol wordt niet extracorporeel geklaard door hemodialyse.¹⁸ Blootstelling aan posaconazol varieerde sterk bij patiënten met ernstig nierfalen (CLcr < 20 ml/min). De reden voor deze sterke variatie is niet bekend. De variatie kan mogelijk worden toegeschreven aan de grote hoeveelheid comedicaatie die deze patiëntengroep kreeg.

Toepassing bij mucositis

Posaconazolabsorptie lijkt verminderd bij patiënten met een graad-I- en -II-mucositis vergeleken met patiënten zonder mucositis. Het splitsen van de dosis in vier gelijke hoeveelheden lijkt de biologische beschikbaarheid te vergroten bij deze populatie.¹⁹

Bijwerkingen

De voornaamste bijwerkingen van posaconazol zijn over het algemeen mild tot matig ernstig van aard (tabel 2). Het betreft voornamelijk gastro-intestinale bijwerkingen en symptomen als hoofdpijn, duizeligheid, somnolentie en vermoeidheid.^{9,19,20} Deze bijwerkingen lijken niet dosisgerelateerd. Cardiale bijwerkingen inclusief verlenging van het QTc-interval zijn gerapporteerd. Controle van elektrolytenconcentraties, in het bijzonder die van kalium, magnesium en calcium, zijn nodig tijdens de behandeling met posaconazol. In een groep van 428 patiënten met refractaire infecties die posaconazol ontving in het kader van ongeblindeerde onderzoeken (fase II of III) werden

relatief weinig ernstige bijwerkingen vastgesteld.²¹ In deze groep waren 109 patiënten die gedurende meer dan zes maanden met posaconazol werden behandeld; ook in deze subgroep werd het middel goed verdragen. Ten opzichte van voriconazol onderscheidt posaconazol zich door het ontbreken van visuele hallucinaties. Hoewel deze bijwerking van voriconazol van voorbijgaande aard is, is het in sommige gevallen reden tot staken van de antifungale therapie. Posaconazol is in deze gevallen een geschikt alternatief. De bovengenoemde bijwerkingen van posaconazol betreffen voornamelijk een klasse-effect van de azolen. Gezien de recente introductie van posaconazol is het moeilijk de langetermijnbijwerkingen van het middel te beoordelen. Postmarketingsurveillance zal moeten uitwijzen of posaconazol preferentieel is ten opzichte van de andere azolen op het niveau van bijwerkingen.

Interacties

Remmers van het UDP-glucuronosyltransferase en P-glycoproteïne kunnen leiden tot verhoging van de plasmaconcentraties van posaconazol, terwijl inductoren van deze enzymen de plasmaconcentratie juist zullen verlagen. Gelijktijdige toediening van antacida heeft geen klinisch relevant effect op de blootstelling van posaconazol²² terwijl gelijktijdige toediening van cimetidine de plasmaconcentraties van posaconazol verlaagt met 39 procent.⁹ Het effect van andere H₂-receptorantagonisten (bijvoorbeeld famotidine en ranitidine) en protonpompremmers (bijvoorbeeld omeprazol en pantoprazol) op plasmaspiegels van posaconazol werd niet onderzocht, maar een vermindering in de biologische beschikbaarheid kan optreden, zodat gelijktijdige toediening moet worden vermeden.

Posaconazol is een potente remmer van het cytochroom P450 3A4 iso-enzym. Voorzichtigheid is geboden bij gelijktijdige toediening van CYP3A4-substraten, en de dosis van het CYP3A4-substraat dient mogelijk te worden verminderd. Posaconazol vertoont interacties met onder meer: HMG-CoA reductase-inhibitoren (onder meer simvastatine en atorvastatine); vinca-alkaloiden;²³ immunosuppressiva (cyclosporine,^{24,25} tacrolimus,²⁶ sirolimus); antiretrovirale middelen (hiv-proteaseremmers en non-nucleoside reversetranscriptaseremmers); benzodiazepines (onder meer midazolam);²⁷ calciumkanaalblokkers (onder meer diltiazem, verapamil, nifedipine, nisoldipine) en overige middelen zoals fenytoïne,²⁸ rifabutine²⁹ en digoxine.

Optimalisatie en dosisindividualisatie van posaconazol middels monitoren van plasmaspiegels

Tot op de dag van vandaag is het meten van spiegels van posaconazol geen routine. Onderzoek zal moeten uitwijzen of het meten van plasmaspiegels van posaconazol toegevoegde waarde heeft om bijvoorbeeld adequate resorptie en zodoende voldoende blootstelling vast te stellen om een therapeutisch effect te behalen.

Tabel 2. Bijwerkingen van posaconazol (bron: Farmacotherapeutisch Kompas 2007).

ORGAAN/LICHAAMSDEEL	BIJWERKINGEN	IN %
Ademhalingsstelsel	Pijn op de borst, hoesten, dyspneu, epistaxis, faryngitis, nasale congestie, droge keel, pneumonie, sinusitis	0,1-1
Bloed- en lymfestelsel	Neutropenie	1-10
	Trombocytopenie, leukopenie, eosinoflie, lymfadenopathie, pancytopenie	0,1-1
	Verlengde protrombinetijd, neutrofilie, verhoogd aantal bloedplaatjes, cerebrovasculair accident	0,01-0,1
Bloedvaten	Opvliegers	1-10
	<i>Flushing</i> , hematoom, hypertensie, hypotensie, toegenomen transpiratie, periorbitaal oedeem, ascites	0,1-1
Hart	Abnormaal ecg, verlenging QTc/QT-interval, tachycardie, hartfalen, cardiorespiratoire stilstand, extrasystole, palpitatie, pijn op de borst	0,1-1
	Bradycardie, bundeltakblok, plotse dood	0,01-0,1
Huid en onderhuid	Droge huid, pruritus, <i>rash</i>	1-10
	Haaruitval, stomatitis	0,1-1
Immuunsysteem	Overgevoeligheidsreacties, stevens-johnsonsyndroom	0,01-0,1
Infecties	Orale of oesofageale candidiasis	0,1-1
Lever en galwegen	Verhoogde waarden bij leverfunctietesten	0,1-1
	Leverfalen, cholestatische hepatitis, leverbeschadiging	0,01-0,1
Maagdarmstelsel	Diarree, dyspepsie, flatulentie, buikpijn, braken, anorexie, misselijkheid, droge mond	1-10
	Problemen met de stoelgang, gastritis, gastro-oesofageale refluxpancreatitis, dysfagie, proctalgie	0,1-1
	Gastro-intestinale hemorragie, ileus	0,01-0,1
Nier en urinewegen	Mictiestoornissen, acuut nierfalen, nierinsufficiëntie, nycturie	0,1-1
	Bijnierschorsinsufficiëntie, interstitiële nefritis	0,01-0,1
Oog	Conjunctivitis, troebel zicht, oogpijn	0,1-1
Oor en evenwichtsorganen	Oorpijn, gehoorstoornis	0,1-1
Psychisch	Slaapstoornissen, vermoeidheid	1-10
	Angst, verwarring, paranoïdie, malaise	0,1-1
Spieren, gewrichten en bindweefsel	Rugpijn	1-10
	Spierpijn, gewrichtspijn, botpijn	0,1-1
Lichaam algemeen	Koorts	1-10
	Tandverkleuring	0,1-1
	Oedeem van tong en gelaat	0,01-0,1
Voortplantingsstelsel	Leukorroë	0,1-1
Zenuwstelsel	Duizeligheid, hoofdpijn, paresthesie, asthenie	1-10
	(Perifere) neuropathie, verstoorde concentratie, hyperreflexie, hypo-esthesie, tremor, convulsies, rigor, smaakverandering, dorst	0,1-1

Preklinisch onderzoek

Antifungale activiteit

Er zijn veel gegevens in de literatuur gepubliceerd over de *in-vitro*-activiteit van posaconazol. Het middel heeft een zeer breed spectrum, met activiteit tegen *Candida* en *Aspergillus*. Het middel is actief tegen de meest voorkomende gisten

zoals *C. albicans*, de kiembuis negatieve gisten, zoals *C. glabrata* en *C. krusei*, cryptokokken, en *Aspergillus*-species. Evenals voriconazol heeft posaconazol activiteit tegen *A. terreus*, een schimmel die verminderd gevoelig is voor amfotericine B.³⁰ De azolen lijken niet werkzaam tegen *A. calidoustus* (voorheen *A. ustus*), een minder frequente verwekker van invasieve aspergillose.^{31,32}

In een groot onderzoek waarin 19.000 stammen werden onderzocht, bleek dat 90 procent van de onderzochte stammen werden geremd bij een concentratie van 1 mg/l posaconazol.³³ Vergeleken met andere triazolen was een lagere concentratie posaconazol nodig voor remming van de groei van deze schimmels en gisten. Posaconazol heeft ook activiteit tegen zeldzamere verwekkers van invasieve mycosen zoals *Fusarium*, *Scedosporium* en zygomyceten.^{33,34} Een aantal van deze verwekkers wordt geremd bij een concentratie van posaconazol die hoger is dan 1 mg/l, maar dierexperimenteel onderzoek en klinische ervaring geven aan dat er *in vivo* wel een respons kan zijn. Hogere MIC's werden onder meer gevonden voor *F. solani* en *F. oxysporum*, *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. en *Scedosporium prolificans*.^{33,34} Tegen deze laatstgenoemde schimmel lijkt het middel niet werkzaam, wel tegen andere vertegenwoordigers van het *Pseudoallescheria boydii*-complex.^{34,35} Bij de zygomyceten valt op dat er zowel tussen genera en species als binnen dezelfde species grote verschillen bestaan in MIC's van posaconazol. In een onderzoek varieerden de MIC's voor *Rhizopus* sp. en *Mucor* sp. tussen de 0,25 en 8 mg/l.³⁶ Isolaten geïdentificeerd als *R. microsporus* var. *rhizopodiiformis* hadden uiteenlopende MIC's voor amfotericine B en posaconazol.³⁷ Dit kan erop wijzen dat zich binnen de verschillende species andere of nieuwe species bevinden, wat wellicht duidelijk zal worden als de taxonomie van de zygomyceten opnieuw wordt onderzocht met toevoeging van moleculaire technieken. Posaconazol en itraconazol bleken een hogere affiniteit te hebben voor het aangrijpingspunt, het CYP51A, in *R. oryzae* en *A. corymbifera*, en bereikten tevens intracellulair hogere concentraties dan fluconazol en voriconazol.³⁸ De verwekkers van endemische mycosen zoals *Histoplasma* sp., *Blastomyces* sp., *Coccidioides* sp., *Paracoccidioides* sp., *Penicillium marneffei*, en *Sporothrix* sp. zijn *in vitro* zeer gevoelig voor posaconazol.^{33,39} Ten slotte is posaconazol werkzaam *in vitro* tegen dermatofyten.⁴⁰ Posaconazol heeft dus een zeer breed werkingspectrum, waarbij met name de activiteit tegen zygomyceten het middel onderscheidt van het spectrum van de andere azolen. Kruisresistentie is bij azolen een punt van zorg. Bij schimmels met verminderde gevoeligheid voor itraconazol of fluconazol kan de activiteit van posaconazol ook verminderd zijn. *C. albicans*-stammen die verminderd gevoelig waren voor itraconazol en fluconazol, waren tevens verminderd gevoelig voor posaconazol.⁴¹ Voor *A. fumigatus* waren stammen die verminderd gevoelig waren voor itraconazol eveneens verminderd gevoelig voor posaconazol.^{42,43} Of de verminderde gevoeligheid *in vitro* zich vertaalt in een verminderde effectiviteit en daarmee klinische relevantie heeft, is op dit moment nog onvoldoende onderzocht.

In-vivo-effectiviteit

Er is een groot aantal dierexperimentele onderzoeken beschreven waarin de effectiviteit van posaconazol

tegen verschillende verwekkers van opportunistische mycosen wordt geëvalueerd. Posaconazol was effectief bij de behandeling van candidiasis, aspergillose, histoplasmose en coccidioïdomycosis, wat in overeenstemming is met de gepubliceerde *in-vitro*-activiteit. Onlangs is een literatuuroverzicht gepubliceerd van het dierexperimenteel onderzoek met posaconazol.⁴⁴ In een model van invasieve fusariose was de overleving van met posaconazol behandelde muizen significant verlengd ten opzichte van de controles, en vergelijkbaar met die van dieren behandeld met amfotericine B. Hoewel de MIC van de *F. solani*-stam met 4 mg/l relatief hoog was, werden sommige organen, zoals de lever, zelfs gesteriliseerd.⁴⁵ Bij *Fusarium* lijkt dus een discrepantie te zijn tussen de *in-vitro*-activiteit en *in-vivo*-effectiviteit van posaconazol. In een ander onderzoek werd de effectiviteit van posaconazol onderzocht door muizen geïnfecteerd met een itraconazol-gevoelige *A. fumigatus*-stam te vergelijken met muizen die waren geïnfecteerd met een itraconazolresistente stam. Posaconazol was minder effectief bij de muizen die werden geïnfecteerd met de resistente stam, wat wijst op kruisresistentie. De overleving van muizen geïnfecteerd met de itraconazolresistente stam was echter 100 procent bij die groepen die waren behandeld met de hoogste dosis posaconazol, terwijl behandeling met itraconazol niet effectief was.⁴⁶ In dit model was een goede correlatie tussen dosering en kwantitatieve kweek van *A. fumigatus* van de organen. In het algemeen valt op dat in de meeste experimenten de effectiviteit van posaconazol wordt vergeleken met die van de polyenen of van itraconazol. Er zijn weinig onderzoeken verricht waarin de effectiviteit direct wordt vergeleken met die van voriconazol. De effectiviteit van posaconazol bij invasieve zygomycose varieerde afhankelijk van de onderzochte schimmel. In een non-neutropenisch muismodel toonde posaconazol geen effectiviteit tegen *Rhizopus oryzae* en was het deels effectief bij infectie met *A. corymbifera*.⁴⁷ In een immuungecompromiteerd model verlengde posaconazol de overleving van muizen die waren geïnfecteerd met *Mucor* sp.⁴⁸ Profylaxe met posaconazol leidde tot significante verlenging van de overleving van met *R. oryzae* of *A. corymbifera* geïnfecteerde muizen.⁴⁹

Klinische effectiviteit

Profylaxe

De effectiviteit van posaconazol bij het voorkomen van invasieve mycosen is onderzocht bij 600 patiënten met graft-versus-host-ziekte na allogene hematopoëtische stamceltransplantatie.¹² In dit dubbelblinde, gerandomiseerde onderzoek ontvingen 301 patiënten posaconazolprofylaxe in een dosis van driemaal daags 200 mg; 299 patiënten ontvingen fluconazol in een dosering van 400 mg eenmaal daags. De primaire uitkomstparameter

was het optreden van invasieve mycosen (bewezen of waarschijnlijk), bijwerkingen die leidden tot het stoppen van de profylaxe of overlijden ten gevolge van de onderliggende ziekte op dag 112 na randomisatie. In de posaconazolgroep ontwikkelden 16 patiënten een invasieve mycose versus 27 in de fluconazolgroep ($p=0,074$). Het verschil bij patiënten die een invasieve aspergillose ontwikkelden was wel significant: 7 versus 21 patiënten ($p=0,006$). Deze verschillen leidden niet tot een significant verschil in letaliteit tussen beide groepen ($p=0,847$).¹² Zoals eerder vermeld werden beide middelen goed verdragen. Posaconazol was effectiever ten opzichte van fluconazol in het voorkomen van invasieve aspergillose, en even effectief als fluconazol in het voorkomen van invasieve mycosen. Een tweede profylaxeonderzoek betrof een niet-geblindeerd, gerandomiseerd onderzoek bij neutropene patiënten met een nieuw gediagnosticeerde acute myeloïde leukemie (AML), een eerste conditioneringkuur voor AML of met een myelodysplastisch syndroom.¹¹ In totaal werden 602 patiënten gerandomiseerd naar profylaxe met posaconazol in een dosis van driemaal daags 200 mg of standaard triazolprofylaxe (fluconazol 400 mg of itraconazol 200 mg orale suspensie). De primaire uitkomstparameter was het optreden van bewezen of waarschijnlijke invasieve mycosen, stoppen van de medicatie ten gevolge van bijwerkingen of overlijden ten gevolge van de onderliggende ziekte op dag 7 na de laatste dosis. De medicatie werd toegediend tijdens achtereenvolgende episoden van neutropenie tot maximaal 84 dagen na randomisatie.¹¹ In de posaconazolgroep (304 patiënten) ontwikkelde 2 procent van de patiënten een invasieve mycose tegenover 8 procent in de controlegroep (298 patiënten; $p<0,001$). Significant minder patiënten in de posaconazolgroep ontwikkelden invasieve aspergillose vergeleken met de controlegroep (2 versus 20 procent; $p<0,001$). De letaliteit door invasieve mycosen (2 versus 5 procent; $p=0,01$) en de totale letaliteit (16 procent versus 22 procent; $p=0,048$) waren beide significant lager in de groep die profylaxe ontvingen met posaconazol.¹¹ Ook in dit onderzoek was posaconazol effectiever ten opzichte van andere azolen, in het voorkomen van invasieve mycosen in deze categorie van hoogrisicopatiënten tijdens episoden van neutropenie. De praktische consequentie van deze twee onderzoeken werd in een redactioneel commentaar aan de orde gesteld.⁵⁰ Hoewel de effectiviteit van de profylaxe vaststaat, zijn er andere factoren die meewegen in de beslissing om profylaxe toe te passen voor verschillende patiëntencategorieën. Hierbij spelen kosteneffectiviteitsoverwegingen een rol, maar ook de beschikbaarheid van diagnostische procedures zoals galactomannandetectie en van hoge-resolutie CT-scans. Doorslaggevend in de keuze is de effectiviteit van de profylaxe, dat wil zeggen: is het aantal patiënten dat dient te worden behandeld om één infectie te voorkomen relatief laag (lager dan 20)? Deze afweging dient

te worden gemaakt in elk centrum dat hoogrisicopatiënten behandelt, waarbij de prevalentie van invasieve mycosen, in het bijzonder invasieve aspergillose, hoger dient te zijn dan 5 procent.⁵⁰ In instellingen waar profylaxe wordt toegepast, is een sterke verandering van de epidemiologie waargenomen, met zoals verwacht een sterke reductie van de incidentie van invasieve mycosen. Uit een voorlopige publicatie bleek dat de incidentie van invasieve mycosen daalde van 17,5 procent voorafgaande aan de profylaxe naar 2,6 procent gedurende profylaxe ($p=0,04$).⁵¹

Behandeling van invasieve mycosen

Posaconazol was effectief voor de behandeling van orofaryngeale candidiasis.⁵² De effectiviteit van posaconazol bij patiënten met refractaire schimmelinfecties is eveneens onderzocht. Met refractaire infectie wordt meestal bedoeld op patiënten die tekenen hebben van progressie van de schimmelinfectie tijdens behandeling of die na een gedefinieerde termijn, bijvoorbeeld een week, geen tekenen van klinische verbetering laten zien. Een groep van 107 patiënten met refractaire invasieve aspergillose werd behandeld met een totale dagdosis van 800 mg posaconazol.⁵³ Een historische controlegroep werd gebruikt (86 patiënten). Voor de selectie van deze patiënten werden dezelfde criteria gebruikt als voor de experimentele groep, en de controles werden zoveel mogelijk in de tijd gematcht. De effectiviteit werd beoordeeld door een geblindeerde commissie, die dus niet wist met welk middel de patiënt was behandeld. De effectiviteit van posaconazol was 42 procent vergeleken met 26 procent in de controlegroep ($p=0,006$). In de controlegroep werden patiënten behandeld met amfotericine B (20 procent, inclusief lipideformuleringen), itraconazol (29 procent), een combinatie van amfotericine B en itraconazol (22 procent) of andere behandelingen (31 procent). In deze laatste categorie werden middelen gebruikt die tijdens het onderzoek experimenteel waren, zoals voriconazol en caspofungine. De effectiviteit van posaconazol bij deze patiëntenpopulatie is vergelijkbaar met andere middelen, zoals caspofungine, voriconazol en liposomaal amfotericine B.⁵⁴⁻⁵⁶

Bij patiënten met een invasieve *Fusarium*-infectie die refractair was voor primaire behandeling (meestal amfotericine B) of waarbij patiënten intolerant waren, bleek posaconazol effectief als tweedelijnsbehandeling.⁵⁷ Bij 10 van de 21 patiënten (48 procent) was de behandeling succesvol, waarbij de respons afhankelijk was van de onderliggende ziekte en conditie van de patiënt. Bij patiënten die herstelden van hun neutropenie was de respons 67 procent, terwijl van de patiënten met persisterende neutropenie slechts 20 procent herstelde.

Zygomyceten

In preklinisch onderzoek is aangetoond dat posaconazol activiteit heeft tegen zygomyceten. Er zijn twee observati-

onele onderzoeken waarin de effectiviteit van posaconazol als tweedelijnsbehandeling is onderzocht. Een serie van 91 patiënten is beschreven door van Burik et al.⁵⁸ De meerderheid van de patiënten (69 van de 91) had een bewezen diagnose, veroorzaakt door *Rhizopus* sp. (25 patiënten), *Mucor* sp. (17), *Cunninghamella* sp (8), *Rhizomucor* sp. (7) en *Absidia* sp. (2). De meeste patiënten hadden gefaald op primaire behandeling met een polyeen. Twaalf weken na het begin van de behandeling met posaconazol toonde 60 procent van de patiënten een complete of partiële respons. Het tweede observationele onderzoek rapporteerde de effectiviteit van posaconazol bij 24 patiënten met refractaire infectie of intolerantie, waarbij een complete of partiële respons werd vastgesteld bij 79 procent van de patiënten.⁵⁹ Beide onderzoeken geven aan dat er wellicht een indicatie is voor posaconazol bij de behandeling van invasieve zygomycose, maar prospectieve onderzoeken zijn geïnitieerd om deze bevindingen te bevestigen. Wanneer een intraveneuze formulering beschikbaar is, kan tevens de primaire behandeling nader worden onderzocht. Bij patiënten met een invasieve zygomycose die responderen op behandeling met een polyeen, kan posaconazol worden overwogen als orale follow-upbehandeling.

Casuïstiek en kleine observationele series zijn beschikbaar waarin patiënten met invasieve infecties door verschillende verwekkers worden beschreven. Posaconazol was effectief bij infecties door *Pseudoallescheria boydii*, gedissemineerde phaeohyphomycosis ten gevolge van *Exophiala spinifera*, refractaire coccidioïdomycose, cerebrale infecties door onder meer *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* sp., *P. boydii*, en *H. capsulatum*.⁶⁰⁻⁶⁴

Conclusie

Posaconazol is een veelbelovend triazool met een breed spectrum en een gunstig bijwerkingenprofiel. Er zijn veel preklinische gegevens beschikbaar, die aangeven dat het een potent middel is met activiteit tegen schimmels die moeilijk zijn te behandelen. Posaconazol heeft een rol in de behandeling van refractaire infecties, met name van moeilijk te behandelen schimmels zoals aspergillose, zygomycose en fusariose. In de profylaxe zal posaconazol een belangrijke plaats innemen bij hoogrisicopatiënten. Het nu nog ontbreken van een intraveneuze formulering beperkt de rol van dit middel in de primaire behandeling van invasieve mycosen.

Literatuur

- Upton A, Kirby KA, Carpenter P, Boeckh M, Marr KA. Invasive aspergillosis following hematopoietic cell transplantation: Outcomes and prognostic factors associated with mortality. *Clin Infect Dis* 2007;44:531-40.
- van 't Wout JW, Kuijper EJ, Verweij PE, Kullberg BJ. Nieuwe ontwikkelingen in de antifungale therapie: fluconazol, itraconazol, voriconazol, caspofungine. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004;148:1679-84.
- Kullberg BJ, Sobel JD, Ruhnke M, et al. Voriconazole versus a regimen of amphotericin B followed by fluconazole for candidaemia in non-neutropenic patients: a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2005;366:1435-42.
- Reboli AC, Rotstein C, Pappas PG, et al. Anidulafungin versus fluconazole for invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2007;356:2472-82.
- Kuse ER, Chetchotisakd P, da Cunha CA, et al. Micafungin versus liposomal amphotericin B for candidaemia and invasive candidosis: a phase III randomised double-blind trial. *Lancet* 2007;369:1519-27.
- Oude Lashof AM, Kullberg BJ. Amfoterine B: het einde van een tijdperk. *Ned Tijdschr Geneesk* 2004;148:1665-8.
- Bicanic T, Meintjes G, Wood R, et al. Fungal burden, early fungicidal activity, and outcome in cryptococcal meningitis in antiretroviral-naïve or antiretroviral-experienced patients treated with amphotericin B or fluconazole. *Clin Infect Dis* 2007;45:76-80.
- Cornely OA, Maertens J, Bresnik M, et al. Liposomal amphotericin B as initial therapy for invasive mold infection: a randomized trial comparing a high-loading dose regimen with standard dosing (AmBiLoad trial). *Clin Infect Dis* 2007;44:1289-97.
- EMA. Noxafil; Summary of Product Characteristics, 30-10-2006
- Krishna G, Sansone-Parsons A, Martinho M, Kantesaria B, Pedicone L. Posaconazole plasma concentrations in juvenile patients with invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:812-8.
- Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007;356:348-59.
- Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, et al. Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2007;356:335-47.
- Courtney R, Pai S, Laughlin M, Lim J, Batra V. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of oral posaconazole administered in single and multiple doses in healthy adults. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2788-95.
- Courtney R, Wexler D, Radwanski E, Lim J, Laughlin M. Effect of food on the relative bioavailability of two oral formulations of posaconazole in healthy adults. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57:218-22.
- Ghosal A, Hapangama N, Yuan Y, et al. Identification of human UDP-glucuronosyltransferase enzyme(s) responsible for the glucuronidation of posaconazole (Noxafil). *Drug Metab Dispos* 2004;32:267-71.
- Krieter P, Flannery B, Musick T, Gohdes M, Martinho M, Courtney R. Disposition of posaconazole following single-dose oral administration in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3543-51.
- Sansone-Parsons A, Krishna G, Simon J, et al. Effects of age, gender, and race/ethnicity on the pharmacokinetics of posaconazole in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:495-502.
- Courtney R, Sansone A, Smith W, et al. Posaconazole pharmacokinetics, safety, and tolerability in subjects with varying degrees of chronic renal disease. *J Clin Pharmacol* 2005;45:185-92.
- Gubbins PO, Krishna G, Sansone-Parsons A, et al. Pharmacokinetics and safety of oral posaconazole in neutropenic stem cell transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1993-9.
- Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:658-66.
- Raad II, Graybill JR, Bustamante AB, et al. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2006;42:1726-34.
- Courtney R, Radwanski E, Lim J, Laughlin M. Pharmacokinetics of posaconazole coadministered with antacid in fasting or nonfasting healthy men. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:804-8.
- Mantadakis E, Amoiridis G, Kondi A, Kalmanti M. Possible increase of the neurotoxicity of vincristine by the concurrent use of posaconazole in a young adult with leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29:130.
- Sansone-Parsons A, Krishna G, Martinho M, et al. Effect of oral posaconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine and tacrolimus. *Pharmacotherapy* 2007 Jun;27(6):825-34.

25. Saad AH, DePestel DD, Carver PL. Factors influencing the magnitude and clinical significance of drug interactions between azole antifungals and select immunosuppressants. *Pharmacotherapy* 2006;26:1730-44.
26. Sansone-Parsons A, Krishna G, Martinho M, Kantesaria B, Gelone S, Mant TG. Effect of oral posaconazole on the pharmacokinetics of cyclosporine and tacrolimus. *Pharmacotherapy* 2007;27:825-34.
27. Wexler D, Courtney R, Richards W, Banfield C, Lim J, Laughlin M. Effect of posaconazole on cytochrome P450 enzymes: a randomized, open-label, two-way crossover study. *Eur J Pharm Sci* 2004;21:645-53.
28. Krishna G, Sansone-Parsons A, Kantesaria B. Drug interaction assessment following concomitant administration of posaconazole and phenytoin in healthy men. *Curr Med Res Opin* 2007; May 11 [Epub].
29. Krishna G, Parsons A, Kantesaria B, Mant T. Evaluation of the pharmacokinetics of posaconazole and rifabutin following co-administration to healthy men. *Curr Med Res Opin* 2007;23:545-52.
30. Walsh TJ, Petraitis V, Petraitiene R, et al. Experimental pulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus*: pathogenesis and treatment of an emerging fungal pathogen resistant to amphotericin B. *J Infect Dis* 2003;188:305-19.
31. Verweij PE, van den Bergh MF, Rath PM, de Pauw BE, Voss A, Meis JF. Invasive aspergillosis caused by *Aspergillus ustus*: case report and review. *J Clin Microbiol* 1999;37:1606-9.
32. Panackal AA, Imhof A, Hanley EW, Marr KA. *Aspergillus ustus* infections among transplant recipients. *Emerg Infect Dis* 2006;12:403-8.
33. Sabatelli F, Patel R, Mann PA, et al. In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2009-15.
34. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:917-21.
35. Gilgado F, Serena C, Cano J, Gene J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4211-3.
36. Sun QN, Fothergill AW, McCarthy DI, Rinaldi MG, Graybill JR. In vitro activities of posaconazole, itraconazole, voriconazole, amphotericin B, and fluconazole against 37 clinical isolates of zygomycetes. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1581-82.
37. Almyroudis NG, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Kusne S. In vitro susceptibilities of 217 clinical isolates of zygomycetes to conventional and new antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:2587-90.
38. Chau AS, Chen G, McNicholas PM, Mann PA. Molecular basis for enhanced activity of posaconazole against *Absidia corymbifera* and *Rhizopus oryzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3917-9.
39. Espinel-Ingroff A. Comparison of In vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. *J Clin Microbiol* 1998;36:2950-6.
40. Barchiesi F, Arzeni D, Camiletti V, et al. In vitro activity of posaconazole against clinical isolates of dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2001;39:4208-9.
41. Li X, Brown N, Chau AS, et al. Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:74-80.
42. Mosquera J, Denning DW. Azole cross-resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:556-7.
43. Verweij PE, Mellado E, Melchers WJG. Multiple-triazole-resistant aspergillosis. *N Engl J Med* 2007;356:1481-3.
44. Groll AH, Walsh TJ. Antifungal efficacy and pharmacodynamics of posaconazole in experimental models of invasive fungal infections. *Mycoses* 2006;49(Suppl 1):7-16.
45. Lozano-Chiu M, Arikan S, Paetznick VL, Anaissie EJ, Loebenberg D, Rex JH. Treatment of murine fusariosis with SCH 56592. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:589-91.
46. Oakley KL, Morrissey G, Denning DW. Efficacy of SCH-56592 in a temporarily neutropenic murine model of invasive aspergillosis with an itraconazole-susceptible and an itraconazole-resistant isolate of *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1504-7.
47. Dannaoui E, Meis JF, Loebenberg D, Verweij PE. Activity of posaconazole in treatment of experimental disseminated zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3647-50.
48. Sun QN, Najvar LK, Bocanegra R, Loebenberg D, Graybill JR. In vivo activity of posaconazole against *Mucor* spp. in an immunosuppressed-mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:2310-12.
49. Barchiesi F, Spreghini E, Santinelli A, Fothergill AW, Pisa E, Giannini D, et al. Posaconazole prophylaxis in experimental systemic zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:73-7.
50. De Pauw BE, Donnelly JP. Prophylaxis and aspergillosis - Has the principle been proven? *N Engl J Med* 2007;356:409-11.
51. Cornely OA, Sims R, Stollorz A, Beisel C, Karthaus M, Vehreschild J. Impact of posaconazole prophylaxis on the epidemiology of invasive aspergillosis. 47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago 2007, abstract M-1174.
52. Vazquez JA, Skiest DJ, Nieto L, et al. A multicenter randomized trial evaluating posaconazole versus fluconazole for the treatment of oropharyngeal candidiasis in subjects with HIV/AIDS. *Clin Infect Dis* 2006;42:1179-86.
53. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, et al. Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 2007;44:2-12.
54. Maertens J, Raad I, Petrikos G, et al. Efficacy and safety of caspofungin for treatment of invasive aspergillosis in patients refractory to or intolerant of conventional antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 2004;39:1563-71.
55. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin Infect Dis* 2003;36:1122-31.
56. Ng TT, Denning DW. Liposomal amphotericin B (AmBisome) therapy in invasive fungal infections. Evaluation of United Kingdom compassionate use data. *Arch Intern Med*. 1995;155:1093-8.
57. Raad II, Hachem RY, Herbrecht R, et al. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin Infect Dis* 2006;42:1398-403.
58. van Burik JA, Hare RS, Solomon HF, Corrado ML, Kontoyiannis DP. Posaconazole is effective as salvage therapy in zygomycosis: a retrospective summary of 91 cases. *Clin Infect Dis* 2006;42:e61-5.
59. Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA, et al. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:126-33.
60. Mellinghoff IK, Winston DJ, Mukwaya G, Schiller GJ. Treatment of *Scedosporium apiospermum* brain abscesses with posaconazole. *Clin Infect Dis* 2002;34:1648-50.
61. Negroni R, Helou SH, Petri N, Robles AM, Arechavala A, Bianchi MH. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeohyphomycosis due to *Exophiala spinifera*. *Clin Infect Dis* 2004;38:e15-20.
62. Anstead GM, Corcoran G, Lewis J, Berg D, Graybill JR. Refractory coccidioidomycosis treated with posaconazole. *Clin Infect Dis* 2005;40:1770-6.
63. Pitisuttithum P, Negroni R, Graybill JR, et al. Activity of posaconazole in the treatment of central nervous system fungal infections. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:745-55.
64. Restrepo A, Tobon A, Clark B, et al. Salvage treatment of histoplasmosis with posaconazole. *J Infect* 2007;54:319-27.

Op zoek naar nieuwe diagnostische mogelijkheden voor patiënten met de veteranenziekte

B.M.W. Diederén

Samenvatting

Legionellose is een acute infectie van de luchtwegen, veroorzaakt door een bacterie die zich ophoudt in waterig milieu. De diagnose van legionellose kan erg lastig te stellen zijn. Op 12 oktober jl. promoveerde dr. B.M.W. Diederén aan de Vrije Universiteit van Amsterdam op het proefschrift getiteld *New approaches to the laboratory diagnosis of Legionnaires' Disease*. Hieronder zijn de belangrijkste bevindingen van het onderzoek weergegeven.

Trefwoorden: veteranenziekte, diagnose, PCR, *Legionella pneumophila*

Inleiding

Legionellapneumonie of veteranenziekte is een longontsteking die wordt veroorzaakt door bacteriën uit het genus *Legionella*, gramnegatieve, aerobe en facultatief intracellulaire bacteriën. Legionellabacteriën komen onder meer voor in door mensen ontworpen watersystemen en installaties. Bekende bronnen zijn koeltorens, airconditioners, whirlpools, sauna's en douches. Tot nu toe zijn 54 *Legionella*-species beschreven, waarvan ongeveer de helft pathogeen is voor de mens. Meer dan 90 procent van de vastgestelde legionellapneumonien wordt echter veroorzaakt door *L. pneumophila* (LP). Een LP kan een zeer ernstig beloop hebben: snelle, betrouwbare diagnostiek en het snel starten van adequate therapie is daarom essentieel. Alle bestaande diagnostiek heeft echter voor- en nadelen. Met behulp van serologie kan alleen achteraf de diagnose worden gesteld gezien de trage seroconversie (vaak meer dan drie weken). De urineantigeentest is snel maar heeft een relatief beperkte gevoeligheid en toont alleen *L. pneumophila*-serogroep-1-infecties betrouwbaar aan. Het aantonen van *L. pneumophila* in het sputum met kweek is van groot belang, met name ook voor bronopsporing, maar heeft een beperkte gevoeligheid en duurt relatief lang. Een bijkomend probleem is dat minder dan 50 procent van de patiënten spontaan geschikt sputum ophoest die nodig is voor zowel de kweek als PCR. Op PCR gebaseerde testen zijn snel en kunnen in principe alle *Legionella*-species aantonen. Deze techniek is echter niet in ieder laboratorium voorhanden en het is tot op heden onduidelijk wat nu de precieze waarde (sensitiviteit en specificiteit) of

meerwaarde (worden meer patiënten gediagnosticeerd?) van deze techniek is voor de diagnose veteranenziekte.

Urineantigeentesten

De evaluatie van een aantal nieuwe, commerciële immunochromatografische urineantigeentesten wordt beschreven. De resultaten laten zien dat het blind accepteren van getallen die in de bijsluiters staan, tot verkeerde conclusies en keuzes kan leiden bij diegene die de test wil gaan gebruiken. Vals-positieve resultaten werden bij alle (Rapid U test; Diamondial, Sees, Frankrijk en SD Bioline Legionella urinary antigen test; Standard Diagnostics, Inc., Kyonggi-do, Korea) nieuwe urineantigeentests gezien,¹ met lage positief voorspellende waarden als gevolg. Gezien het belang van een juiste diagnose van deze (aangifteplichtige) ziekte lijkt het onverstandig op deze tests te vertrouwen. De Binax NOW-test presteerde optimaal en kan dus wel worden gebruikt voor een betrouwbare sneldiagnostiek. De sensitiviteit en specificiteit van een andere nieuwe test, de SAS Legionella Test (SA Scientific, San Antonio, Texas, VS), bedroegen respectievelijk 83 en 99 procent, en de gevoeligheid nam significant toe tot 97 procent na het verlengen van de incubatietijd. Omdat het verlengen van de incubatietijd geen invloed heeft op de specificiteit van de SAS Legionella Test, raden wij aan een langere incubatietijd te gebruiken dan de 10 minuten die nu door de fabrikant wordt aanbevolen.

Polymerasekettingreactie (PCR)

PCR heeft als voordeel dat in principe alle serogroepen van *L. pneumophila* en andere *Legionella*-species relatief snel kunnen worden aangetoond. Zoals ook geldt voor kweek is het echter een nadeel dat het materiaal dat voor de PCR

B.M.W. Diederén, arts-microbioloog. Promotie: 12 oktober 2007, Vrije Universiteit Amsterdam.
Promotoren: prof. dr. J.A.J.W. Kluytmans, VU Amsterdam en Amphia Ziekenhuis Breda, prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, VU Amsterdam; copromotor: dr. M.F. Peeters, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Tilburg.
Correspondentieadres: Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Haarlem, Boerhaavelaan 26, 2035 RC Haarlem, e-mail: bramdiederén@gmail.com.

noodzakelijk is, niet altijd wordt verkregen. Het gebruik van PCR op makkelijker verkrijgbaar patiëntenmateriaal, zoals urine of bloed, zou een groot voordeel kunnen zijn bij legionellosepatiënten. Twee patiënten met legionellose worden beschreven, bij wie de diagnose mede werd gesteld door de aanwezigheid van *L. pneumophila*-DNA in serum met behulp van *real-time* PCR.² De patiënten werden kwantitatief gevolgd in de tijd. De gevonden resultaten correleerden met de klinische bevindingen en de gevonden CRP-waarden. We wilden graag weten wat de gevoeligheid van de detectie van *Legionella*-specifiek DNA in serum is.³ Voor het aantonen van *Legionella* werden drie verschillende assays gebruikt met targets op genen coderend voor het 5S en 16S rRNA-gen, en het *mip*-gen. In totaal werden 68 patiënten met bewezen legionellose geïnccludeerd: bij 54 procent van de patiënten was de test positief in 5S rRNA PCR, bij 53 procent in *mip*-gen PCR, en bij 31 procent in 16S rRNA PCR in het eerst beschikbare serum. Er werd een significant verband aangetoond tussen de hoogte van de Ct-waarde (gemeten in 5S rRNA PCR, n=49) en het CRP ($r = -0,63$, Pearson *correlation coefficient*, $p < 0,0001$). Met andere woorden, hoe hoger het CRP, hoe lager de Ct-waarde en hoe hoger dus de hoeveelheid DNA gemeten in het bloed.

De mogelijke relatie tussen de gevoeligheid van PCR en de ernst van ziekte werd verder onderzocht met sera afkomstig van de Bovenkarspelepidemie in 1999. Patiënten werden in twee groepen verdeeld: categorie 1 (milde en matig ernstige pneumonie) en categorie 2 (ernstige pneumonie). De sensitiviteit bedroeg 49 procent (19/39; 95 procent BI 34-64 procent) en 37 procent (7/19; 95 procent BI 19-59 procent) voor patiënten uit respectievelijk categorie 1 en 2, in het eerst beschikbare serummonster. Onze bevindingen laten dus zien dat detectie van *Legionella*-specifiek DNA een waardevolle aanvulling zou kunnen zijn voor de diagnostiek van legionellose, maar dit zou in een prospectieve onderzoeksopzet moeten worden bevestigd.

Longontsteking met andere *Legionella*-species

Hoewel in Nederland *L. pneumophila*-serogroep 1 in meer dan 95 procent van de gevallen de verwekker van legionellose is, toont een casus van een patiënt met een *L. longbeachae*-pneumonie aan dat deze diagnose niet mag worden verworpen op basis van een negatieve urine-antigeentest en kweek. Bij patiënten met een ernstige pneumonie met onbekende verwekker, alsmede bij patiënten met klinische aanwijzingen (zoals verwardheid, diarree, hyponatriëmie; of als de klinische toestand niet verbetert na enkele dagen monotherapie met een bètalactamantibioticum) of epidemiologische aanwijzingen voor een *Legionella*-pneumonie (zoals recent verblijf in het buitenland, recente longontsteking van familie, collega of reisgenoot, het gebruik van een whirlpool of sauna) en een negatieve uitkomst van de urineantigeentest,

moet de diagnostiek worden uitgebreid met kweek en *Legionella*-PCR op respiratoir materiaal.

Legionella-DNA in water

Er is een inventarisatie gemaakt van het voorkomen van *Legionella* spp. in Nederlandse drinkwater. Watermonsters werden afgenomen op diverse locaties in Nederland en onderzocht op de aanwezigheid van *Legionella* spp. met behulp van kweek, PCR en sequentieanalyse. In totaal werden 357 drinkwatermonsters onderzocht. De kweek was slechts achtmaal positief (2 procent); tweemaal voor *L. pneumophila* en zesmaal voor *Legionella non-pneumophila* spp. Het water was 311 maal positief (87 procent) met behulp van PCR, met name species anders dan *L. pneumophila*. De 16S rRNA PCR-fragmenten van vrijwel alle *Legionella non-pneumophila* PCR-positieve monsters vertoonden 94-100 procent homologie met het genus *Legionella*. Blijkbaar is of raakt iedere leidingwaterinstallatie van enige complexiteit onvermijdelijk gekoloniseerd met *Legionella* spp.

Mogelijke rol van *Legionella* spp. bij patiënten met luchtweginfecties

Op basis van verschillende serologische onderzoeken wordt gesuggereerd dat atypische luchtwegpathogenen (*Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella* spp. en *Mycoplasma pneumoniae*) zijn geassocieerd met exacerbaties van chronisch obstructief longlijden (AECOPD). Wij onderzochten bij COPD-patiënten de aanwezigheid van deze atypische luchtwegpathogenen; de bevindingen tonen geen associatie tussen atypische verwekkers en AECOPD.⁴

Voor *Legionella* spp. is niet goed bekend of, en zo ja, hoe vaak ze voorkomen bij patiënten met acuut respiratoire infecties (ARI; met name neusverkoudheid en keelpijn). In totaal werden 430 keel-neusswabs onderzocht, afkomstig van 230 cases en 200 controles. *Legionella*-DNA werd in geen enkel patiëntenmonster aangetoond.⁵ Onze bevindingen laten zien dat *Legionella* spp. zeer waarschijnlijk geen rol van betekenis spelen in de etiologie van ARI in de eerste lijn. Tevens hebben we laten zien dat asymptomatisch keeldragerschap zeer waarschijnlijk niet voorkomt. Zoals ook geldt voor de associatie gevonden bij patiënten met COPD, berust naar ons idee het gevonden verschil met eerdere onderzoeken op de verschillen in gebruikte diagnostiek om infectie met *Legionella* spp. aan te tonen. Bij een theoretische *Legionella* spp.-prevalentie van 2 procent bij patiënten met ARI (of COPD), en een gevoeligheid en specificiteit van een serologische test van 99 procent, zijn nog ongeveer 3 op de 10 positieve tests fout-positief. Het gevaar voor fout-positieve resultaten is natuurlijk nog vele malen hoger als je een enkel serum 41 keer test middels indirecte immunofluorescentie met glaasjes gecoat met de verschillende serogroepen van *L. pneumophila* en verschillende *Legionella* spp.⁶

Onder 242 gehospitaliseerde CAP-patiënten werd de aanwezigheid van respiratoire virussen en *Legionella* spp. in keelwabs met behulp van real-time PCR onderzocht. Virale respiratoire pathogenen werden met behulp van serologie bij zeven patiënten (2 procent) aangetoond, en bij 50 patiënten (21 procent) met PCR ($p < 0,0001$). In totaal werden met conventionele diagnostiek bij 137 patiënten (57 procent) één of meer verwekkers gevonden, en dit aantal nam toe naar 158 (65 procent) na het toepassen van de verschillende PCR-assays ($p = 0,06$). De *L. pneumophila*-PCR was positief bij 3 van de 11 bevestigde legionellosepatiënten (29 procent). Dit onderzoek laat zien dat het aantal verwekkers dat men vindt bij patiënten met een CAP, toeneemt van ongeveer de helft naar ongeveer twee derde van de patiënten. Hoewel de detectie van *Legionella* in keelwabs in principe wel mogelijk is, laten onze resultaten zien dat dit materiaal niet betrouwbaar is voor de detectie van *Legionella* met behulp van PCR.⁷

Waarde van PCR in de routinediagnostiek

Ondanks dat vele publicaties voorhanden zijn die de (veelal *in vitro*) evaluatie van nieuwe PCR-assays voor de detectie van *Legionella* spp. beschrijven, weten we echter nog niet precies wat nu de waarde (of meerwaarde) is van deze techniek voor een routinelaboratorium. Het laatste hoofdstuk beschrijft een vergelijking tussen de resultaten verkregen met klassieke technieken (kweek, urineantigeentest) en PCR.

De sensitiviteit en specificiteit werden geschat op respectievelijk 86 procent en 95 procent voor de 16S rRNA PCR, en 92 procent en 98 procent voor de *mip*-gen PCR. Vijf potentieel fout-positieve resultaten werden gevonden in 16S rRNA PCR, en twee potentieel fout-positieve resultaten in de *mip*-gen PCR. Omdat de gevoeligheid van de conventionele diagnostiek nooit 100 procent is, vermoeden we dat een deel van de fout-positieve resultaten in werkelijkheid waarpositief zijn, vanwege de (wellicht) hogere gevoeligheid van PCR. Daarom werd een discrepantieanalyse verricht waarbij discrepante resultaten (PCR positief, conventioneel negatief) werden bevestigd met PCR (herhaling, andere assays) of sequentieanalyse (waar-positief) of juist niet (fout-positief). Van de patiënten met discrepante resultaten werd bij twee patiënten een infectie met *L. pneumophila*, en bij één patiënt een *Legionella non-pneumophila* spp.-infectie bevestigd. De overige positieve resultaten werden beschouwd als fout-positief. Met deze gecorrigeerde resultaten, en uitgaande van een prevalentie van *Legionella* spp. bij patiënten met CAP van 5 procent, werden een sensitiviteit, specificiteit, positief en negatief voorspellende waarde van respectievelijk 87, 97, 60 en 99 procent voor 16S rRNA PCR, en 92, 100, 100 en 99,6 procent voor de *mip*-gen PCR gevonden.

Het tweede doel van het onderzoek was na te gaan of *Legionella*-specifieke PCR een meerwaarde heeft voor de diagnose legionellose ten opzichte van de urineantigeentest. Met andere woorden, leidt de introductie van een nieuwe extra test tot een toename van het aantal diagnoses? Met

de urineantigeentest werden 35 patiënten gediagnosticeerd, en 34 met 16S rRNA PCR (na discrepantieanalyse). Hoewel de *mip*-gen PCR meer legionellosepatiënten detecteerde (36 versus 35 patiënten), was dit verschil natuurlijk niet statistisch significant.

Met behulp van een combinatie van een op het *mip*-gen gebaseerde PCR en de urineantigeentest werd echter bij 98% (40/41) van de bewezen legionellosepatiënten een correcte diagnose gesteld. PCR zou dus moeten worden gebruikt bij patiënten met een ernstige longontsteking en negatieve urineantigeentest. Idealiter zou dit in een prospectief vergelijkend onderzoek moeten worden bevestigd.

Conclusie

Samengevat kan men stellen dat *Legionella* spp.-DNA ubiquitair voorkomt in Nederlandse drinkwaterleidingen en *Legionella* spp. geen rol spelen als verwekker bij patiënten met bovenste luchtweginfecties (zoals neusverkoudheid en keelpijn) en bij patiënten met een exacerbatie van COPD. Een andere conclusie is dat PCR zou moeten worden gebruikt bij patiënten met een ernstige longontsteking en een negatieve urineantigeentest. Dit kan zorgen voor een relevante toename van het aantal diagnoses van patiënten met legionellose. De ideale test voor het aantonen van *Legionella* spp. bestaat dan ook nog steeds niet. Hoewel de laboratoriumdiagnostiek sinds de eerste beschrijving van legionellose in 1976 sterk is verbeterd, is nog steeds geen enkele op zichzelf staande test in staat ziekte veroorzaakt door alle legionellasoorten aan te tonen met een optimale mate van snelheid, sensitiviteit en specificiteit.

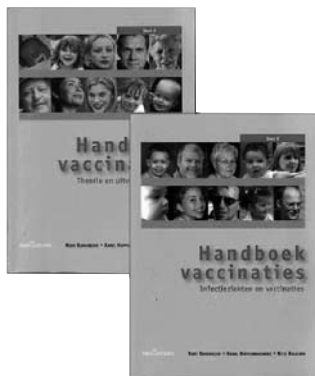
Deze samenvatting wordt eveneens gepubliceerd in het Tijdschrift voor Infectieziekten en in het Infectieziektenbulletin.

Literatuur

1. Diederens BM, Peeters MF. Evaluation of two new Immunochromatographic Assays (Rapid U Legionella Antigen Test and SD Bioline Legionella Antigen Test) for the Detection of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Antigen in Urine. *J Clin Microbiol* 2006;44:2991-3.
2. Diederens BM, de Jong CMA, Kluytmans JA, van der Zee A, Peeters MF. Detection and Quantification of *Legionella pneumophila* DNA in Serum: Case Reports and Review of Literature. *J Med Microbiol* 2006;55:639-42.
3. Diederens BM, de Jong CMA, Marmouk F, Kluytmans JA, Peeters MF, van der Zee A. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. *J Med Microbiol* 2007;56:94-101.
4. Diederens BM, van der Valk PD, Kluytmans JA, Peeters MF, Hendrix R. The role of atypical respiratory pathogens in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2007;30(2):240-4.
5. Diederens BM, de Jong CM, Aarts I, Peeters MF, Wilbrink B, van Gageldonk RA, et al. No evidence of *Legionella* species infection in general practice patients presenting with acute respiratory infection in The Netherlands. *Clin Microbiol Inf* 2005;11:410-2.
6. Lieberman D, Korsonsky I, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Boldur I. Legionella species infection in adult febrile respiratory tract infections in the community. *Scand J Infect Dis* 2002;34:1-4.
7. Diederens BM, Peeters MF, Metzgar D. Are oropharyngeal swabs suitable as samples for legionella-specific PCR testing? *J Clin Microbiol* 2007;45:3482-3.

Overdaad schaadt?

M. van Rijn



Titel	Handboek vaccinaties. Theorie en uitvoeringspraktijk, deel A
Auteurs	Burgmeijer R., Hoppenbrouwers K., Bolscher N.
Uitgever	Van Gorcum
Jaar	2007
Aantal pagina's	480
Druk	1 ^e
ISBN	9789023243380
Prijs	€ 45,50

Titel	Handboek vaccinaties. Infectieziekten en vaccinaties, deel B
Auteurs	Burgmeijer R., Hoppenbrouwers K., Bolscher N.
Uitgever	Van Gorcum
Jaar	2007
Aantal pagina's	496
Druk	1 ^e
ISBN	9789023243397
Prijs	€ 49,50

De vaccinologie (wetenschap die zich bezighoudt met vaccins en vaccineren) is 'hot' en ontwikkelt zich in hoog tempo. Het *Handboek Vaccinaties* richt zich op professionals die direct of zijdelings zijn betrokken bij vaccinaties in Nederland en Vlaanderen en is het vervolg op vier eerdere drukken van *Vaccinaties bij Kinderen*. Het handboek poogt zowel praktijkgericht als theoretisch te zijn, doorgaans een *contradictio in terminis*. Jammer genoeg vormt het *Handboek Vaccinaties* hierop geen uitzondering.

Deel A begint met een theoretisch deel ('Algemene onderwerpen') waarin, naast het onvermijdelijke historisch en toekomstig perspectief, zaken als wet- en regelgeving, immuniteit, vaccinontwikkeling, (contra-)indicaties en bijwerkingen aan de orde komen. In het tweede deel van deel A wordt uitgebreid ingegaan op de uitvoeringspraktijk. Deel A sluit af met een bespreking van de vaccinatieprogramma's van Nederland en Vlaanderen. Het is vooral in dit boek dat de achtergrond van de auteurs tot zijn recht komt. De teksten zijn helder geschreven en geven ruim voldoende informatie om een adequaat beeld van vaccinatie in Nederland te krijgen, bijvoorbeeld voor arts-microbiologen die deelnemen aan *travel clinics* is dit werk aan te raden.

Na de theoretische beschouwingen en praktische informatie uit deel A, worden in deel B in alfabetische volgorde alle infectieziekten besproken waartegen kan worden gevaccineerd en worden deze vaccinaties uitgebreid besproken. Het is in dit deel dat de lezer wordt 'overvoerd' met informatie. Van bof tot varicella worden verwekker, transmissieroute, besmettelijkheid, incubatietijd, kliniek, diagnostiek en behandeling, epidemiologie, vaccinatie en preventie besproken. Iedere vaccineerbare ziekte wordt voorafgegaan door een uitgebreide inleiding, verlevendigd met afbeeldingen van postzegels met daarop het portret van belangrijke wetenschappers bij het betreffende ziektebeeld. Voor een filatelist wellicht interessant, maar voor ondergetekende op den duur irritant. Sowieso maakt deel B een rommeliger indruk dan deel A door het veelvuldig gebruik van afbeeldingen en grafieken met een wisselende opmaak en rasterkwaliteit. Waar de publieke gezondheidszorg als achtergrond van de auteurs de kracht van deel A is, vormt zij de beperking van deel B. Met name de bespreking van diagnostiek, kliniek en behandeling van de respectievelijke ziekten leiden te vaak tot 'kromme tenen'. Door zo veel informatie over infectieziekten verwatert bovendien het onderscheid tussen praktisch naslagwerk en leerboek. Er bestaan aanzienlijk betere leerboeken infectieziekten. Gelukkig is de informatie over de verschillende vaccins – in lijn met deel A – wél informatief en van duidelijk toegevoegde waarde.

Als arts-microbioloog heb ik een ambivalent gevoel na het lezen van dit omvangrijke werk (twee boeken met in totaal bijna 1000 pagina's): enerzijds staat veel van het geschrevene (beter) beschreven in de binnen ons vakgebied bekende standaardwerken; anderzijds is de geboden informatie over 'vaccinologie' in de meest brede betekenis óók voor de arts-microbioloog practicus van duidelijke waarde. Naast de veelheid aan informatie zou bij de volgende druk ook eens kritisch naar de lay-out moeten worden gekeken. Beide delen zijn zeer prettig geprijsd; een flink aantal pagina's doet inderdaad ook goedkoop aan qua vormgeving. De auteurs doen zich hiermee tekort; het moet veel werk zijn geweest al deze informatie op te schrijven. Daar past een verzorgde lay-out bij.

Ik geef deel A een 8 en deel B een 6.

Michiel van Rijn

Leergangen NSPOH in 2008

De NSPOH start in 2008 met de volgende leergangen:

Visie op de public health (nieuw)

U krijgt inzicht in de definities, paradigma's en internationale perspectieven op public health. Daarbij kijkt u kritisch naar de samenhang en organisatie van de public health. Vanuit een historisch perspectief ontwikkelt u een visie op de toekomstige samenhang en organisatie van de public health.

Doelgroep: de beleidsadviseur, projectleider en leidinggevende met relevante werkervaring op academisch niveau in de publieke gezondheidszorg;

Data: donderdag en vrijdag 10, 11, 17 en 24 januari 2008

Kosten: € 1260

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl.

Opleiding tot Arts Maatschappij en Gezondheid

De opleiding tot Arts Maatschappij & Gezondheid is competentiegericht en is een combinatie van onderwijs bij de NSPOH en praktijkopleiding. De opleiding kent twee fasen van registratie.

De eerste fase is het beroepsgerichte deel met:

- sociaal-geneeskundige basismodulen;
- profielprogramma's waaronder infectieziektebestrijding, tuberculosebestrijding, medische milieukunde, jeugdgezondheidszorg, forensische geneeskunde, sociaal-medische indicatiestelling, beleid & advies;
- verbredend en verdiepend keuzeonderwijs.

In de tweede fase staan beleid, management en wetenschappelijk onderzoek centraal.

Doelgroep: 1^e fase: artsen die werken in de public health zoals basisartsen met enkele jaren werkervaring (curatief en/of preventief) en zich willen specialiseren op het terrein van maatschappij en gezondheid;

2^e fase: diegenen die het gehele traject tot een registratie als arts maatschappij en gezondheid willen afronden;

Data: start 1^e fase op 15 januari 2008, start 2^e fase op 22 januari 2008

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl of vraag de brochure aan.

Projectmanagement (vernieuwd)

Vergroot uw vaardigheden om uw projecten planmatig aan te pakken en te coördineren. Zo kunt u uw werkzaamheden resultaatgericht en efficiënter organiseren.

Doelgroep: de professional of beleidsadviseur in de public health

Data: woensdag 16 en 23 januari, 13 februari 2008

Kosten: € 945

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl.

Introductie in de infectieziektebestrijding en tuberculosebestrijding

Module om uw kennis te verbreden. Maak kennis met de basisprincipes van infectieziektebestrijding, de belangrijkste nationale en regionale partners en belangrijke infectieziekten.

Doelgroep: artsen AGZ, jeugd-, huis- en bedrijfsartsen en andere artsen werkzaam in de infectieziektebestrijding;

Data: vrijdag 25 januari en 1 februari 2008

Kosten: € 620

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl.

Schrijfvaardigheid en argumentatie

Werk aan een eigen (beleids)notitie, publicatie of final paper en leer hoe u helder, onderbouwd en overtuigend kunt schrijven.

Doelgroep: de professional of beleidsadviseur in de public health

Data: dinsdag 29 januari, 5 februari en 4 maart 2008

Kosten: € 945

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl.

Trends in Public Health problemen en aanpak (nieuw)

Focus op belangrijke gezondheidsproblemen, determinanten en aanknopingspunten voor beleid. U verbindt de belangrijkste inzichten en initiatieven in andere public health disciplines met uw eigen werkcontext om te komen tot oplossingsrichtingen voor complexe, multi- en interdisciplinaire vraagstukken.

Doelgroep: de beleidsadviseur, projectleider en leidinggevende met relevante werkervaring op academisch niveau in de publieke gezondheidszorg;

Data: donderdag 31 januari, 7 en 14 februari 2008

Kosten: € 945

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl.

Timemanagement voor professionals in de Public & Occupational Health (nieuw)

Hoge betrokkenheid, verantwoordelijkheidsgevoel en een vaak commerciële omgeving, vragen een specifieke aanpak

en beïnvloeding van uw tijdgebruik. De workshop is hier specifiek voor opgebouwd.

Doelgroep: professionals in de public & occupational Health

Datum: donderdag 31 januari 2008

Kosten: € 360

Locatie: Nunspeet

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949,

info@nspoh.nl.

Inleiding in de epidemiologie

Maak kennis met de basisprincipes uit de epidemiologie én leer ze toepassen in uw eigen praktijk.

Doelgroep: de professional of beleidsadviseur in de public health

Data: Maandag en dinsdag 10, 11, 17 en 18 maart 2008

Kosten: € 1260

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl, tel. 020-5664949, info@nspoh.nl.

Evidence-based werken in de public health

Evidence-based werken is actueel in de public health. Verbeter de wetenschappelijke onderbouwing van uw activiteiten, de werkmethoden en beleidsmaatregelen.

Doelgroep: de beleidsadviseur, projectleider en leidinggevende met relevante werkervaring op academisch niveau in de publieke gezondheidszorg.

Data: donderdag 27 maart, 3 en 24 april, 15, 29 mei, 19 juni 2008

Kosten: € 3090

Locatie: NSPOH te Amsterdam

Informatie: www.nspoh.nl/mp, tel. 020-5664949, info@nspoh.nl.

Nascholing Medisch Parasitologische Diagnostiek

De onderstaande PAOG-Heyendaal-cursus is bestemd voor microbiologen en klinisch chemici (i.o.), analisten met enige ervaring in de parasitologische diagnostiek en onderzoekers die een parasitologisch onderwerp bewerken:

Datum: 4 tot en met 15 februari 2008

Plaats: Nijmegen

Titel: Nascholing Medisch Parasitologische Diagnostiek

Informatie: PAOG-Heyendaal, UMC St Radboud

Bianca Gremmen-Van Bergen, cursusassistent

Tel.: 024-3610862

E-mail: b.gremmen-vanbergen@paog.umcn.nl

www.paogheyendaal.nl

NVMM-bureau een feit

Op de Algemene Ledenvergadering in Brugge op 15 november jl. is met algemene stemmen een voorstel aangenomen tot oprichting van een NVMM-bureau ter ondersteuning van het bestuur en de werkgroepen en commissies.

Bij het bestuur bestond grote behoefte aan een wetenschappelijk geschoolde beleidsmedewerker met ervaring in de microbiologie. De NVMM is zowel qua ledenaantal sterk gegroeid (inmiddels 560 leden) als qua scope (veertien statutaire commissies en werkgroepen) en draait nog steeds op een organisatiestructuur uit de begintijd van de vereniging - dus vrijwel volledig op vrijwilligers, die de verenigingsorganen bemensen.

Voorzitter G. Ruijs gaf een presentatie waaruit duidelijk werd dat de meeste wetenschappelijke verenigingen een bureau hebben dat het bestuur inhoudelijk kan ondersteunen. Het NVMM-bestuur voorziet dan ook een groeiende rol en betekenis van een dergelijk bureau voor de NVMM, en denkt daarbij niet alleen aan ondersteuning van het bestuur, maar ook van de commissies en werkgroepen binnen de vereniging.



Besloten is mevrouw dr. M.A. (Margo) Kusters-van Someren als bureau-directeur aan te stellen op freelancebasis. Zij heeft sinds juni al enkele opdrachten voor het NVMM-bestuur uitgevoerd. Margo Kusters is bioloog en gepromoveerd op een moleculair-microbiologisch onderwerp. Zij heeft

een eigen bedrijf, een communicatiebureau met opdrachtgevers uit de biomedische sector, en gaat zich voor de NVMM onder andere bezighouden met de actiepunten die in de NVMM-beleidsnotitie zijn genoemd. Het NVMM-bureau is bereikbaar via tel. 030-2767522 of e-mail: bureau@nvmm.nl.

PERSONALIA

Nieuwe leden

- Dr. ir. B.H.B. van Benthem, RIVM, Afdeling EPI (postbak 75), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.
- Mw. J.W.A. Beuving, Antoon Lipkensstraat 2C21, 6221 AT Maastricht.
- Mw. dr. K. van Dijk, Vlieland 132, 3524 AC Utrecht.
- F. Hagen, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht.
- Mw. W.L.J. Hansen, Academisch Ziekenhuis Maastricht, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht.
- Dr. J.J. van Hellemond, Erasmus Medisch Centrum, Afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam.
- Mw. dr. G.J. van Hooydonk-Elving, Notselseweg 2, 4856 AH Strijbeek.
- Dr. A.S. de Jong, Colmarstraat 6, 6679 BE Oosterhout (gem. Nijmegen).
- J.C.M. Monen, RIVM CIB/EPI, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.
- A. Al Moujahid, Koperslagershof 21, 3123 PE Schiedam.
- Dr. A.G.C.L. Speksnijder, GGD Cluster Infectieziekten, Nieuwe Achtergracht 100 1018 WT Amsterdam.
- R. te Witt, Erasmus Medisch Centrum, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam.

Adreswijziging

- C.W. Ang MD PhD, Dept. of Medical Microbiology and Infection Control, VU medical center, Postbus 7057, 1007 MD Amsterdam (voorheen AMC).
- Mw. dr. N.M. van Maarseveen, UMC Utrecht, Eijkman-Winkler Instituut, G04.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht (voorheen Leids Universitair Medisch Centrum).
- Mw. M. Mooij, BIOMERIT Research Centre, Microbiology Department, University College Cork, National University of Ireland, Cork Ireland (voorheen VUMC Amsterdam)
- R. Vlug, Sales Manager Medical, Minigrip Nederland BV, Kamerlingh Onnesweg 6, 8218 MA Lelystad.
- Mw. dr. M. Wegdam-Blans, Streeklaboratorium voor Microbiologie, Burg. Edo Bergsmalaan 1, 7512 AD Enschede (voorheen Gelre Ziekenhuizen Apeldoorn).
- Dr. A.G.M. van der Zanden, Streeklaboratorium Enschede, Burg. Edo Bergsmalaan 1, 7512 AD Enschede (voorheen Gelre Ziekenhuis Apeldoorn).
- B.A. Zwart, Zaans Medisch Centrum, afdeling Medische Microbiologie, Koningin Julianaplein 58, 1502 DV Zaandam (voorheen Ohmstraat 20 Badhoevedorp).

PROMOTIES

28 juni 2007 - J.T. Bousema

Proefschrift: Interrupting malaria transmission: the effects of drugs and immunity on the transmissibility of *Plasmodium falciparum*.

Promotor: prof. dr. R.W. Sauerwein. Copromotor: dr. C.J. Drakely. UMC St Radboud, afdeling Medische microbiologie.

26 juli 2007 - E. Boelen

Proefschrift: An in vitro and in vivo study towards the effect of *Chlamydia pneumoniae* infection on brain cells.

Promotoren: prof. dr. C.A. Bruggeman, prof. dr. H.W.M. Steinbusch. Copromotoren: dr. F.R.M. Stassen, dr. A.J.A.M. van der Ven. Universiteit Maastricht, afdeling Medische microbiologie.

5 september 2007 - B.C.H. de Jong

Proefschrift: Studies on *Mycobacterium africanum* in the Gambia.

Promotoren: prof. dr. M.W. Borghoff. Copromotoren: prof. dr. N. Beyers en dr. S. Verver.

Universiteit van Amsterdam, faculteit der Geneeskunde, onderafdeling Infectieziekten, Tropische geneeskunde & AIDS.

6 september 2007 - N.T. Hong

Proefschrift: Tuberculosis control in Vietnam: does DOTS do it?

Promotoren: prof. dr. M.W. Borghoff. Copromotoren: prof. dr. N.V. Co en dr. F.G.J. Cobelens. Universiteit van Amsterdam, AMC, faculteit der Geneeskunde, onderafdeling Infectieziekten, Tropische Geneeskunde & AIDS.

6 september 2007 - M. Vree

Proefschrift: The impact of tuberculosis control in Vietnam.

Promotoren: prof. dr. M.W. Borghoff. Copromotor: prof. dr. N.V. Co. Universiteit van Amsterdam, AMC, faculteit der Geneeskunde, onderafdeling Infectieziekten, Tropische Geneeskunde & AIDS.

11 september 2007 - D. Koppers-Lalic

Proefschrift: Immune evasion by varicelloviruses: the identification of a new family of TAP-inhibiting proteins.

Promotor: prof. dr. E.J.H.J. Wiertz. Universiteit Leiden, afdeling Medische Microbiologie.

24 september 2007 - L. Grigoryan

Proefschrift: Self-medication with Antibiotics in Europe and its Determinants.

Promotoren: prof. dr. F.M. Haaijer-Ruskamp, prof. dr. J.E. Degener, Rijksuniversiteit Groningen, faculteit Medische Wetenschappen, vakgroepen Klinische Farmacologie en Medische Microbiologie.

4 oktober 2007 - R.P.H. Peters

Proefschrift: Developments in the diagnosis of bloodstream infections. Nieuwe klinische en diagnostische mogelijkheden in de diagnostiek van bloedbaaninfecties.

Promotoren: prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls, prof. dr. S.A. Danner. Copromotoren: dr. M.A. van Agtmael en prof. dr. P.H.M. Savelkoul. VU medisch centrum, afdeling Medische microbiologie, afdeling Interne geneeskunde.

5 oktober 2007 - S.H. Lowe

Proefschrift: Antiretroviral therapy: efficacy and toxicity in the ARES study and responses in the male genital tract.

Promotoren: prof. dr. J.M.A. Lange, prof. dr. J.C.C. Borleffs. Copromotor: dr. J.M. Prins. AMC, afdeling Medische microbiologie; Universitair Medisch Centrum Utrecht.

9 oktober 2007 - M.E. de Noo

Proefschrift: Clinical proteomics in oncology: a passionate dance between science and clinic.

Promotoren: prof. dr. R.A.E.M. Tollenaar, prof. dr. A.M. Deelder. LUMC, afdeling Parasitologie.

12 oktober 2007 - B.M.W. Diederer

Proefschrift: The laboratory diagnosis of legionnaires' disease.

Promotoren: prof. dr. J.A.J.W. Kluytmans, prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls. Copromotor: dr. M.F. Peeters. VU medisch centrum; Amphia Ziekenhuis, laboratorium Microbiologie en Infectiepreventie, Breda.

19 oktober 2007 - S.P.M. Lutgens

Proefschrift: Functional genomics in atherosclerosis: focus on cathepsin K.

Promotor: prof. dr. M.J.A.P. Daemen. Copromotoren: dr. K.B.J.M. Cleutjens, dr. S. Heeneman. Universiteit Maastricht, afdeling Medische Microbiologie.

19 oktober 2007 - J. Nellen

Proefschrift: Highly active antiretroviral therapy in non-indigenous patients in the Netherlands.

Promotor: prof. dr. J.M.A. Lange. Copromotoren: dr. J.M. Prins, dr. F.W.N.M. Wit. AMC, afdeling Inwendige geneeskunde.

24 oktober 2007 - W.W.J. van de Sande

Proefschrift: Genetic variability, antigenicity and antifungal susceptibility of *Madurella mycetomatis*.

Promotor: prof. dr. A.F. van Belkum. Copromotor: dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg. Erasmus MC, afdeling Medische microbiologie en infectieziekten.

21 november 2007 - R.J. van den Berg

Proefschrift: Molecular diagnosis and genotyping of *Clostridium difficile*. Promotor: prof. dr. H. Goossens, LUMC, afdeling Medische microbiologie.

21 november 2007 - P.C.A.M. Buijtels

Proefschrift: Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria in Zambia.

Promotor: prof. dr. H.A. Verbrugh. Copromotor: dr. D. van Soolingen, Erasmus MC, afdeling Medische microbiologie en infectieziekten.

22 november 2007 - K.F.M. Linsen

Proefschrift: Diagnostic value of bronchoalveolar lavage in infectious disorders.

Promotoren: prof. dr. C.A. Bruggeman, prof. dr. M. Drent. Copromotor: prof. dr. J.A. Jacobs, Universiteit Maastricht, afdeling Medische microbiologie.

23 november 2007 - R. Ezzahiri

Proefschrift: Infection and inflammation in progression of atherosclerosis: the role of *Chlamydia pneumoniae* in different mouse models.

Promotoren: prof. dr. C.A. Bruggeman, prof. dr. P.J.E.H.M. Kitslaar. Copromotor: dr. H.A.J.M. Kurvers, Universiteit Maastricht, afdeling Medische microbiologie.

27 november 2007 - E. Kusumastuti Sahiratmadja

Proefschrift: Innate and adaptive host responses and their genetic control in tuberculosis: studies in Indonesia, a highly TB endemic setting.

Promotor: prof. dr. T.H.M. Ottenhoff. Copromotor: dr. E. van de Vosse. LUMC, afdeling Infectieziekten.

27 november 2007 - A.M.J. Wensing

Proefschrift: Transmission of drug-resistant HIV-1.

Promotoren: prof. dr. J. Verhoef, prof. dr. I.M. Hoepelman. Copromotor: dr. C.A.B. Boucher. Universitair Medisch Centrum Utrecht, afdeling Interne geneeskunde.

29 november 2007 - M. Bouers

Proefschrift: *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: speciation in progress.

Promotor: prof. dr. I.M. Hoepelman. Copromotor: dr. T. Bockhout. UMC Utrecht, afdeling Interne geneeskunde.

20 december 2007 - M. Oostra

Proefschrift: SARS coronavirus membrane proteins.

Promotor: prof. dr. P.J.M. Rottier. Copromotor: dr. C.A.M. de Haan. Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, departement voor Infectieziekten en Immunologie, afdeling Virologie.

AGENDA

2008

16 – 19 JANUARI 2008

3rd Advances against Aspergillosis

Miami Beach, Florida, VS.

Informatie: tel.: +41 22 908 0488,

e-mail: Espid@kenes.com, www.AAA2008.org.

27 JANUARI – 1 FEBRUARI 2008

11th International Symposium Current Topics in Infectious Diseases

Grindelwald, Zwitserland.

Informatie: e-mail: ctid@azu.nl, www.ewi.med.uu.nl/CTID/.

28 JANUARI 2008

5^e Gezamenlijke bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56, L.C. Smeets, tel.: 015 260 45 84.

3 MAART 2008

319^e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 3614356.

12 – 15 MAART 2008

Clinical Virology Annual Meeting (ESCV)

Saariselkä, Finland.

Informatie: J. Schirm, Infectielab, Postbus 30039, 9700 RM

Groningen, tel.: 050 521 51 60,

e-mail: escv2008@congreg.fi, www.escv2008.fi.

14 – 16 MEI 2008

26th Annual Meeting European Society for Paediatric Infectious Diseases, ESPID

Graz, Oostenrijk.

Informatie: tel.: +41 22 908 0488, e-mail: Espid@kenes.com,

www.kenes.com/espido.

16 – 17 MEI 2008

1st International Workshop on Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis

Rotterdam.

Informatie: www.HinMax2008.org.

2 JUNI 2008

6^e Gezamenlijke bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56, L.C. Smeets, tel.: 015 260 45 84.

7 – 12 SEPTEMBER 2008

16th International Pathogenic Neisseria Conference 2008

Rotterdam.

Informatie: www.IPNC2008.org.

8 SEPTEMBER 2008

7^e Gezamenlijke bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56, L.C. Smeets, tel.: 015 260 45 84.

8 – 11 NOVEMBER 2008

Joint meeting of 9th European Congress of Chemotherapy and 16th Mediterranean Congress of Chemotherapy

Istanbul, Turkije.

Informatie: www.fesci.net.

1 DECEMBER 2008

320^e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56.

2009

7 – 10 JANUARI 2009

Wintermeeting European Society for Clinical Virology

Vrije Universiteit, Amsterdam.

Informatie: Harriet Oudakker-van Nieuwenhuijzen,

PAOG, Vrije Universiteit, tel.: 020 444 17 41,

paog@vumc.nl, <http://www.escv2009.nl>.

25 – 29 MEI 2009

17th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM) Tokyo, Japan.

Informatie: ASM, 1752 N Street, NW Washington, DC 20036-2804, USA, e-mail: malcolm.richardson@helsinki.fi, <http://www.isham.org/ISHAM2009FIRSTANNOUNCEMENT.pdf>.

RICHTLIJNEN VOOR AUTEURS

Het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* is het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie. 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 aan aankondigingen van promoties e.d., evenementen en aan mededelingen uit de vereniging.

Het tijdschrift volgt de meest recente editie van 'Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals' (zie Br Med J 1988;296:401-5 of Ann Intern Med 1988;108:258-65).

Door het inzenden van kopij verklaart de auteur:

- dat hij/zij het recht van eenmalige publicatie overdraagt aan het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie;
- dat het manuscript niet eerder of tezelfdertijd aan een ander Nederlandstalig tijdschrift is aangeboden;
- dat hij/zij ermee akkoord gaat dat de redactie het manuscript ter beoordeling aan referenten voorlegt, en aanpassingen toestaat daar waar nodig om de stijl van het manuscript bij te stellen vanwege de uniformering in het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie;
- dat met name genoemde personen die aan het totstandkomen van het manuscript hebben bijgedragen, akkoord gaan met de vermelding van hun naam, en toestemming hebben gegeven voor publicatie;
- dat hij/zij toestemming heeft verkregen voor het publiceren indien het reeds eerder gepubliceerd materiaal betreft, of indien het overname van een illustratie betreft.

Het manuscript is als volgt ingedeeld:

- titelpagina: titel manuscript, titels, namen en werkplaats en adressen van alle auteurs, eventuele dankbetuiging, correspondentieadres van een auteur met telefoonnummer (eventuele telefaxnummers), e-mailadressen, financiers;
- samenvatting in het Nederlands;
- drie tot maximaal vijf Nederlandse trefwoorden (bv. *Index Medicus*);
- samenvatting in het Engels.

Geef duidelijk aan welke delen van de tekst cursief dienen te worden afgedrukt (bv. namen van micro-organismen).

Oorspronkelijk onderzoeks- en overzichtsartikel

Hierbij wordt uitgegaan van maximaal vijf gedrukte tijdschriftpagina's inclusief samenvatting en literatuurgegevens (maximaal 3.000 woorden). Het manuscript moet een Nederlandse en Engelse samenvatting bevatten van elk maximaal 200 woorden. Maximaal vijf tabellen en/of figuren. Maximaal 30 literatuurverwijzingen. In de tekst worden referenties met nummer (in superscript) en niet met naam vermeld.

Casuïstiek

Hierbij wordt uitgegaan van drie gedrukte tijdschriftpagina's, inclusief samenvatting en literatuurgegevens (maximaal 1.800 woorden). Het manuscript moet een samenvatting bevatten van maximaal 150 woorden, gevolgd door een beschouwing en een conclusie. Maximaal vijf auteurs noemen. Maximaal drie tabellen en/of figuren. Maximaal 15 literatuurverwijzingen. In de tekst worden referenties met nummer (in superscript) en niet met naam vermeld.

Van de voorzitter

Hierbij wordt uitgegaan van maximaal twee gedrukte tijdschriftpagina's (1.200 woorden). Geen tabellen en/of figuren. Maximaal vijf literatuurverwijzingen. In de tekst worden referenties met nummer (in superscript) en niet met naam vermeld.

Ingezonden

In deze rubriek worden commentaren, brieven en reacties op artikelen of brieven opgenomen. Er wordt gelegenheid gegeven tot maximaal twee gedrukte tijdschriftpagina's (1.200 woorden) en maximaal vijf literatuurverwijzingen.

Samenvatting proefschrift

In deze rubriek worden de samenvattingen van recente promoties op het gebied van infectieziekten opgenomen. Hierbij wordt uitgegaan van maximaal één gedrukte tijdschriftpagina (500-600 woorden). Geen tabellen, figuren of literatuurverwijzingen. Verwijzingen naar hoofdstukken in het proefschrift dienen te worden vermeden. Verder dient het taalgebruik gericht te zijn op de doelgroep, vermijd leekentaal.

Literatuur

De lijst met gerefereerde literatuur aan het eind van het manuscript wordt opgesteld aan de hand van de nummering in de tekst. Elke verwijzing staat op een nieuwe regel: nummer, namen en voorletters (bij meer dan zes auteurs, na de zesde auteur: ", et al."); de volledige titel van de publicatie, naam van het tijdschrift volgens de *Index Medicus*; jaartal; deelnummer; nummer van eerste pagina (voluit) en die cijfers van het laatste paginanummer die verschillen van het eerste paginanummer, zonder spaties tussen de dubbele punten en de cijfers, zoals hieronder is aangegeven.

Voorbeeld:

1. Huysmans FThM, Wetzels JFM. Strikte behandeling van de bloeddruk bij patiënten met een nierziekte en proteïnurie. Ned Tijdschr Geneesk 2000;144:2085-7.

Voor de overige referentievormen wordt verwezen naar de 'Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals'.

Medicamenten of farmaca

Medicamenten of farmaca worden alleen met generische naam vermeld.

Nomenclatuur

Cursief gedrukte tekst dient in het manuscript als cursief dan wel onderstreept te worden aangegeven. Bij het voor de eerste keer noemen van de bacteriennaam of parasieten-naam dient deze voluit te worden geschreven in cursief (zie de semantische standaard op www.nvmm.nl). Daarna dient de genus-naam te worden afgekort tot de eerste letter ('*S. aureus*', '*T. gondii*'). Wanneer de naam van het genus op zichzelf wordt gebruikt zoals in 'er werden stafylokokken gevonden', of 'streptokokkeninfectie' wordt niet gecursiveerd. Bij specifiek gebruik van de genus-naam, bijvoorbeeld 'micro-organismen van het genus *Staphylococcus*' wordt wel gecursiveerd. Indien dit meervoud wordt gebruikt zoals bij 'Salmonellae' wordt niet gecursiveerd, maar kan ook worden gekozen voor 'salmonella's'. In samenstellingen wordt aaneengeschreven met een verbindingsstreepje: 'Salmonella-infecties', 'Salmonella-species', maar zonder streepje in 'Salmonella spp.'. Voor virussen geldt dat zij niet cursief worden geschreven. Voor het gebruik van de naam van de aandoening of ziekte wordt de spelling van Pinkhof, *Geneeskundig woordenboek*, aangehouden.

Tabellen en figuren

Geïllustreerde manuscripten vergroten de leesbaarheid. Tabellen en/of figuren dienen op een apart vel te worden aangeleverd, of digitaal in de vorm van een .jpg-, .jpeg-, .tif- of .bmp-bestand van een hoge resolutie. Figuren dienen vakkundig te zijn vervaardigd. De afbeeldingen moeten zo veel mogelijk contrasterend zijn. Lever bij de figuren en foto's gaarne de onderschriften aan het eind van het document.

Foto's dienen als glanzende zwart/wit-foto's te worden ingezonden, verpakt in karton. Aan de achterkant van uw illustratiemateriaal het nummer van de figuur of foto, de naam van de auteur, en een pijl om de bovenkant van de illustratie aan te geven. **Schrijf niet direct op de achterkant van het materiaal.**

Op foto's van microscopische preparaten moet een lijnstuk met schaalverdeling zijn aangebracht waaruit de vergrotingsfactor kan worden afgelezen. Pijlen, letters en dergelijke moeten helder (in zwart of wit) tegen de achtergrond afsteken.

Inzenden manuscript

Stuur het manuscript inclusief de aanbiedingsbrief en de tabellen, figuren en foto's naar het redactiesecretariaat, het liefst digitaal per e-mail.

Redactiesecretariaat

Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie
Postbus 2122, 2400 CC Alphen aan den Rijn, tel. 0172-476 191,
fax. 0172-471 882, e-mail: ntmm@zuidencomm.nl