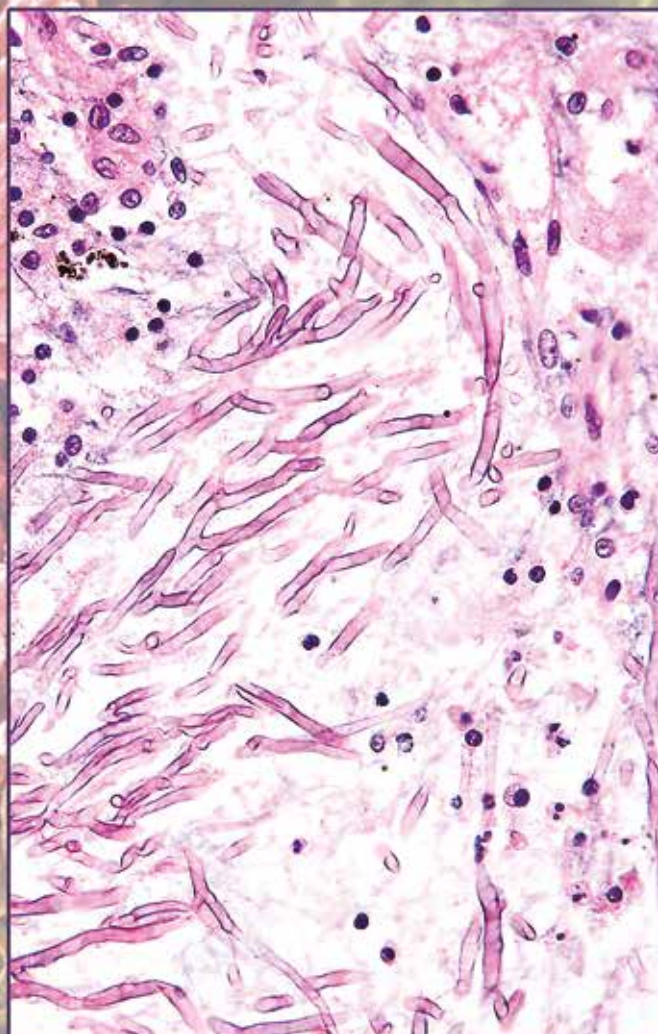


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Thema mycologie

Start derde landelijke sero-epidemiologisch onderzoek (Pienter3)

Ernstige acute luchtweginfecties: de ontbrekende bouwsteen in de surveillancepiramide

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

Mw. dr. E. Heikens, dr. L. Mulder

Redactie

Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg, J.M. van Hattem, mw. N. Hanemaaijer, dr. J.J. van Hellemond, mw. M. Jager, J.A. Kaan, dr. J.S. Kalpoe, dr. B. Meek, dr. M. van Rijn, mw. A.T.R. Tholen, dr. H.F.L. Wertheim, dr. R. te Witt

Redactiesecretariaat

Van Zuiden Communications B.V.
mw. drs. R.B. Mouton-Verschoor
Tel. (0172) 476191, e-mail:
mouton@vanzuidencommunications.nl

Advertentie-exploitatie

Van Zuiden Communications B.V.
Dhr. D. Mackay
Tel. (0172) 47 61 91

Oplage en frequentie

900 exemplaren, 4 x per jaar

Abonnementen

Gratis voor leden van de NVMM en leden van de VIZ.
Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 70,- per jaar
Buiten Nederland, in Europa: € 99,- per jaar
Losse nummers: € 17,50
Opgave abonnementen:
Tel. (0172) 47 61 91



© 2016, Van Zuiden Communications B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoerd, 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 gedeponeerd bij de Kamer van Koophandel te Leiden.

ISSN 0929-0176

Inhoud

Van de redactie

Nieuwe geno- en fenotypes in de medische mycologie
P.E. Verweij 2

Thema: mycologie

Azoolresistentie bij *Aspergillus fumigatus*
P.E. Verweij, J.F. Meis, E. Kolwijck, W.J.G. Melchers 3

Biomarkers in de diagnostiek van invasieve candida-infecties op de intensive-careafdeling
N.M. Hanemaaijer, P.E. Verweij, E. Kolwijck 9

Opkomende opportunistische Fusarium-infecties en azolen
A.D. van Diepeningen, W.J. Bartstra 15

Identificatie van klinisch relevante gisten met behulp van Malditof MS
A. Kolecka, T. Boekhout 21

Strategieën voor optimaal management van geneesmiddelinteracties met azool-antifungale middelen in de klinische praktijk
V.J.C. Lempers, L.C. Martial, R.J.M. Brüggemann 28

Ernstige opportunistische infectieuze complicaties vele jaren na niertransplantatie
L. Mulder, P. Pickkers, J.F. Meis 35

Cryptococcus en cryptokokkose – een epidemiologische en taxonomische update
F. Hagen, P.E. Verweij, A. van der Ende, W. Keijzer, A. Ott, G.A. Kampinga, J.F. Meis 37

Casuïstiek: keratomyose bij contactlensdragers
A.C.G. Voordouw, E.J. Kuijper, Y.Y.Y. Cheng, H.F. Wunderink 43

Transmissieroute

Het polio-eradicatieprogramma 'one gone, two to go'
A.C.G. Voordouw 47

Artikelen

Start derde landelijke sero-epidemiologisch onderzoek (Pienter3)
L. Mollema, H.E. de Melker, E.M. Swart, Y.W.M. van Weert, F.R. van der Klis 48

Ernstige acute luchtweginfecties: de ontbrekende bouwsteen in de surveillancetopiramide
S.D. Marbus, J.A. Oost, W. van der Hoek W, A. Meijer, F.N. Polderman, C.P.C. de Jager, G.H. Groeneveld, P.M. Schneeberger, A.B. van Gageldonk-Lafeber 52

Promoties

56

Toelichting bij coverbeeld: de achtergrond is een EM-opname, het beeld links betreft een lichtmicroscopieopname van een katoenblauwpreparaat en het beeld rechts is een coupe (longweefsel) van een *Aspergillus fumigatus*.

Cover: Hans den Boer en Loes van Damme, Erasmus MC, afdeling medische Microbiologie & Infectieziekten, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam.

Nieuwe geno- en fenotypes in de medische mycologie

Antimicrobiële resistentie (AMR) is een hot topic. Het probleem heeft de aandacht van zowel wetenschappelijke organisaties als de overheid. Bij AMR wordt primair gedacht aan bacteriële resistentieproblematiek. Hoewel de problemen rondom bacteriële resistentie inderdaad zorgelijk zijn en veel onderzoek vergen, mag er niet voorbij worden gegaan aan de toenemende resistentieproblemen bij schimmels. Het bijzondere van schimmelinfecties is dat, in tegenstelling tot antibacteriële middelen, er überhaupt maar een zeer beperkt arsenaal aan geneesmiddelklassen is die ingezet kan worden bij preventie of behandeling. Voor filamenteuze schimmels beperkt dit zich tot de azolen (itraconazol, voriconazol, posaconazol en isavuconazol) en de polyenen (amfotericine B-formuleringen). Er zijn schimmels zoals *Fusarium* en *Scedosporium* die intrinsiek multiresistent zijn en daardoor zeer moeilijk te behandelen. Verder wordt verworven resistentie in toenemende mate gevonden. Bij *Candida glabrata* kan resistentie optreden tegen azolen en echinocandinen¹ en azoolresistentie is een toenemend probleem bij met name *Aspergillus fumigatus*.² Resistentie betekent meestal dat een klasse middelen in zijn geheel wegvalt. Voriconazol is eerstekeusbehandeling van cerebrale aspergillose, waardoor de letaliteit is verminderd van meer dan 90 procent naar 45 procent.³ Bij azoolresistentie en cerebrale aspergillose is voriconazol niet inzetbaar en is de letaliteit erg hoog, vergelijkbaar met de periode voordat voriconazol beschikbaar kwam.⁴

Het wordt in de mycologie steeds belangrijker te komen tot een goede diagnose met een accurate species-identificatie. De steeds veranderende en uitdijende taxonomie maakt het ons niet gemakkelijk.⁵ Gelukkig staat daar tegenover de opkomst van nieuwe technieken zoals Malditof die ook in de mycologie behulpzaam kunnen zijn bij de species-identificatie van gisten en filamenteuze schimmels. Het is ook steeds vaker nodig in-vitro gevoeligheidsbepaling te verrichten, omdat – anders dan in het verleden – de gevoeligheid van de schimmel niet voorspeld kan worden op basis van de species.

Een aantal aspecten van de veranderingen in de mycologie worden belicht in dit themanummer: resistentieproblematiek bij *Fusarium* en *A. fumigatus*, diagnostische technieken zoals de 1,3-β-D-glucanbepaling en Malditof en geneesmiddelinteracties met azolen. De epidemiologie van cryptokokkose in Nederland en de veranderingen in de taxonomie worden besproken evenals illustratieve casus van cryptokokkose en *Fusarium*-keratitis.

De Nederlandse Vereniging voor Medische Mycologie (NVMY) heeft ook een ander ‘fenotype’ gekregen met een

fris nieuw logo. De vereniging organiseert allerlei activiteiten gericht op de medische mycologie. Op donderdag 22 september 2016 zal een nieuw initiatief starten, namelijk de Mycologie Update. Dit is een dag waar de meest recente ontwikkelingen op mycologiegebied aan de orde komen. In de ochtend zal de nadruk liggen op laboratoriumdiagnostiek en in de middag op de klinische consultatie. We bespreken dan de nieuwste richtlijnen, nieuwe antifungale middelen en de veranderingen in de epidemiologie van bepaalde schimmelinfecties in Nederland. Deze opfrisdag is (ook) bedoeld voor medici die zich wellicht niet dagelijks met schimmelproblemen bezig houden maar graag op de hoogte willen zijn van de laatste stand van zaken. Op dinsdag 15 november vindt de najaarsvergadering van de NVMY plaats waar onderzoekers op het gebied van de medische mycologie aan het woord komen en er ruimte is voor wetenschappelijke presentaties van promovendi.

Ten slotte is de NVMY gastheer van het ISHAM-congres in 2018. De ISHAM, International Society for Human and Animal Mycology, is de grootste, wereldwijd opererende organisatie gericht op alle aspecten van schimmelinfecties bij mens en dier. Het congres vindt plaats van 30 juni tot 4 juli 2018 in Amsterdam en we verwachten meer dan duizend deelnemers. Een mooie gelegenheid om Nederland als mycologieland te presenteren aan de buitenlandse gasten. Zo is er voor een ieder iets interessants. Noteer de data alvast in uw agenda.

Prof. dr. P.E. Verweij, arts-microbioloog
voorzitter NVMY



Referenties

- Alexander BD, Johnson MD, Pfeiffer CD, Jiménez-Ortigosa C, Catania J, Booker R, et al. Increasing echinocandin resistance in *Candida glabrata*: clinical failure correlates with presence of FKS mutations and elevated minimum inhibitory concentrations. *Clin Infect Dis*. 2013;56:1724-32.
- Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog*. 2013;9:e1003633.
- Schwartz S, Ruhnke M, Ribaud P, Corey L, Driscoll T, Cornely OA, et al. Improved outcome in central nervous system aspergillosis, using voriconazole treatment. *Blood*. 2005;106:2641-5.
- Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJ, Meis JF. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can we retain the clinical use of mold-active antifungal azoles? *Clin Infect Dis*. 2016;62:362-8.
- Irinyi L, Serena C, Garcia-Hermoso D, Arabatzis M, Desnos-Ollivier M, Vu D, et al. International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. *Med Mycol*. 2015;53:313-37.

Azoolresistentie bij *Aspergillus fumigatus*

P.E. Verweij, J.F. Meis, E. Kolwijck, W.J.G. Melchers

Samenvatting

De schimmelsoort *Aspergillus* kan verschillende ziektebeelden veroorzaken bij de mens. *Aspergillus fumigatus* is de belangrijkste verwekker en de azolen itraconazol, voriconazol en posaconazol vormen de belangrijke behandelopties. Het gebruik van deze middelen wordt bedreigd door de opkomst van azoolresistentie. Behalve bij patiënten die langdurig met azolen zijn behandeld worden azoolresistente isolaten ook gevonden in het milieu. Resistentie in het milieu ontstaat mogelijk door blootstelling van *A. fumigatus* aan azoolfungiciden, die breed worden toegepast voor bescherming van gewassen, voedingsproducten en (bouw-)materialen. Sommige azoolfungiciden zijn actief tegen *A. fumigatus* en tonen molecuulverwantschap met de medische azolen. Patiënten met ziektebeelden veroorzaakt door azoolresistente aspergillus, hebben een hoge kans op therapiefalen en bij invasieve aspergillose is de letaliteit hoog. Vroege detectie van resistentie is belangrijk. Bij kweek-positieve patiënten dienen verschillende *A. fumigatus*-kolonies uit een kweek onderzocht te worden op resistentie. Recent is er een moleculaire test beschikbaar gekomen die, behalve de aanwezigheid van *Aspergillus*, twee resistentiemechanismen kan aantonen. De test lijkt van waarde bij toepassing op BAL-vloeistof van hoogrisicopatiënten, maar validatie heeft tot op heden nog maar beperkt plaatsgevonden. Bij aangetoonde azoolresistente aspergillose dient monotherapie met azolen vermeden te worden en behandeld te worden met liposomaal amphotericine B of voriconazol in combinatie met een echinocandine.

Abstract

Aspergillus can cause a spectrum of diseases in humans. Most diseases are caused by *Aspergillus fumigatus* and the azoles itraconazole, voriconazole and posaconazole are the main treatment options. The medical use of azoles is threatened by the emergence of resistance. In addition to resistance development in patients receiving long-term azole therapy, isolates resistant to medical azoles are found in the environment. Selection of azole resistance in *A. fumigatus* in the environment might be driven by the use of azole fungicides, which are widely used for crop protection, post harvest and material preservation. Several azole fungicides show activity against *A. fumigatus* and exhibit

molecule similarity to medical triazoles. Patients with azole-resistant aspergillus diseases have a high probability of treatment failure and the mortality in azole-resistant invasive aspergillosis is significant. Early detection of azole resistance is important. In culture-positive patients resistance testing should take place on multiple colonies. Recently a molecular test became available which enables detection of *Aspergillus* as well as two resistance mechanisms. This assay appears useful in BAL-fluid, but thus far limited validation has taken place. In patients with azole-resistant aspergillosis azole monotherapy should be avoided and treatment with liposomal amphotericin B or voriconazole – echinocandin combination therapy should be considered.

Inleiding

Aspergillus-soorten veroorzaken een spectrum aan klinische ziektebeelden bij mens en dier. Patiënten kunnen zich presenteren met allergische beelden zoals allergische bronchopulmonale aspergillose (ABPA). ABPA wordt vooral gezien bij patiënten die chronisch gekoloniseerd zijn met *Aspergillus*, bijvoorbeeld patiënten met cystische fibrose (CF) en chronisch granulomateuze ziekte (CGD). *Aspergillus* kan een reeds bestaande holte in de long, ontstaan na het doormaken van bijvoorbeeld tuberculose, koloniseren. Dit wordt aangeduid als een aspergilloom. Een aspergilloom kan symptomeloos aanwezig zijn, maar kan ook aanleiding zijn tot klachten of zelfs een longbloeding. Patiënten met chronische longziekten zoals COPD, kunnen chronische pulmonale aspergillose (CPA) ontwikkelen, waarbij de schimmel lokaal invasief groeit en aanleiding geeft tot weefselschade. De chronische ontsteking kan resulteren in het ontstaan van een of meer caviteiten of longfibrose. Bij patiënten met verminderde afweer kan acute invasieve aspergillose (IA) ontstaan. IA

P.E. Verweij, E. Kolwijck, W.J.G. Melchers, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen, J.F. Meis, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen en Afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen. Correspondentieadres: P.E. Verweij, afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Postbus 9101, 6500 HB, Nijmegen. Tel.: 024-3614356, e-mail: Paul.Verweij@Radboudumc.nl

wordt gezien bij patiënten met bepaalde hematologische maligniteiten zoals acute myeloïde leukemie (AML) en bij patiënten die een orgaantransplantatie ondergaan, zoals een longtransplantatie. Ook bij patiënten die opgenomen zijn op de intensivereafdeling wordt in toenemende mate IA gediagnosticeerd, zoals bij ernstige COPD en na het doormaken van influenza.¹

In Nederland is *Aspergillus fumigatus* de meest voorkomende verwekker van ziekten die worden veroorzaakt door *Aspergillus*. *A. fumigatus* groeit goed bij lichaamstemperatuur en kan hoge temperaturen tot wel 50°C weerstaan. De schimmel is een alom in het milieu aanwezige saprofyt. Mensen ademen per dag honderden sporen in die door hun grootte vaak tot ver in de long kunnen doordringen. Men vermoedt dat de meeste gevallen van IA reeds buiten het ziekenhuis ontstaan.

Antifungale medicatie

In de afgelopen 10 jaar hebben de azolen een belangrijke plaats verworven bij de preventie en behandeling van aspergillusziekten.² De azolen grijpen in op de biosynthese van ergosterol, wat een belangrijke bouwsteen is van de celmembraan van schimmels. Itraconazol wordt gebruikt bij de behandeling van met name CPA, terwijl voriconazol eerste keus is voor de behandeling van IA. Recent is een ander azool, isavuconazol, toegelaten voor de primaire behandeling van IA. Posaconazol wordt gebruikt als profylacticum in hoogrisicopatiënten, zoals neutropene AML-patiënten of stamceltransplantatiepatiënten met graft-versus-host-ziekte. Itraconazol, voriconazol en isavuconazol zijn zowel intraveneus als oraal beschikbaar, terwijl posaconazol beschikbaar is als orale solutie of tablet. Er is ook een intraveneuze vorm van posaconazol ontwikkeld, dat momenteel klinische evaluatie ondergaat. Voor de behandeling van infecties veroorzaakt door *Aspergillus* zijn buiten de azolen geen andere middelen beschikbaar die oraal kunnen worden toegediend.

Naast de azolen zijn de polyenen de belangrijkste groep middelen die beschikbaar is voor de behandeling van aspergillose. De polyenen binden aan het ergosterol met celdood als gevolg. Omdat de middelen uit deze groep ook affiniteit hebben voor cholesterol, dat aanwezig is in de celmembraan van humane cellen, kunnen bijwerkingen ontstaan. Van het meest toegepaste middel uit deze groep, amfotericine B (AmB), zijn lipideformuleringen beschikbaar gekomen, die minder toxiciteit geven en daardoor behandeling met een hogere dosering toelaten. Van de lipideformuleringen van AmB, is het meeste onderzoek verricht met liposomaal-AmB (L-AmB).

De echinocandines zijn ook werkzaam tegen *Aspergillus*. Onder echinocandines vallen drie middelen: caspofungine, anidulafungine en micafungine. Ze remmen de opbouw van de celwand, een structuur dat niet aanwezig is in humane cellen. Echinocandines geven doorgaans weinig

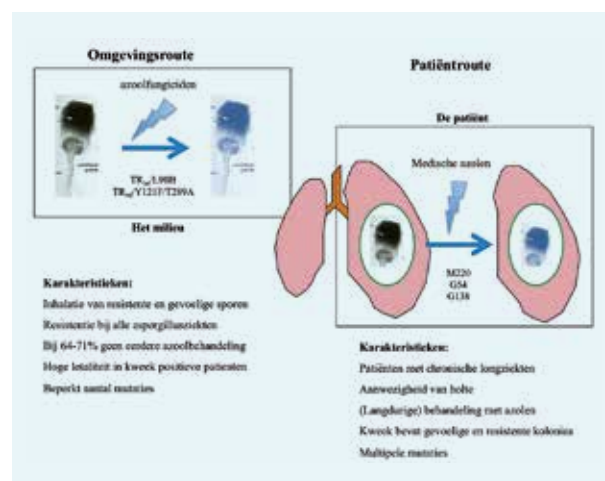
bijwerkingen, maar de effectiviteit tegen *Aspergillus* is beperkt omdat de schimmel door het remmen van de opbouw van de celwand niet gedood wordt. Klinische studies tonen aan dat echinocandines effectief zijn bij patiënten met CPA, maar ze lijken minder effectief als primaire behandeling van neutropene patiënten met IA.³ Echinocandines zijn mogelijk geschikt om te combineren met een azool, zoals recent werd aangetoond in een onderzoek naar de effectiviteit van voriconazol gecombineerd met anidulafungine.⁴ In vergelijking met voriconazol-monotherapie was er een trend naar een betere overleving bij patiënten die behandeld werden met combinatietherapie, maar werd statistische significantie niet bereikt.

Resistentie tegen azolen

In de afgelopen jaren wordt er in toenemende mate melding gemaakt van resistentie tegen azolen bij *A. fumigatus*. In Nederland werd azoolresistentie voor het eerst gevonden in 1998 in een kweek van een longtransplantatiepatiënt.⁵ In heel Nederland werd een trend waargenomen van patiënten die zich presenteerden met azoolresistente aspergillusziekten.⁶ Hierbij was opvallend dat een deel van de patiënten niet eerder met azolen was behandeld en dat de resistente schimmels hetzelfde resistentiemechanisme hadden en bij genotypering verwantschap toonde. Hoewel het bekend was dat *A. fumigatus* resistent kan worden tijdens azoolbehandeling, werden er aanwijzingen gevonden dat er een tweede resistentie-inductieroute was, namelijk door blootstelling van de schimmel aan azolen in het milieu.⁷ De kenmerken van de twee routes (voor zover bekend) staan weergegeven in figuur 1.

Azoolresistentie is meestal het gevolg van mutaties in het *cyp51A*-gen, wat het aangrijppingspunt is voor de azolen.

Figuur 1. Twee routes van resistentieselectie in *A. fumigatus* met belangrijkste karakteristieken.



Veel azoolresistente stammen hebben puntmutaties in dit gen, bijvoorbeeld op de plaatsen G54, M220, G138. Deze mutaties hebben veranderingen tot gevolg in kanalen die de azolen toegang geven tot een heemmolecuul waaraan de azool dient te binden. Eiwitmodellen van *cyp51A* geven aan dat door deze mutaties de vorm van het kanaal verandert en daardoor de azolen niet meer kunnen binden. Veel van deze mutaties geven resistentie tegen verschillende, vaak alle, anti-*Aspergillus*-azolen. De puntmutaties worden gevonden bij patiënten die langdurig behandeld worden met azolen.⁸ De aanwezigheid van een holte, zoals een aspergilloom, wordt gezien als een risicofactor voor resistentieontwikkeling.⁷ Gedacht wordt dat asexuele sporulatie, wat plaatsvindt in een holte, de vorming van mutaties faciliteert. In kweken van deze patiënten kunnen individuele *A. fumigatus*-kolonies verschillende resistentiemutaties hebben en moeten bij in vitro gevoeligheidsbepalingen verschillende kolonies onderzocht worden. Azoolresistente *A. fumigatus* stammen uit het milieu en hebben ook mutaties in het *cyp51A*-gen, maar daarnaast ook een 'tandem repeat' (TR) in de promotorregio van het gen.⁹ De aanwezigheid van een TR verhoogt de expressie van het gen.¹⁰ Resistentiemechanismen die geassocieerd zijn met het milieu zijn TR₃₄/L98H en TR₄₆/Y121F/T289A.^{11,12} De resistentiemechanismen werden gevonden in *A. fumigatus*-stammen uit grondmonsters en luchtmetingen in het binnenhuismilieu, maar ook in resistente stammen die gekweekt werden bij patiënten. Surveillanceonderzoek van universitair medische centra in Nederland toont aan dat de omgevingsroute een belangrijke bron is voor resistente aspergillusziekten omdat 80 tot 90 procent van de klinische resistente stammen één van bovengenoemde mechanismen bevat.¹³ Naast de cyp-gemedieerde resistentiemechanismen, wordt bij ongeveer 10 procent van de resistente stammen geen mutatie gevonden in het *cyp51A*-gen. Waarschijnlijk zijn er (vele) andere mechanismen die tot azoolresistentie leiden maar nog onbekend zijn. Eén mechanisme is recent opgehelderd bij een patiënt die langdurig werd behandeld met azolen, namelijk een mutatie in het HapE-gen. Dit mechanisme lijkt niet veel voor te komen.¹⁴ Hoewel resistentie ten koste kan gaan van de virulentie, lijkt dat voor de cyp-gemedieerde resistenties geen rol te spelen. Dierexperimenteel onderzoek toont aan dat de virulentie van deze stammen vergelijkbaar is met die van wild type stammen.

De omgevingsroute en verspreiding

Aanwijzingen voor een omgevingsroute werden voor het eerst in Nederland gevonden in 2008.⁶ Azolen worden veelvuldig gebruikt buiten de geneeskunde voor gewasbescherming en als biocide, met als doel om schimmel-aantasting van gewassen en materialen te voorkomen. De azolen zijn een belangrijke groep middelen die gebruikt

worden om gewassen te beschermen tegen voor planten pathogene schimmels. *A. fumigatus* is een saprofyt en voor planten geen pathogeen, en is dus een 'innocent bystander'. Hoewel de azoolfungiciden niet gericht zijn op *A. fumigatus*, blijken veel van deze fungiciden wel activiteit te hebben tegen *A. fumigatus*, wat een voorwaarde is voor resistentieontwikkeling.¹⁵ Meer dan 30 azoolfungiciden zijn onderzocht op hun in vitro-activiteit tegen *A. fumigatus*, waaruit bleek dat veel middelen wild type stammen kunnen remmen. Bij sommige middelen was de azoolfungicide wel actief tegen wild type stammen, maar onwerkzaam tegen stammen met de TR₃₄/L98H-mutaties. Uit deze groep bleek de molecuulstructuur van vijf fungiciden (propiconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol en bromuconazol) sterk te lijken op dat van de medische azolen.¹⁵ Deze middelen zijn toegelaten in Nederland tussen 1990 en 1996, vlak voordat de eerste klinische TR₃₄/L98H-stam werd gevonden in 1998. Azolen worden als biocide ook veelvuldig toegepast, onder andere in verf en coatings, behangplaksel, kleding, houtverduurzaming et cetera. De gedachte is dat *A. fumigatus* resistent wordt door blootstelling aan deze middelen in het milieu. Als een patiënt een aspergillusziekte ontwikkelt zijn de medische azolen niet meer werkzaam door de structuurverwantschap van de moleculen. Het is nog onduidelijk hoe resistentie ontstaat in het milieu en welke toepassingen van de fungiciden risicovol zijn in het licht van resistentieontwikkeling. Het is lange tijd niet gebruikelijk geweest in microbiologische laboratoria om resistentiebepalingen te verrichten bij filamenteuze schimmels, maar inmiddels wordt in veel centra *A. fumigatus* onderzocht op resistentie voor azolen. Hierdoor is het duidelijk geworden dat azoolresistentie een mondiaal probleem is.^{16,17} De mutaties geassocieerd met de omgevingsroute zijn gevonden in vele landen en verschillende continenten. Veel landen in Europa melden resistentie waaronder België, Frankrijk, Spanje, Denemarken, Italië, Noorwegen, Duitsland, Oostenrijk, het Verenigd Koninkrijk en Turkije.^{16,17} Buiten Europa is resistentie gevonden in het Midden-Oosten, China, Taiwan, India, Tanzania en Australië.¹⁶⁻¹⁹ Recent zijn ook in Noord- en Zuid-Amerika resistentie door deze mutaties gemeld.^{20,21} Uitbundige asexuele sporulatie en het vermogen in zeer verschillende milieuomstandigheden te overleven, faciliteren waarschijnlijk de wereldwijde verspreiding van resistentie. Overigens lijkt dit resistentieprobleem uitsluitend voor te komen bij *A. fumigatus* en niet bij andere *Aspergillus*-species.

Klinische implicaties van resistentie

Hoewel er geen gerandomiseerde onderzoeken zijn uitgevoerd, wordt het in toenemende mate duidelijk dat patiënten met azoolresistente aspergillusziekten een hoge kans hebben op therapiefalen. In het eerste Nederlandse

surveillanceonderzoek werden acht patiënten met azoolresistente IA geïdentificeerd waarvan zeven binnen drie maanden na diagnose waren overleden.¹¹ Vijf patiënten hadden een kweek-positieve pulmonale aspergillose en faalden op behandeling met voriconazol. Andere casuïstiek bevestigt deze observatie, onder andere een recent onderzoek uit Duitsland waar zeven van de acht patiënten met azoolresistente IA faalden op therapie en zijn overleden.²² Ook patiënten met CPA door een azoolresistente stam falen op (voornamelijk azool)therapie.²³ Er zijn veel factoren die therapiefalen kunnen veroorzaken bij IA, zoals het niet in remissie zijn van de onderliggende leukemie, onvoldoende blootstelling aan voriconazol, of een reeds ver voortgeschreden infectie. Hierdoor is het onduidelijk wat de bijdrage is van een hoge MIC aan de kans op therapiefalen. Hiervoor zou bijvoorbeeld een patiënt-controleonderzoek plaats moeten vinden. Wel ondersteunen diermodellen de observatie dat een verhoogde MIC leidt tot verlies van effectiviteit van de azolen.

Diagnose

In Nederland komt azoolresistentie wijdverbreid voor. Er vindt surveillance plaats in verschillende UMC's waarover jaarlijks gerapporteerd wordt in Nethmap. Gemiddeld wordt er bij ruim zeven procent van de patiënten met een positieve kweek azoolresistentie gevonden. Dit percentage verschilt tussen de UMC's variërend in 2014 van 4,3 tot 13,3 procent.¹³ De reden voor deze variatie is onduidelijk. Zeer recent is ook in een aantal samenwerkende topklinische opleidingsziekenhuizen (STZ) een surveillanceonderzoek uitgevoerd, waarbij eveneens hoge resistentiepercentages werden waargenomen. Opvallend is dat in tegenstelling tot de UMC's er veel meer resistente stammen werden gevonden waarbij er geen cyp-mutatie aangetoond werd. Mogelijk speelt verschil in patiëntengroepen hierbij een rol, dat wil zeggen: meer resistentie door langdurige azoolbehandeling. Het is aan te bevelen om een in vitro-gevoeligheidsbepaling uit te voeren bij patiënten die een positieve *A. fumigatus*-kweek hebben en de intentie bestaat te behandelen. Dit zou moeten gebeuren op verschillende kolonies (indien aanwezig). Het probleem is dat in veel microbiologische laboratoria MIC-bepalingen voor aspergillus niet voorhanden zijn. Bij het surveillanceonderzoek wordt gebruik gemaakt van een screeningsmethode die gebaseerd is op een agar-gebaseerde test. Deze benadering heeft als voordeel dat er op fenotype wordt gescreend en dus ook resistente stammen met onbekende resistentiemechanismen worden opgespoord. Verschillende kolonies worden afgeënt op een vier-wellsplaatje waarin naast de groeicontrolen itraconazol, voriconazol en posaconazol aan de agar zijn toegevoegd. Hiermee kan resistentie met een hoge sensitiviteit en specificiteit worden opgespoord. Bij stammen die alleen op de groeicontrolen groeien, is resistentie vrijwel uitgesloten.

Indien er wel groei is, is resistentie zeer waarschijnlijk en dient op de stam een MRC-bepaling te worden verricht op deze eventueel opgestuurd te worden naar een referentielaboratorium. Deze benadering bleek behalve voor surveillanceonderzoek ook goed bruikbaar voor klinisch management van patiënten met aspergillose. Immers, de agartest kan helpen te selecteren op welke stammen een in vitro-gevoeligheidsbepaling uitgevoerd dient te worden. Verder is bij groei van *A. fumigatus* op de agar waaraan azolen zijn toegevoegd, de kans op resistentie zo hoog dat direct overwogen kan worden ingesteld azooltherapie aan te passen, dus voordat bevestiging volgt met de MIC-bepaling. Vanwege deze ervaring worden er initiatieven genomen om de agar-screeningstest commercieel beschikbaar te maken (VIPcheck™). Als alternatief kan ook gescreend worden met de E-test. Om te voorkomen dat elke kolonie met drie stripjes (itraconazol, voriconazol, posaconazol) gescreend moet worden, kan het beste met itraconazol gescreend worden, hoewel resistentie dan wel gemist kan worden.

Zowel de CLSI en de EUCAST hebben een referentiemethode voor in vitro-gevoeligheidsbepaling van *Aspergillus*.^{24,25} De CLSI gebruikt een epidemiologische afkapwaarde terwijl de EUCAST op basis van een aantal parameters zoals standaarddosering, farmacokinetiek en -dynamiek en uitkomst van klinisch onderzoek tot klinische breekpunten is gekomen. Voor *A. fumigatus* staan de EUCAST-breekpunten weergegeven in tabel 1.

Detectie van azoolresistentie bij kweek-negatieve patiënten

De kweek van BAL-vloeistof is bij de meerderheid (tot 90 procent) van de patiënten met IA negatief. Het aantonen

Tabel 1. EUCAST breekpunten voor *A. fumigatus*.

| Middel | S ≤ | R > |
|----------------|------|------|
| Amfotericine B | 1 | 2 |
| Itraconazol | 1 | 2 |
| Voriconazol | 1 | 2 |
| Posaconazol | 0,12 | 0,25 |
| Isavuconazol | 1 | 1 |
| Anidulafungine | IE* | IE |
| Caspofungine | IE | IE |
| Micafungine | IE | IE |

* IE, onvoldoende bewijs dat *A. fumigatus* een goed doelorganisme is voor het betreffende middel.

van resistentie in kweeknegatieve patiënten is moeilijk. Bestaande antigeentesten zoals galactomannan en beta-D-glucan, zijn indicatief voor aspergillose maar geven geen informatie omtrent gevoeligheid. Het aantonen van resistentiemechanismen met PCR direct in het weefsel, werd in 2010 voor het eerst beschreven bij een patiënt met een kweeknegatieve cerebrale aspergillose.²⁶ Andere onderzoekers hebben bevestigd dat directe detectie van mutaties mogelijk is. Dit lijkt een goede mogelijkheid resistentie aan te tonen bij kweek-negatieve patiënten.²⁷ Recent is er een multiplex real-time PCR beschikbaar gekomen (AsperGenius®, PathoNostics, Maastricht) waarmee een aantal *Aspergillus*-species kan worden aangetoond alsmede vier merkers van de twee resistentiemechanismen die geassocieerd zijn met de omgeving: TR₃₄/L98H en TR₄₆/Y121F/T289A. Deze test liet een goede sensitiviteit en specificiteit zien voor het aantonen van *Aspergillus* in BAL-vloeistof in een onderzoek van het Erasmus MC.²⁸ Bij patiënten met een hematologische maligniteit was de sensitiviteit en specificiteit respectievelijk 88,9 en 89,3 procent en bij ic-patiënten 80 en 93,3 procent. In deze serie werd ook een kweeknegatieve patiënt gevonden die ook een positieve mutatie-PCR had. In een ander onderzoek werd de waarde van de AsperGenius-PCR onderzocht in het serum van 16 patiënten met IA.²⁹ De sensitiviteit en specificiteit waren 78,6 en 100 procent, maar er werden geen gevallen van azoolresistente IA gediagnosticeerd. Omdat het *cyp51A*-gen maar in één kopie per cel voorkomt, is het aantonen van mutaties lastig in serum door beperkte sensitiviteit van de test. Bovendien worden met de Aspergenius-PCR slechts twee resistentiemechanismen aangetoond en kan bij een negatieve testuitslag de aanwezigheid van azoolresistente infectie niet worden uitgesloten. Toch zijn de resultaten van moleculaire testen bemoedigend en kunnen ze met name in BAL-vloeistof van toegevoegde waarde zijn.

Behandeling van azoolresistente aspergillose

Er zijn momenteel geen richtlijnen beschikbaar waarin de behandeling van azoolresistente aspergillose wordt meegenomen. Een richtlijn van de ESCMID en ECMM over de behandeling van aspergillusziekten is gereed gekomen waarin de diagnose en behandeling van azoolresistentie wordt meegenomen. Deze richtlijn zal binnenkort gepubliceerd worden. De effectiviteit van antifungale middelen in relatie tot azoolresistentie is uitgebreid onderzocht in diermodellen. Deze modellen laten zien dat een verhoogde MRC de effectiviteit van azool-monotherapie belangrijk verminderd. Verlies van effectiviteit werd gevonden met voriconazol, posaconazol en isavuconazol. De in-vitro-activiteit van de echinocandines lijkt niet nadelig beïnvloed te worden door de aanwezigheid van een azoolresistentie mutatie, maar de maximale overleving van anidulafungine behandeling in een niet-neutropeen model

van gedissemineerde aspergillose was slechts 45 procent, wat veel lager is dan dat van de azolen bij azoolgevoelige infecties. Alleen L-AmB was effectief bij zowel wild type als azoolresistente infectie.³⁰ De combinatie voriconazol en anidulafungine toonde synergisme bij infectie door een wild type stam.³¹ Indien de muizen geïnfecteerd werden door een *A. fumigatus*-isolaat met een voriconazol MRC van vier mg/l was de interactie slechts additief. De effectiviteit van de combinatie is niet onderzocht bij infectie met een isolaat met een voriconazol MRC van meer dan 16 mg/l, maar er is zorg dat de effectiviteit van de combinatie dan volledig afhankelijk is van anidulafungine, die suboptimaal is. Aangezien isolaten met het TR₄₆/Y121F/T289A-resistentiemechanisme voriconazol hoog-resistent zijn, dient de effectiviteit van de combinatie nader onderzocht te worden.

Het lijkt verstandig bij aangetoonde azoolresistentie een behandeling met azool-monotherapie te vermijden en te behandelen met L-AmB of eventueel de combinatie voriconazol met een echinocandine. De optimale strategie op afdelingen en in instellingen met een hoge prevalentie van azoolresistentie is onduidelijk. Op een gegeven moment dient men de keus van voriconazol-monotherapie als initiële therapie te heroverwegen. Alternatieven zijn dan L-AmB of de combinatie voriconazol en een echinocandine. Tijdens een onlangs gehouden expertbijeenkomst vonden de meeste experts dat bij een prevalentie van meer dan 10 procent resistentie ten gevolge van 'omgevingsmutaties' de eerste keus (empirische) therapie heroverwogen dient te worden.³²

Conclusie

Het gebruik van azolen in verschillende toepassingsgebieden, namelijk gewasbescherming, materiaalverduurzaming en behandeling van schimmelziekten bij mens en dier heeft geresulteerd in een niet-duurzame situatie waarbij over de tijd steeds nieuwe azoolresistentiemechanismen ontstaan in het milieu. Bij ongewijzigd beleid is het gebruik van de azoolklasse in de gezondheidszorg bedreigd, met verlies van de enige orale behandelingsoptie van aspergillusziekten. Het is van groot belang resistentievorming in het milieu bij *A. fumigatus* te onderzoeken met als doel situaties met een risico op resistentie te identificeren om maatregelen te nemen die dit risico verkleinen of elimineren. Dergelijke situaties kunnen in elk van de toepassingsgebieden van azolen voorkomen. Gegeven de brede toepassingen van azoolfungiciden wereldwijd, zullen eventuele maatregelen breed ingevoerd moeten worden om enig effect te bewerkstelligen op het risico op resistentieselectie.

Bij de diagnose en behandeling van patiënten met aspergillusziekten dient, indien mogelijk, de aanwezigheid van azoolresistentie onderzocht te worden aangezien er geen evidente risicofactoren bekend zijn voor die aanwezigheid.

Patiënten die behandeld worden met azool-monotherapie moeten vervolgd worden en bij onbegrepen klinisch falen dient een nieuwe diagnostische interventie overwogen te worden. Bij aangetoonde resistentie dient therapie te worden aangepast waarbij L-AmB of combinatietherapie op basis van dierexperimenteel onderzoek mogelijk alternatieve behandelingsopties zijn.

Referenties

- Kolwijck E, Scheper H, Beuving J, Kuijper EJ, van der Hoeven JG, Verweij PE. Invasieve pulmonale aspergillose bij influenza. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2015;159:A7431.
- Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, Herbrecht R, Kontoyiannis DP, Marr KA, et al. Infectious Diseases Society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2008;46:327-60.
- Viscoli C, Herbrecht R, Akan H, Baila L, Sonet A, Gallamini A, et al. Infectious Disease Group of the EORTC. An EORTC Phase II study of caspofungin as first-line therapy of invasive aspergillosis in haematological patients. *J Antimicrob Chemother* 2009;64:1274-81.
- Marr KA, Schlamm HT, Herbrecht R, Rottinghaus ST, Bow EJ, Cornely OA, et al. Combination antifungal therapy for invasive aspergillosis: a randomized trial. *Ann Intern Med* 2015;162:81-9.
- Verweij PE, Te Dorsthorst DT, Rijs AJ, De Vries-Hospers HG, Meis JF. Nationwide survey of in vitro activities of itraconazole and voriconazole against clinical *Aspergillus fumigatus* isolates cultured between 1945 and 1998. *J Clin Microbiol* 2002;40:2648-50.
- Snelders E, van der Lee HA, Kuijpers J, Rijs AJ, Varga J, Samson RA, et al. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med* 2008;5:e219.
- Verweij PE, Snelders E, Kema GH, Mellado E, Melchers WJ. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side effect of environmental fungicide use? *Lancet Infect Dis* 2009;9:789-95.
- Camps SM, van der Linden JW, Li Y, Kuijper EJ, van Dissel JT, Verweij PE, et al. Rapid induction of multiple resistance mechanisms in *Aspergillus fumigatus* during azole therapy: a case study and review of the literature. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56: 10-6.
- Snelders E, Huis In't Veld RA, Rijs AJ, Kema GH, Melchers WJ, Verweij PE. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl. Environ Microbiol* 2009;75:4053-7.
- Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, Rijs AJ, Zoll J, Verweij PE, et al. Genotype-phenotype complexity of the TR46/Y121F/T289A cyp51A azole resistance mechanism in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 2015;82:129-35.
- Van der Linden JW, Snelders E, Kampinga GA, Rijnders BJ, Mattsson E, Debets-Ossenkopp YJ, et al. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846-54.
- Van der Linden JW, Camps SM, Kampinga GA, Arends JP, Debets-Ossenkopp YJ, Haas PJ, et al. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clin Infect Dis* 2013;57:513-20.
- Verweij PE. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. In: *NethMap 2015. Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands*, 113-115.
- Camps SM, Dutilh BE, Arendrup MC, Rijs AJ, Snelders E, Huynen MA, et al. Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLoS One* 2012;7:e50034.
- Snelders E, Camps SM, Karawajczyk A, Schaftenaar G, Kema GH, van der Lee HA, et al. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 2012;7:e31801.
- Chowdhary A, Kathuria S, Xu J, Meis JF. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003633.
- Van der Linden JWM, Arendrup MC, Warris A, Lagrou K, Pelloux H, Hauser PM, et al. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerg Infect Dis* 2015;21:1041-4.
- Chowdhary A, Kathuria S, Randhawa HS, Gaur SN, Klaassen CH, Meis JF. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:362-6.
- Kidd SE, Goeman E, Meis JF, Slavin MA, Verweij PE. Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia. *Mycoses* 2015;58:350-5.
- Wiederhold NP, Garcia Gil V, Gutierrez F, Lindner JR, Albataineh MT, McCarthy DI, et al. First Detection of TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates in the United States. *J Clin Microbiol* 2016;54:168-71.
- Le Pape P, Lavergne RA, Morio F, Alvarez-Moreno C. Multiple fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus*, Colombia, 2015. *Emerg Infect Dis* 2016;22:156-7.
- Steinmann J, Hamprecht A, Vehreschild MJ, Cornely OA, Buchheidt D, Spiess B, et al. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1522-6.
- Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, et al. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis* 2009;15:1068-76.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2nd ed. Document M38-A2. CLSI, Wayne, PA.
- Rodriguez-Tudela JL, Arendrup MC, Arkan S, Barchisei F, Bille J, Chrystantou E, et al. EUCAST technical note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:982-4.
- Van der Linden JW, Snelders E, Arends JP, Daenen SM, Melchers WJ, Verweij PE. Rapid diagnosis of azole-resistant aspergillosis by direct PCR using tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2010;48:1478-80.
- Denning DW, Park S, Lass-Flörl C, Fraczek MG, Kirwan M, Gore R, et al. High-frequency triazole resistance found in nonculturable *Aspergillus fumigatus* from lungs of patients with chronic fungal disease. *Clin Infect Dis* 2011;52:1123-9.
- Chong GL, van de Sande WW, Dingemans GJ, Gaajetaan GR, Vonk AG, Hayette MP, et al. Validation of a new *Aspergillus* real-time PCR assay for direct detection of *Aspergillus* and azole resistance of *Aspergillus fumigatus* on bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2015;53:868-74.
- White PL, Posso RB, Barnes RA. An analytical and clinical evaluation of the PathoNostics AsperGenius® Assay for detection of invasive aspergillosis and resistance to azole antifungal drugs when testing serum samples. *J Clin Microbiol* 2015;53:2115-21.
- Seyedmousavi S, Melchers WJ, Mouton JW, Verweij PE. Pharmacodynamics and dose-response relationships of liposomal amphotericin B against different azole-resistant *Aspergillus fumigatus* isolates in a murine model of disseminated aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:1866-71.
- Seyedmousavi S, Brüggemann RJ, Melchers WJ, Verweij PE, Mouton JW. Efficacy and pharmacodynamics of voriconazole combined with anidulafungin in azole-resistant invasive aspergillosis. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:385-93.
- Verweij PE, Ananda-Rajah M, Andes D, Arendrup MC, Brüggemann RJM, Chowdhary A, et al. International expert opinion on the management of infection caused by azole resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resist Updat* 2015;21-22:30-40.

Biomarkers in de diagnostiek van invasieve candida-infecties op de intensivereafdeling

N.M. Hanemaaijer, P.E. Verweij, E. Kolwijck

Samenvatting

Invasieve candidiasis is een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit bij ic-patiënten. Vertraging in de start van antifungale therapie leidt tot een slechtere klinische uitkomst. De gouden standaard voor de diagnostiek van invasieve candida-infecties is de bloedkweek. Het duurt echter lang tot deze positief wordt en bovendien is de sensitiviteit beperkt. Dit laatste geldt met name voor patiënten met abdominale invasieve candidiasis. Hierdoor is er behoefte aan andere (niet-invasieve) detectiemethodes. Inmiddels zijn er diverse testen voor verschillende biomarkers op de markt, zoals 1-3- β -D-glucan (BDG), *Candida albicans* germ tube-specific antibody (CAGTA) en *Candida* mannan antigeen/*Candida*-antistoffen. Een voordeel van BDG is dat hiermee een snellere diagnose mogelijk is, daarnaast maakt de hoge negatief voorspellende waarde deze test geschikt om de diagnose invasieve candidiasis te verwerpen. Ook het gebruik van PCR op *Candida* is in opkomst. De hoge sensitiviteit en de snelheid maken dit een waardevolle toevoeging aan de diagnostiek van invasieve candidiasis.

Abstract

Invasive candidiasis is an important cause of morbidity and mortality in critically ill patients. Delayed initiation of antifungal therapy reduces clinical outcome. The golden standard for the diagnosis of invasive candida infections is blood culture. However, the time to positivity of blood culture may be long and the sensitivity suboptimal, especially in patients with abdominal candida infection. Therefore, there is a medical need for alternative (non-invasive) diagnostic tools. Several biomarkers are commercially available including 1-3- β -D-glucan (BDG), *Candida albicans* germ tube-specific antibody (CAGTA) en *Candida* mannan antigen/antibody. An advantage of BDG is that it allows an early diagnosis and the high negative predictive value makes the assay suitable to rule-out candida infection. Also PCR for detection of *Candida* is becoming more frequently used. The high sensitivity and rapid turn-around-time makes PCR a valuable addition to the diagnosis of invasive candidiasis.

Inleiding

Invasieve candidiasis leidt tot een hoge morbiditeit en mortaliteit en een langere opnameduur. Er zijn aanwijzingen dat ondanks de beschikbaarheid van nieuwe antifungale middelen zoals echinocandinen en het publiceren van behandelingsrichtlijnen, de mortaliteit van invasieve candida-infecties niet daalt.¹ De gerapporteerde incidentie in de Europese populatie betreft zo'n 1-11 per 100.000 mensen.² *Candida sepsis* komt het meest frequent voor op intensivereafdelingen. De belangrijkste risicofactoren zijn breedspectrum antibioticagebruik, totale parenterale voeding (TPV), centraal veneuze lijnen en abdominale operaties.³ Patiënten met gastro-duodenale perforaties, naadlekkages of acute necrotiserende pancreatitis lopen het hoogste risico.⁴

De afgelopen jaren is er een verschuiving opgetreden van verwekkers van candida-infecties met een stijgende incidentie van non-albicans verwekkers, hoewel er geografisch grote verschillen zijn.⁵ In Europa is *Candida albicans* nog steeds de meest voorkomende verwekker, daarnaast wordt vooral *C. glabrata* vaak gevonden (13-21 procent). Er zijn geografische verschillen in de epidemiologie van de verschillende *Candida*-species² en de speciesverdeling verschilt ook afhankelijk van de leeftijd van de patiënt. Zo wordt *C. glabrata* vaker bij ouderen gevonden, terwijl *C. parapsilosis* primair voorkomt bij neonaten. In Nederland is ook de verschuiving naar meer non-albicans *Candida*-species beschreven, maar er zijn geen recente gegevens beschikbaar.⁶

Invasieve candidiasis omvat twee vormen: candidemie en de zogenaamde 'deep-seated' candida-infectie (infectie van weefsels onder de mucosa). Candidakolonisatie speelt een belangrijke rol in de pathogenese van invasieve candida-infecties. Een veranderd microbioom door onder andere het

N.M. Hanemaaijer, P.E. Verweij, E. Kolwijck, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Nijmegen. Correspondentieadres: N.M. Hanemaaijer, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen, tel.: +31-24-3614356, e-mail: nicolien.hanemaaijer@radboudumc.nl

gebruik van antibiotica leidt tot overgroei van *Candida* op de huid en mucosa. Invasieve procedures zoals katheters en operaties scheppen in combinatie met de afgenomen afweer bij bijvoorbeeld neutropenie of een opname op de intensivereafdeling de mogelijkheid tot lokale invasie en candidemie.⁵

Op veel Nederlandse intensivereafdelingen wordt selectieve darmdecontaminatie (SDD) toegepast, die onder andere bestaat uit amfotericine B, gericht op dekolonisatie van gisten. SDD zorgde voor een afname van de koloniatiegraad met *Candida* van 45 naar 10 procent en een afname van de incidentie van invasieve candida-infecties van 8 tot 3 procent.⁷ Er werd geen significante daling gezien van het percentage candidemiën.

Belang vroege start therapie

De aan candida-infecties toe te schrijven mortaliteit is 40 procent.⁸ Vertraging in de start van antifungale therapie is een belangrijke factor in de klinische uitkomst. Het belang van een vroege start van de therapie voor invasieve candidiasis is uitgebreid aangetoond. Onderzoek van Morrel et al. liet zien dat een vertraging van 12 uur na de afname van de bloedkweek geassocieerd was met een toename van de mortaliteit van 11 procent naar 33 procent.⁹ In een ander onderzoek was de letaliteit 15 procent indien er gestart werd met antifungale therapie op dezelfde dag als de bloedkweek werd afgenomen. Deze nam toe tot 24 procent na 1 dag, tot 37 procent na 2 dagen en tot 41 procent indien de therapie na 3 dagen werd gestart.¹⁰ Een derde onderzoek toonde dat de incubatieperiode van de bloedkweek voorspellend was voor de mortaliteit, met een toename van 1,025 voor elk extra uur en een bijna verdubbelde kans op overlijden na 24 uur.¹¹ Het is dus erg belangrijk de diagnose invasieve candida-infectie zo spoedig mogelijk te stellen zodat vroegtijdig met adequate therapie kan worden gestart.

Diagnostiek

De gouden standaard voor de diagnose van invasieve candida-infecties is de bloedkweek. Deze wordt gemiddeld pas na enkele dagen positief. De tijdsduur tot positiviteit is bovendien afhankelijk van het species: bloedkweeken met *C. tropicalis* en *C. krusei* werden na één dag positief terwijl bloedkweeken met *C. albicans*, *C. glabrata* en *C. parapsilosis* gemiddeld pas na drie dagen positief werden.¹² Indien pas na drie dagen gestart wordt met antifungale therapie is er reeds een sterk verhoogd risico op overlijden.

Naast de lange tijd tot kweekpositiviteit, is ook de lage sensitiviteit van de bloedkweek een probleem. In obductie bewezen gevallen van candidemie was de bloedkweek antemortem positief bij 63 tot 83 procent van de patiënten.¹³ Bij patiënten met een 'deep-seated' infectie worden bloedkweeken in de minderheid van de patiënten positief, onder andere omdat er een subgroep

is met een deep-seated infectie zonder candidemie. De gouden standaard voor de diagnose van deep-seated candida-infectie is een positieve kweek van het geïnfecteerde weefsel. Ook hiervan is de sensitiviteit beperkt, onder andere vanwege kans op 'sampling error'. Bovendien zijn dit invasieve diagnostische procedures die vaak worden vermeden.¹⁴

Voor het aantonen van invasieve candida-infecties is er behoefte aan additionele, niet-invasieve detectiemethodes. Inmiddels zijn er testen voor verschillende biomarkers ontwikkeld, zoals 1-3- β -D-glucan (BDG). Een overzicht van deze testen is weergegeven in *figuur 1*. Daarnaast is het mogelijk om met een PCR de aanwezigheid van candida in bloed te onderzoeken.

Overzicht biomarkers

1-3- β -D-glucan

1-3- β -D-glucan (BDG) is een component van de celwand die in hoge concentratie in de meeste schimmels aanwezig is. Uitzonderingen zijn zygomyceten (geen BDG) en cryptococcon (lage hoeveelheid BDG). BDG kan in zeer kleine hoeveelheden (pg/ml) in het serum van patiënten met invasieve schimmelinfectie gedetecteerd worden. De test is gebaseerd op het vermogen van het glucanmolecuul om klontering te veroorzaken met de hemolymfe (lichaamsvloeistof) van de degenkrab.¹⁴ Schimmels die BDG in hun celwand hebben, activeren factor G: een serine protease aanwezig in de stollingscascade van de degenkrab. Deze reactie kan gemeten worden met behulp van colorimetrie of turbidimetrie. Serum-BDG is volgens diverse onderzoeken een geschikte biomarker voor de diagnostiek naar invasieve candida-infecties. Er zijn verschillende commerciële BDG-testen op de markt waarvan de meest gebruikte de Fungitell-test is (Associates of Cape Cod, Inc.). Deze test wordt inmiddels internationaal routinematig toegepast voor de diagnostiek van invasieve candida-infecties, maar ook voor de diagnostiek van invasieve aspergillose en pneumocytis-pneumonie (PCP). De door de fabrikant aanbevolen afkapwaarde is 80 pg/ml.

In een recente meta-analyse was de sensitiviteit van BDG 57 tot 97 procent en de specificiteit 56 tot 93 procent.¹⁵ Een overzicht van de belangrijkste onderzoeken bij niet-neutropene ic-patiënten is weergegeven in *tabel 1*. In deze populatie van met name chirurgische patiënten varieerde de sensitiviteit van 52 tot 93 procent en de specificiteit van 40 tot 94 procent. Een fout-positieve uitslag kan diverse oorzaken hebben. Laboratoriumgerelateerde oorzaken zijn het gebruik van glucan-gecontamineerde pipetten of glaswerk en overmatige manipulatie van het monster. Patiëntgerelateerde factoren zijn humane bloedproducten (albumine, immunoglobulinen, stollingsfactoren), hemodialyse, glucan-gecontamineerde gazen of andere materialen, bacteriëmie, antibiotica zoals amoxicilline-clavulaanzuur en ernstige mucositis.¹³

In de meeste onderzoeken wordt BDG twee tot drie keer per week ingezet als screeningstechniek. Een groot voordeel is dat hiermee een eerdere diagnose mogelijk is, gemiddeld met vijf dagen.¹⁶ Bovendien daalde het BDG bij therapie succes en nam het toe bij therapie falen waardoor het dus ingezet kan worden voor monitoring van de infectie. Vooral de negatief voorspellende waarde van BDG is hoog, dit maakt het een geschikte test om de diagnose invasieve candida-infectie te verwerpen (tabel 1).

De antifungale therapie zou bij een negatieve BDG dus gestaakt kunnen worden, wat leidt tot een aanzienlijke kostenbesparing.

Bij het gebruik van SDD op de intensivere afdeling is de kolonisatiegraad met *Candida* lager.⁷ Enkele onderzoeken beschrijven dat patiënten met multifocale *Candida*-kolonisatie zonder invasieve candida-infectie, vaker BDG-positief zijn.^{18,23} Er zijn ook onderzoeken die geen verschil hebben aangetoond.^{24,25} Indien patiënten

Tabel 1. Belangrijkste karakteristieken van onderzoeken die de BDG-test op serum hebben geëvalueerd voor de diagnose van invasieve candidiasis op de intensive-care afdeling

| Onderzoek | Jaar | Design | Cut-off BDG | Strategie | Aantal patiënten, setting | Type candida-infectie (aantal) | Sensitiviteit | Specificiteit | PVW | NVW |
|-------------------------|------|---------------|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|---------------|---------------|------------|------------|
| Presterl ¹⁷ | 2009 | Retrospectief | ≥40 pg/ml | 2x per week monitoring bij ≥ 7 dagen opname | 197, | Candidemie (11), IAC (11) | 52 procent | 76 procent | 46 procent | 80 procent |
| DelBono ¹⁸ | 2011 | Prospectief | ≥80 pg/ml | Enkele meting bij hoge verdenking invasieve candida | 152, | Candidemie, (53), possible candidemie (47) | 79 procent | 83 procent | 90 procent | 67 procent |
| Posteraro ¹⁹ | 2011 | Prospectief | ≥80 pg/ml | Enkele meting bij ontstaan sepsis | 95 | Candidemie, (13), mediastinitis (1) | 93 procent | 94 procent | 72 procent | 99 procent |
| Mohr ²⁰ | 2011 | Prospectief | ≥80 pg/ml | 2x per week monitoring bij ≥ 3 dagen opname | 57 | Candidemie, (3), probable candidemie (6) | 91 procent | 57 procent | - | - |
| Leon ²² | 2012 | Prospectief | ≥259 pg/ml | Op dag 3, daarna 2x per week monitoring bij patiënten met ernstige abdominale problemen | 176 | Candidemie (7), IAC (23) candidemie en IAC (1) | 52 procent | 87 procent | 59 procent | 83 procent |
| Tissot ¹⁶ | 2013 | Prospectief | ≥80 pg/ml | Bij inclusie en 3x per week bij patiënten na abdominale chirurgie of acute pancreatitis | 89 | IAC (29) | 83 procent | 40 procent | 49 procent | 77 procent |
| Fortun ²¹ | 2014 | Prospectief | ≥80 pg/ml | Op dag 0 van start antifungale therapie bij hoge verdenking invasieve candidiasis en op dag 7 van therapie | 63 | Candidemie (21), deep-seated (6) | 81 procent | 83 procent | 63 procent | 93 procent |

IAC: intra abdominale candida, PVW: positief voorspellende waarde, NVW: negatief voorspellende waarde

met *Candida*-kolonisatie inderdaad vaker BDG-positief zijn, zou dit een belangrijke invloed kunnen hebben op de specificiteit en positief voorspellende waarde van deze test indien uitgevoerd in een SDD-populatie. Hierover is echter nog niets bekend. Daarnaast is bij deze populatie BDG testen op indicatie mogelijk een betere strategie dan twee tot drie keer per week screenen, aangezien de incidentie van invasieve candida-infecties op de Nederlandse intensievecareafdelingen waarschijnlijk lager is door het gebruik van SDD.⁷ Onderzoek naar de toepassing van BDG in de Nederlandse situatie is dus gewenst.

Candida-antigeen en Candida-antistoffen

Mannoproteïne (mannan) is een polysacharide die gebonden is aan de celwand van een schimmel. *Candida* anti-mannan antistoffen en *Candida*-antigeen kunnen worden aangetoond bij een invasieve candida-infectie. Mannan komt voor in lage hoeveelheden en wordt snel uit het bloed geklaard.²⁶ De meest gebruikte test is de gecombineerde mannan-antigeen/anti-mannan antistoffen ELISA (Platelia, Bio-Rad). Tot nu toe zijn onderzoeken vooral verricht bij oncologische en/of hematologische patiënten. Een meta-analyse uit 2010 met 50 procent van de geïncludeerde onderzoeken bij niet-neutropene patiënten toonde een sensitiviteit van 58 procent en specificiteit van 93 procent voor mannan-antigeen en een sensitiviteit van 59 procent en specificiteit van 83 procent voor anti-mannan antistoffen.²⁷ Het combineren van de bepalingen leidde tot een sensitiviteit van 83 procent en een specificiteit van 86 procent. Bij neutropene patiënten na chemotherapie of stamceltransplantatie is aangetoond dat anti-mannan antistoffen voorafgaand aan de microbiologische diagnose van invasieve candidiasis kunnen worden gedetecteerd.²⁸ Of dit voor niet-neutropene (ic-)patiënten ook geldt, is niet bekend.

Candida albicans kiembuis-specifiek antilichaam

Candida albicans germ tube-specific antibody (CAGTA) is een indirecte immunofluorescentietest die antimycelium-antilichaam tegen verschillende *Candida*-species detecteert. Bij de commercieel verkrijgbare test wordt een titerwaarde van $\geq 1/160$ als afkapwaarde gebruikt (*Candida albicans* IFA IgG, Vircell® kit assay).²⁹ De titers bij *Candida*-species zijn, anders dan *C. albicans*, lager. Met deze biomarker is minder ervaring dan met BDG en mannan/anti-mannan. Bij neutropene patiënten worden gemiddeld lagere titers gevonden, een verschil in gevoeligheid van de test bij deze patiëntengroep wordt niet in de literatuur beschreven.³⁰ In een onderzoek uit 2009 bij 53 ic-patiënten had 41,5 procent van de patiënten een positieve test.³¹ Er werd geen verschil gezien in het percentage hoog-gekoloniseerde patiënten in de positieve CAGTA en in de negatieve CAGTA-groep. Alle patiënten in deze onderzoek met een positieve CAGTA werden geclassificeerd als waarschijnlijk

invasieve candidiasis, echter geen van deze patiënten had een positieve bloedkweek met *Candida*. Een uitspraak over de sensitiviteit en specificiteit van deze test is bij deze groep patiënten dus niet te doen.

In een tweede onderzoek bij 176 ic-patiënten met ernstige abdominale problemen werden er 31 geclassificeerd als invasieve candidiasis, 84 als *Candida*-kolonisatie en waren er 61 patiënten noch gekoloniseerd noch geïnfecteerd.²² Het maximale percentage patiënten dat een positieve CAGTA-titer had bij deze drie groepen was respectievelijk 71,0 procent, 41,7 procent en 39,3 procent. De sensitiviteit en specificiteit in dit onderzoek waren 71,0 procent en 57,3 procent. Een laatste onderzoek bij 71 ic-patiënten toonde ook een met name lage specificiteit (56,5 procent) en positief voorspellende waarde, doordat ook gezonde vrijwilligers vaak (47,5 procent) CAGTA-positief waren.²¹

Combinatie van biomarkers

Om de diagnostiek van invasieve candidiasis te optimaliseren wordt in enkele onderzoeken gebruik gemaakt van een combinatie van bovenstaande biomarkers. Een retrospectief onderzoek op het serum van 31 patiënten met een candidemie waar zowel CAGTA, mannan/anti-mannan als BDG werden bepaald, liet een beperkte sensitiviteit zien van de afzonderlijke biomarkers van 58 tot 84 procent.³² Bij het combineren van CAGTA en BDG nam de sensitiviteit toe tot 96,8 procent, met een specificiteit van 84 procent. De negatief voorspellende waarde van de combinatie CAGTA en BDG was met 97,7 procent erg hoog, hoewel hierbij opgemerkt moet worden dat de negatief voorspellende waarde van BDG (in een populatie met een prevalentie van 5 procent) alleen ook al hoog was (meer dan 90 procent).

Een tweede retrospectief onderzoek bij patiënten met candidemie toonde een sensitiviteit van 89,3 procent en specificiteit van 85 procent voor de combinatie van BDG en mannan.³³ Ook bij deze combinatie was de negatief voorspellende waarde erg hoog (99 procent).

Een derde prospectief onderzoek onder 176 ic-patiënten met abdominale problematiek toonde ook een hoge sensitiviteit (90,3 procent) en hoge negatief voorspellende waarde (93,9 procent) bij het combineren van BDG en CAGTA.²² In dit onderzoek werd er een hogere afkapwaarde voor BDG gebruikt van 259 pg/ml.

Er is dus momenteel slechts beperkte informatie beschikbaar over de mogelijkheden van het combineren van biomarkers. Op basis van deze enkele onderzoeken lijkt het combineren van verschillende biomarkers een interessante mogelijkheid met name gezien de hogere sensitiviteit en de hoge negatief voorspellende waarde.

PCR Candida

Er zijn de afgelopen jaren diverse onderzoeken gepubliceerd naar het gebruik van moleculaire detectiemethoden

Figuur 1. Overzicht biomarkers voor invasieve schimmelinfecties.

| | MnAg/Al | GM | CRAg | BDG | PCR |
|------------------------------|--------------|----------------------|-------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Candida</i> | ● | ● | ● | ● | ● |
| <i>Aspergillus</i> | ● | ● | ● | ● | ● |
| <i>Fusarium</i> | ● | ● | ● | ● | ● |
| <i>Rhizopus</i> | ● | ● | ● | ● | ● |
| <i>Cryptococcus</i> | ● | ● | ● | ● | ● |
| <i>Pneumocystis</i> | ● | ● | ● | ● | ● |
| Te gebruiken monsters | Serum | Serum BAL | Serum Liquor | Serum | Volbloed Serum BAL |

MnAg/Ab: mannan antigeen/anti-mannan antistoffen, GM: galactomannan, CRAg: cryptococcen antigeen, BDG: 1-3-β-D-glucan, BAL: bronchoalveolaire lavage

voor de diagnostiek van invasieve candida-infecties. Hierbij is gebruik gemaakt van verschillende platforms, diverse targets (5.8S, 18S, 28S, ITS-genen) en verschillend patiëntmateriaal (serum, plasma, volbloed). Onder andere vanwege deze diversiteit en het gebrek aan externe validatie was er onvoldoende bewijs om het gebruik van PCR in de diagnostiek van invasieve candida-infecties aan te bevelen in de huidige ESCMID-richtlijn.³⁴ Een meta-analyse uit 2011 met 54 geïncludeerde onderzoeken bij in totaal 4894 patiënten, waaronder 963 patiënten met proven/probable of possible invasieve candidiasis, toonde een sensitiviteit van 95 procent en een specificiteit van 92 procent.³⁵ Het percentage PCR-positieven onder patiënten met proven en probable invasieve candidiasis was 85 procent (79-91 procent), terwijl van deze groep slechts 38 procent een positieve bloedkweek had. In een recente onderzoek onder ic-patiënten waren de sensitiviteit en specificiteit respectievelijk 96 en 97 procent.²¹ Met name bij patiënten met een deep-seated candida-infectie was de PCR veel vaker (91 procent) positief dan de bloedkweek (45 procent). Naast een hogere sensitiviteit dan de bloedkweek heeft de PCR als tweede voordeel dat een snellere diagnose mogelijk is. Zo kon binnen zes uur na het ontstaan van sepsis al gestart worden met gerichte antifungale therapie.³⁶ Verder is in diverse onderzoeken beschreven dat de PCR één tot vier dagen eerder positief was dan de bloedkweek, waaronder één onderzoek dat beschreef dat er met behulp van PCR-mediaan drie dagen eerder gestart werd met antifungale therapie.³⁵ Het gebruik van PCR in de diagnostiek van invasieve candidiasis is dus veelbelovend.

Conclusie

De diagnostiek van invasieve candidiasis is complex, vooral door de lage sensitiviteit van de bloedkweek en

de lange duur tot het positief worden ervan. Een snelle diagnose is gewenst, omdat elke vertraging in de start van antifungale therapie leidt tot een slechtere klinische uitkomst. Biomarkers en in het bijzonder BDG kunnen bijdragen aan een verbetering van de diagnostiek. Met het gebruik van BDG als screeningstechniek kan de diagnose invasieve candidiasis in een hoog-risico populatie eerder gesteld of juist verworpen worden. Over de toepassing van BDG in een SDD-populatie is echter nog niets bekend. Daarnaast lijkt het uitvoeren van een *Candida*-PCR op bloed veelbelovend, met name bij patiënten met een deep-seated candida-infectie.

Referenties

- Lortholary O, Renaudat C, Sitbon K, Madec Y, Denoed-Ndam L, Wolff M, et al. Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010). *Intensive Care Med* 2014;40:1303-12.
- Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 2010;16:445-52.
- León C, Ostrosky-Zeichner L, Schuster M. What's new in the clinical and diagnostic management of invasive candidiasis in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2014;40:808-19.
- Bassetti M, Marchetti M, Chakrabarti A, Colizza S, Garnacho-Montero J, Kett DH, et al. A research agenda on the management of intra-abdominal candidiasis: results from a consensus of multinational experts. *Intensive Care Med* 2013;39:2092-106.
- Eggmann P, Bille J, Marchetti O. Diagnosis of invasive candidiasis in the ICU. *Ann Intensive Care* 2011;1:37.
- Verduyn Lunel F, Koeleman JG, Spanjaard L, Vandenbroucke-Grauls C, Schultz C, Verbrugh HA, et al. Trends in fungaemia and antifungal susceptibility in the Netherlands. *Neth J Med* 2006;64:236-42.
- Van Till JO, van Ruler O, Lamme B, Weber RJ, Reitsma JB, Boermeester MA. Single-drug therapy or selective decontamination of the digestive tract as antifungal prophylaxis in critically ill patients: a systematic review. *Crit Care* 2007;11:R126.
- Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, et al. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis* 2014;20:1149-55.
- Morrell M, Fraser V, Kollef M. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3640-5.
- Garey KW, Rege M, Pai MP, Mingo DE, Suda KJ, Turpin RS, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clin Infect Dis* 2006;43:25-31.
- Taur Y, Cohen N, Dubnow S, Paskovaty A, Seo SK. Effect of antifungal therapy timing on mortality in cancer patients with candidemia. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:184-190.
- Arendrup MC, Sulim S, Holm A, Nielsen L, Nielsen SD, Knudsen JD, et al. Diagnostic issues, clinical characteristics, and outcomes for patients with fungemia. *J Clin Microbiol* 2011;49:3300-8.
- Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the "missing 50 percent" of invasive candidiasis: how non-culture diagnostics will improve understanding of disease spectrum and transform patient care. *Clin Infect Dis* 2013;56:1284-92.
- Miyazaki T, Kohno S, Mitsutake K, Maesaki S, Tanaka K, Hara K. (1->3)-beta-D-glucan in culture fluid of fungi activates factor G, a limulus coagulation factor. *J Clin Lab Anal* 1995;9:334-9.
- Karageorgopoulos D, Vouloumanou E, Ntziora F, Michalopoulos A, Rafailidis P, and Falagas M. beta-D-glucan assay for the diagnosis of invasive fungal infections: a meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2011;52:750-70.

16. Tissot F, Lamoth F, Hauser P, Orasch C, Fluckiger U, Siegemund M, et al. Betaglucan antigenemia anticipates diagnosis of blood culture-negative intraabdominal candidiasis. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1100-9.
17. Presterl E, Parschalk B, Bauer E, Lassnigg A, Hajdu S, Graninger W. Invasive fungal infections and (1,3)-beta-D-glucan serum concentrations in long-term intensive care patients. *Int J Infect Dis* 2009;13:707-12.
18. DelBono V, Delfino E, Furfaro E, Mikulska M, Nicco E, Bruzzi P, et al. Clinical performance of the (1,3)-b-D-glucan assay in early diagnosis of nosocomial *Candida* bloodstream infections. *Clin Vaccine Immuno* 2011;18:2113-7.
19. Posteraro B, De Pascale G, Tumbarello M, Torelli R, Pennisi MA, Bello G, et al. Early diagnosis of candidemia in intensive care unit patients with sepsis: a prospective comparison of (1,3)-beta-D-glucan assay, *Candida* score, and colonization index. *Crit Care* 2011;15:R249.
20. Mohr J, Sims C, Paetznick V, Rodriguez J, Finkelman M, Rex J, et al. Prospective survey of (1->3)-beta-D-glucan and its relationship to invasive candidiasis in the surgical intensive care unit setting. *J Clin Microbiol* 2011;49: 58-61.
21. Fortun J, Meije Y, Buitrago M, Gago S, Bernal-Martinez L, Peman J, et al. Clinical validation of a multiplex real-time PCR assay for detection of invasive candidiasis in intensive care unit patients. *J Antimicrob Chemother* 2014;69:3134-41.
22. León C, Ruiz-Santana S, Saavedra P, Castro C, Ubeda A, Loza A, et al. Value of β -D-glucan and *Candida albicans* germ tube antibody for discriminating between *Candida* colonization and invasive candidiasis in patients with severe abdominal conditions. *Intensive Care Med* 2012;38:1315-25.
23. Senn L, Robinson JO, Schmidt S, Knaup M, Asahi N, Satomura S, et al. 1,3-Beta-D-glucan antigenemia for early diagnosis of invasive fungal infections in neutropenic patients with acute leukemia. *Clin Infect Dis* 2008;46:878-85.
24. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, et al. Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Clin Infect Dis* 2004;39:199-205.
25. Obayashi T, Yoshida M, Mori T, Goto H, Yasuoka A, Iwasaki H, et al. Plasma (1->3)-beta-D-glucan measurement in diagnosis of invasive deep mycosis and fungal febrile episodes. *Lancet* 1995;345:17-20.
26. Alexander BD. Diagnosis of fungal infection: new technologies for the mycology laboratory. *Transpl Infect Dis* 2002;4:32-7.
27. Mikulska M, Calandra T, Sanguinetti M, Poulain D, Viscoli C. The use of mannan antigen and anti-mannan antibodies in the diagnosis of invasive candidiasis: recommendations from the Third European Conference on Infections in Leukemia. *Crit Care* 2010; 14:R222.
28. Verduyn Lunel FM, Donnelly JP, van der Lee HA, Blijlevens NM, Verweij PE. Circulating *Candida*-specific anti-mannan antibodies precede invasive candidiasis in patients undergoing myelo-ablative chemotherapy. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:380-6.
29. Moragues MD, Ortiz N, Iruretagoyena JR, García-Ruiz JC, Amutio E, Rojas A, et al. Evaluation of a new commercial test (*Candida albicans* IFA IgG) for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22:83-8.
30. Quindós G, Pontón J, Cisterna R, Mackenzie DW. Value of detection of antibodies to *Candida albicans* germ tube in the diagnosis of systemic candidosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:178-183.
31. Zaragoza R, Pemán J, Quindós G, Iruretagoyena JR, Cuétara MS, Ramírez P, et al. Clinical significance of the detection of *Candida albicans* germ tube-specific antibodies in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:592-5.
32. Martínez-Jiménez MC, Muñoz P, Valerio M, Alonso R, Martos C, Guinea J, et al. *Candida* biomarkers in patients with candidaemia and bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2015 Apr 21. [Epub ahead of print]
33. Held J, Kohlberger I, Rappold E, Busse Grawitz A, Häcker G. Comparison of (1->3)- β -D-glucan, mannan/anti-mannan antibodies, and Cand-Tec *Candida* antigen as serum biomarkers for candidemia. *J Clin Microbiol* 2013;51:1158-64.
34. Cuenca-Estrella M, Verweij PE, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, Bille J, Donnelly JP, et al. ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: diagnostic procedures. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:9-18.
35. Avni T, Leibovici L, Paul M. PCR diagnosis of invasive candidiasis: systematic review and meta-analysis. *J Clin Microbiol* 2011;49:665-70.
36. McMullan R, Metwally L, Coyle PV, Hedderwick S, McCloskey B, O'Neill HJ, et al. A prospective clinical trial of a real-time polymerase chain reaction assay for the diagnosis of candidemia in nonneutropenic, critically ill adults. *Clin Infect Dis* 2008 15;46:890-6.

Opkomende opportunistische Fusarium-infecties en azolen

A.D. van Diepeningen, W.J. Bartstra

Samenvatting

Het aantal infecties veroorzaakt door de filamenteuze schimmel *Fusarium* neemt wereldwijd toe. Oppervlakkige infecties zoals onychomycose, paronychia en keratitis komen algemeen voor, terwijl *Fusarium* bij immunogecompromitteerde patiënten invasieve infecties veroorzaakt. Vooral leukemiepatiënten zijn vatbaar voor de vaak letale gedissemineerde infecties. Leden van een zestal soortcomplexen binnen het genus *Fusarium* zijn verantwoordelijk voor de meeste humane infecties. Morfologisch zijn zij vaak moeilijk te onderscheiden tot op het niveau van de soort. De aanbevolen antimycotica voor de systemische infecties amfotericine B en voriconazol blijken effectief bij 60 tot 80 procent van de behandelde patiënten, maar aangezien soorten verschillen in hun gevoeligheid is determinatie tot op niveau van de soort te verkiezen. Verschillende azolen blijken effectief in de bestrijding van *Fusarium* in de kliniek en in de land- en tuinbouw, maar *Fusarium* heeft van nature hoge MRC-waarden van 4 µg/ml en hoger. Reden voor deze hoge MRC's lijkt het uitzonderlijke feit dat *Fusarium* over drie kopieën van het cytochrom P450 lanosterol 14alpha-demethylase, het aangrijpings-molecuul van de azool-antimycotica, blijkt te beschikken. Een daarvan wordt altijd tot expressie gebracht in de cel, een tweede wordt geïnduceerd door aanwezige azolen. Daarnaast blijkt *Fusarium* effectief om azolen en andere antimycotica buiten hun cel te houden.

Trefwoorden

Fusarium, fusariosis, leukemie, azoolresistentie, CYP51 cytochrom P450 lanosterol 14alpha-demethylase

Abstract

Infections caused by members of the filamentous fungal genus *Fusarium* are emerging worldwide. The observed superficial fusariosis are onychomycosis, paronychia and keratitis, while in immunocompromised patients systemic infections occur. Especially leukemic patients suffer from disseminated infections with a high mortality. Members of six *Fusarium* species complexes cause the majority of the human infections, but they are morphologically difficult to determine to species level. While the recommended drugs

for systemic infections amphotericin B and voriconazole are effective in 60 to 80 percent of patients, species vary in susceptibility to available antifungals and we advise species-level identification. Some compounds of the azole-family are among the few antifungal drugs effective for treatment of *Fusarium* in both clinical and agricultural settings, but *Fusarium* has high MICs – 4 µg/ml and higher – to many of them. Reason for this high MICs seems the presence of three cytochrome P450 lanosterol 14alpha-demethylase (the target of the azole compounds) orthologs in the *Fusarium* genome, one of which constitutively expressed, another induced by azoles. Besides, *Fusarium* has an effective mechanism to remove azoles and other xenobiotics from its cells.

Fusariosis

Veel soorten binnen het grote genus *Fusarium* zijn berucht als plantenziekten en als producenten van mycotoxines, gevormd tijdens de groei van het gewas of tijdens de opslag van besmette voedingsproducten. Daarnaast is er de laatste jaren een grote toename van het aantal door *Fusarium* veroorzaakte infecties in mens en dier. Deze toename is toe te schrijven aan de betere detectie van *Fusarium*-soorten, maar ook aan een toename in aantallen (potentiële) patiënten en in werkelijke aantallen infecties.¹ Humane infecties veroorzaakt door *Fusarium* of fusariosis zijn onder te delen in twee hoofdklassen, namelijk oppervlakkige infecties en systemische infecties, die vooral bij immunogecompromitteerde patiënten voorkomen.^{1,2} Bij gezonde personen komt door *Fusarium* veroorzaakte onychomycose voor. In Europa heeft afhankelijk van leeftijd en andere factoren tussen de 5 en 15 procent van zowel gezonde mannen als vrouwen last van onychomycose, terwijl tot wel 10 procent van deze infecties door *Fusarium* blijkt te worden veroorzaakt.³ Dermatomyose en onychomycose door *Fusarium* gaan vaak samen.^{1,2} Keratitis

A.D. van Diepeningen, W.J. Bartstra, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht.
Correspondentieadres: A.D. van Diepeningen, tel.: 030-2122900, fax 030-2512097, e-mail: a.diepeningen@cbs.knaw.nl

en dieper gelegen oogontstekingen door *Fusarium* komen veelvuldig voor in warme, droge klimaten en zijn daar vaak geassocieerd met trauma in het oog door grond of plantmateriaal.^{1,2} In India gaat dit om enige honderdduizenden infecties per jaar, waarbij *Fusarium* en *Aspergillus* de meest frequente veroorzakers zijn.¹ In de westerse wereld neemt de incidentie van *Fusarium*-keratitis toe, ook in Nederland. Dit wordt vaak geassocieerd met het dragen van contactlenzen en slechte lenshygiëne.^{4,5}

Bij patiënten met een immuundeficiëntie na bijvoorbeeld cytotoxische chemotherapie, orgaantransplantatie, verschillende maligniteiten of anderszins komen systemische infecties voor.^{1,2} Ook bij brandwonden komt infectie door *Fusarium* geregeld voor.⁶ Vooral bij leukemiepatiënten komt gedissemineerde fusariosis voor, waarbij de schimmel vaak geïsoleerd kan worden uit bloedkweken.^{1,2} Bronnen van infectie kunnen een trauma zijn, een associatie met water, maar ook de al eerder genoemde nagel- en huidinfecties die daardoor een stuk minder onschuldig zijn.¹ Er zijn weinig gegevens over de incidentie van systemische en gedissemineerde infecties. Volgens een Italiaanse studie krijgt zo'n 0,06 tot 0,12 procent van de leukemiepatiënten een gedissemineerde infectie, waarvan 50 tot 70 procent letaal is.⁷ In een Braziliaanse studie onder 840 patiënten onder remissie van leukemie of na beenmergtransplantatie, bleek zelfs 3 procent van de patiënten te maken te krijgen met invasieve fusariosis. Naast leukemie en de behandeling daarvoor, zijn roken en hyperglycemie risicofactoren gebleken voor invasieve fusariosis.⁸

Fusarium

Verscheidende *Fusarium*-soorten veroorzaken opportunistische infecties bij de mens en we identificeren steeds meer soorten in het genus die dit kunnen.^{9,10} De meeste opportunisten maken deel uit van een zestal soortcomplexen.¹ Deze soortcomplexen zijn clusters van nauwverwante soorten die weinig tot geen morfologische verschillen vertonen en gerangschikt zijn rondom een bekende, naamgevende soort. Moleculairbiologische analyses laten zien dat sommige soortcomplexen uit tot wel 100 verschillende soorten kunnen bestaan. Zo is er bijvoorbeeld het *Fusarium solani*-soortcomplex dat naar *Fusarium solani* is genoemd, maar die uit meer dan 50 soorten blijkt te bestaan waaronder de humaan pathogenen *F. falciforme*, *F. lichenicola* en *F. solani sensu stricto*.

De meeste infecties worden wereldwijd veroorzaakt door leden van het *Fusarium solani*-soortcomplex, gevolgd door de *F. oxysporum*, *F. fujikuroi*, *F. dimerum*, *F. incarnatum-equiseti* en *F. Chlamydosporum*-soortcomplexen,^{1,11} maar lokale verschillen in dominante soorten komen voor.³ Vooral *F. fujikuroi*, *F. oxysporum* en *F. Solani*-soortcomplexleden zijn in Europa verantwoordelijk voor diepe plaatselijke en gedissemineerde infecties.^{12,13}

Volgens recente richtlijnen van de European Society for Clinical Microbiology en Infectious Diseases (ESCMID) en de European Confederation for Medical Mycology (ECMM), kunnen de diepe en gedissemineerde fusariosis het beste behandeld worden met amfotericine B en voriconazol.¹⁴ Behandeling blijkt echter slechts in 60 tot 80 procent van de infecties effectief¹⁵ en regelmatig worden er (meervoudig) resistente stammen gevonden.⁹ Posaconazol blijkt in sommige gevallen ook effectief.¹⁶ Voor keratitis kunnen dezelfde middelen gebruikt worden, al wordt in India vooral het topisch gebruik van natamycine aanbevolen¹⁷ dat in Nederland vooral in de voedingsmiddelenindustrie wordt gebruikt. Voor huid- en nagelinfecties door *Fusarium* lijkt terbinafine een geschikt alternatief (tabel 1).

Voor *Fusaria* bestaan er geen officiële breekpunten voor gevoeligheid, maar we nemen hier aan dat voor azolen concentraties van 4 tot 8 µg/ml de limiet is om resistentie te definiëren. *Fusarium*-isolaten van zowel klinische oorsprong als uit het milieu, hebben hoge MRC's tegen antimycotica en binnen soortcomplexen blijken soorten sterk in gevoeligheid van elkaar te kunnen verschillen (tabel 1). Bijvoorbeeld van de twee meest waargenomen soorten binnen het *F. Fujikuroi*-soortcomplex, *F. verticillioïdes* en *F. proliferatum*, blijkt de eerste lagere MRC's te hebben voor posaconazol en voriconazol, terwijl de tweede vaak hoge MRC's heeft. En voor amfotericine B is dit eerder andersom (tabel 1). Alternatieve middelen als de echinocandines, flucytosine en griseofulvine werken niet tegen *Fusarium*. Determinatie tot op soortniveau – dus dieper dan het nu vaak gebruikte soortcomplexniveau – kan helpen het juiste antimycoticum te kiezen, maar bij sommige soorten met een variabele susceptibiliteit zoals *F. falciforme* zullen MRC-testen belangrijk zijn. Een bekend probleem is dat in vitro MRC-bepalingen niet voorspellend hoeven te zijn voor de effectiviteit van een antimycoticum bij de patiënt en dat blijkt ook in sommige casuïstieken voor *Fusarium* te gelden. MRC-bepalingen worden sterk beïnvloed door de inoculumdichtheid en het tijdstip van aflezen. Ze worden gemeten aan sporen.¹⁸ Bij de patiënt is de farmacodynamiek bepalend voor lokale effectieve concentraties. Onduidelijk is welk stadium van de schimmelmycelium en/of spore bestreden moet worden.

Azoolresistentie in Fusarium

In de afgelopen decennia is het gebruik van azolen in zowel land- en tuinbouw als in de kliniek flink toegenomen. In onderzochte soorten als de humaan opportunistisch pathogeen *Aspergillus fumigatus* en de voor bananen pathogene *Mycosphaerella fijiensis* is de azoolresistentie toegenomen.^{19,20} Door de hoge fungicidendruk in het milieu, kan ook bij *Fusarium* de resistentie toenemen.

Tabel 1. Minimum remmende concentratie(MIC)/minimum effectieve concentratie (MEC)-waarden van de *Fusarium*-soorten, die de meeste fusariosis veroorzaken. De gegevens staan gerangschikt per soort of soortcomplex en per waarde wordt het aantal geteste stammen tussen haakjes gegeven.

| Type aangrijpingspunt | gemiddelde MIC/MEC of MIC/MECspreading (µg/ml) | | | | | | | | | |
|----------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------|-----------|---------------|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|---------------|------------|
| | Polyenen → ergosterol | Azolen → lanosterol 14 α-demethylase | | | | | Echinocandinen → 1,3-β-glucan synthase | Allylamines → squalene epoxidase | | |
| Soort (complex) | AMB | NAT | FLZ | ITZ | PSZ | VRZ | ANF | CSP | TBF | Referentie |
| <i>F. solani</i> SC: | | | | | | | | | | |
| <i>F. falciforme</i> | 1(4) | 4-16(2) | - | >8(4) | >8(2) | >4(2) | >16(2) | >16(2) | 1-2(2) | 2,28 |
| <i>F. petrophilum</i> | 0,25-2(5) | - | >64(5) | >64(5) | >16(5) | 8-16(5) | >16(5) | >16(5) | - | 2,13 |
| <i>F. keratoplasticum</i> | 2(2) | - | >64(2) | >64(2) | 0,12-16(2) | 2(2) | >16(2) | >16(2) | - | 2,13 |
| <i>F. solani</i> s.s. | 0,25-1(2) | - | >64(2) | >64(2) | >16(2) | 2-8(2) | >16(2) | >16(2) | - | 2,13,28 |
| <i>F. oxysporum</i> SC | 0,12-2(34) | - | >64(19) | 1-16(35) | 0,06-16(15) | 0,5-16(24) | - | >16(1) | 0,5-32(20) | 2,29 |
| <i>F. dimerum</i> SC | 1-2(14) | - | >64(5) | >64(12) | >32(8) | 2-8(9) | - | >16(2) | 0,125-2(7) | 2,31 |
| <i>F. incarnatum-equiseti</i> SC | 0,5-8(17) | - | >64(2) | 32(14) | 1-32(12) | 2-4(16) | - | - | 0,5-32(2) | 2,29 |
| <i>F. fujikuroi</i> SC: | | | | | | | | | | |
| <i>F. acutatum</i> | 1-8(7) | 4(7) | >64(7) | >16(7) | 1-2(7) | 2-8(7) | - | - | - | 30 |
| <i>F. ananatum</i> | 0,125-2(6) | 4(6) | >64(6) | >16(6) | 0,5-1(6) | 1-8(6) | - | - | - | 30 |
| <i>F. anthropilum</i> | 0,25-1(5) | 4(5) | >64(5) | >16(5) | 0,25-0,5(5) | 1-4(5) | - | - | - | 30 |
| <i>F. andiyazi</i> | 8(6) | 4(5) | 16->64(6) | 8->16(6) | 1(6) | 2(6) | 8(1) | 16(1) | - | 13,30 |
| <i>F. fujikuroi</i> | 0,25-1(7) | 4(7) | >64(7) | 16->64(7) | 1-2(7) | 2-8(7) | - | - | - | 30 |
| <i>F. napiforme</i> | 1-8(10) | 4(10) | >64(10) | >16(10) | 32(10) | 1-4(10) | - | - | 0,06-0,25(3) | 30,31 |
| <i>F. nygamai</i> | 2-8(14) | 4(14) | >64(14) | 32(14) | 32(14) | 4-8(14) | - | - | 0,125-2(7) | 30,31 |
| <i>F. polyphialidicum</i> | 4(1) | - | >64(1) | 8(1) | - | 8(1)- | - | - | 4-8(1) | 2 |
| <i>F. proliferatum</i> | 0,12-1(48) | 4(9) | >64(9) | >64(44) | 0,12-16(44) | 1-8(48) | >16(12) | >16(12) | 1-32(23) | 2,13,30 |
| <i>F. sacchari</i> | 1-2(14) | 4(9) | 64(9) | 16-32(14) | 2(14) | 2-4(14) | - | - | 0,125-0,25(5) | 30,31 |
| <i>F. subglutinans</i> | 0,5-4(3) | 4(3) | >64(3) | >16(3) | 0,125-0,25(3) | 1-2(3) | - | - | - | 30 |
| <i>F. temperatum</i> | 0,5(1) | 4(1) | >64(1) | >16(1) | 0,25(1) | 1(1) | - | - | - | 30 |
| <i>F. thapsinum</i> | 1-4(6) | 4(6) | >64(6) | >16(6) | 2->16(6) | 1-4(6) | - | - | 0,25-0,5(5) | 2,29,30 |
| <i>F. verticillioides</i> | 2-4(57) | 0,5(11) | >64(11) | >64(44) | 0,25(50) | 1(57) | >16(3) | >16(3) | 0,125-32(37) | 2,13,30,31 |
| <i>F. chlamyosporum</i> | 0,8-6,25(1) | - | - | 32(8) | 0,5-32(8) | 1-4(8) | - | - | 0,125-1(8) | 2,31 |

AMB = amfotericine B, NAT = natamycine, FLZ = fluconazol, ITZ = itraconazol, PSZ = posaconazol, VRZ = voriconazole, ANF = anidulafungine, CSP = caspofungine, TBF = terbinafine. - = geen data

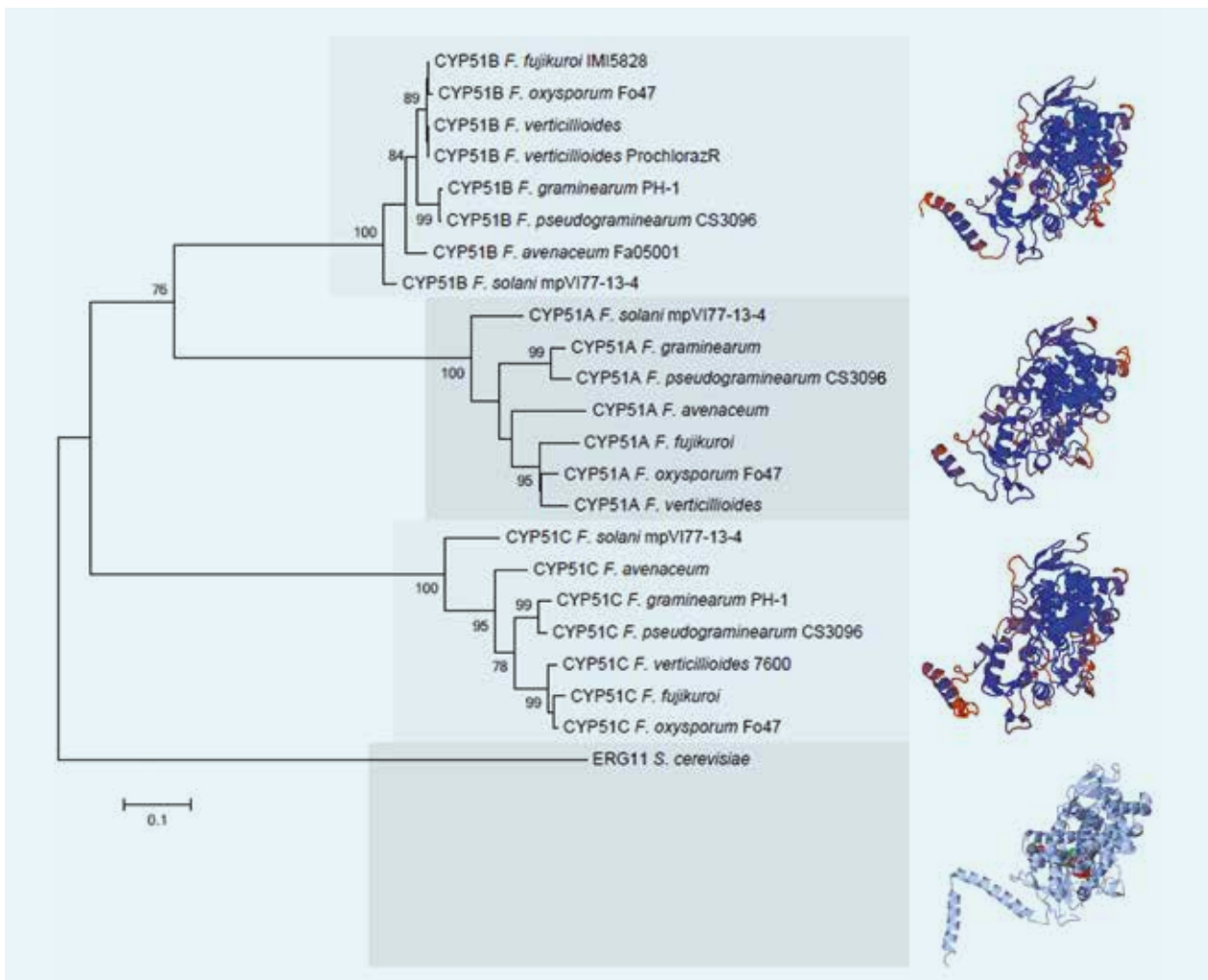
In vitro-gevoeligheidsbepalingen met isolaten uit de meer dan 100 jaar oude cultuurcollectie van het CBS van voor de ingebruikname van azool-antimycotica in het milieu, laten zien dat ook de oude fusaria al hoge MRC's hebben.²¹ De verhoogde azoolresistentie is bij *A. fumigatus* en *M. fujiensis* te herleiden naar mutaties in het gen voor het target-molecuul cytochroom P450 lanosterol 14alpha-demethylase (CYP51), of naar verhoogde expressie door duplicaties in de promotorregio van dat gen.^{19,20} Bij *Fusarium* kan de intrinsieke weerstand tegen azolen samenhangen met het feit dat het genus niet twee (zoals *Aspergillus*), maar zelfs drie verschillende kopieën van CYP51 bevat (figuur 1).

Het meeste onderzoek naar azoolresistentie bij *Fusarium* is gedaan bij *F. graminearum*. Dit is geen humaan pathogeen, maar pathogeen voor de meeste granen en producent van verschillende –vermoedelijk carcinogene

– trichothecenen-mycotoxines.²²⁻²⁴ Maar ook bij de andere fusaria waarvan van het genoom de volledige base-volgorde bekend is, lijkt de organisatie van de CYP51-genen hetzelfde: de drie orthologe genen worden bij *Fusarium* Cyp51A, Cyp51B en Cyp51C genoemd. Zowel Cyp51A en Cyp51B blijken werkzaam als lanosterol 14alpha-demethylase, terwijl Cyp51C een rol speelt bij de virulentie voor de gastheer: de 'waardplant'.²² Cyp51A is het gen dat het meest betrokken lijkt bij resistentie tegen verschillende triazolen en de expressie van dit gen wordt geïnduceerd door aanwezigheid van triazolen.²²⁻²⁴ Deletie van Cyp51A levert een grotere gevoeligheid op voor een aantal azolen. Ook deletie van Cyp51B leidt tot accumulatie van ergosterol-tussenproducten en blokkeert daarnaast de productie van de seksuele sporen.²²

Onder invloed van azolen worden ook verschillende effluxmechanismen aangeschakeld in *F. graminearum*.

Figuur 1. Maximum likelihood-gebaseerde fylogenetische boom op grond van de eiwitsequenties van de CYP51 genen. De boom is gebaseerd op 385 aminozuren en op de knooppunten zijn bootstrap-waarden van 1000 replica's weergegeven als >75 procent. Als outgroup is het ERG11-gen van *Saccharomyces cerevisiae* gebruikt. Bij ieder cluster van genen is een berekend (CYP genen, <http://swissmodel.expasy.org/>) of bekend (ERG11 van *S. cerevisiae*) eiwitmodel weergegeven, gebaseerd op de sequentie van *F. graminearum*.



ATP-bindende cassette (ABC)-transporters zijn eiwitten die energie in de vorm van ATP gebruiken om actief bepaalde stoffen over het membraan heen uit de cel transporteren. Door actief azolen buiten de cel te pompen, wordt de werking van deze stoffen verminderd.²³ Experimenten met het agrarische antimycoticum tebuconazol in sub-lethale concentraties laten zien dat van *F. graminearum* twee resistente fenotypen kunnen ontstaan, indicatief voor de verschillende mechanismen. Het eerste type ontstaat in 15 tot 19 procent van de resistente stammen en groeit vergelijkbaar met het oudertype, maar is resistent tegen het gebruikte azool en sommige andere azolen wat waarschijnlijk het gevolg is van mutaties in de CYP51-target. Het tweede type groeit trager dan het oudertype en met minder luchtmycelium, maar blijkt resistent tegen meer antifungale middelen – mogelijk door mutaties in efflux-mechanismes of verhoogde expressie.²⁵ Yin en collega's vonden echter in China geen aanwijzingen dat onder de azoolresistente stammen geïsoleerd uit graan mutaties in CYP51A of andere CYP-genen voorkomen.²⁶

In de landbouw wordt – met de toenemende resistentie van *Fusarium* en andere schimmels tegen azolen en antimycotica met een ander werkingsmechanisme die niet effectief blijken – druk gezocht naar alternatieven. Een van de alternatieven is het gebruik van plantensoorten die minder gevoelig zijn. Een ander alternatief is het modificeren van planten zodat ze minder gevoelig worden en ook daar blijken de voor de schimmel essentiële CYP51-genen een mogelijk target. In tarwe bijvoorbeeld werd door de gastheer geïnitieerde 'gen-silencing' van de verschillende CYP51-genen op basis van kleine interfererende siRNAs getest als een succesvol alternatief voor het gebruik van azolen.²⁷

Alle humaan pathogene *Fusarium*-complexen waar genomesequentie van bekend zijn, laten zien dat CYP51A, CYP51B en CYP51C altijd aanwezig zijn (figuur 1). In DNA- en aminozuursequenties van deze genen komen in de verschillende soorten, en soms zelfs binnen soorten, kleine variaties voor. Onderzoek naar de mate van resistentie voor de verschillende azolen en de variatie in de genen zal moeten uitwijzen of dit geschikte indices zijn om te voorspellen tegen welke antimycotica resistentie te verwachten is. Mutaties kunnen vergeleken worden met bestaande en berekende eiwitmodellen (figuur 1) en effecten op eiwitfunctie kunnen voorspeld worden.

Totdat we bruikbare markers beschikbaar hebben voor verschillende resistentievormen zal determinatie via multilocussequentie-analyse of andere methoden zoals MALDI-TOF, tot op soortniveau de beste voorspeller zijn voor de effectiviteit van antimycotica. Dit is vooral voor immuungecompromitteerde patiënten van belang en voor patiënten bij wie de empirische behandeling geen verbetering geeft. Voor soorten met grote variëteit in gevoeligheid voor bepaalde

antimycotica is het aan te bevelen MRC-testen uit te laten voeren.

Referenties

1. Van Diepeningen AD, Al-Hatmi AMS, Brankovics B, de Hoog GS. Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014? *Curr Clin Micro Rpt* 2014;1:10-8.
2. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. *Atlas of Clinical Fungi* 4th Ed., CD-ROM, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 2014.
3. Van Diepeningen AD, Feng P, Ahmed S, Sudhadham M, Bunyaratavej S, de Hoog GS. Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics. *Mycoses* 2015;58:48-57.
4. Collier SA, Gronostaj MP, MacGurn AK, Cope JR, Awsumb KL, Yoder JS, et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Estimated burden of keratitis--United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014;63:1027-30.
5. Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, et al. *Fusarium* Keratitis Investigation Team. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA* 2006;296:953-63.
6. Salah H, Al-Hatmi AM, Theelen B, Abukamar M, Hashim S, van Diepeningen AD, et al.
7. Phylogenetic diversity of human pathogenic *Fusarium* and emergence of uncommon virulent species. *J Infect* 2015;71:658-66.
8. Girmenia C, Pagano L, Corvatta L, Mele L, del Favero A, Martino P. The epidemiology of fusariosis in patients with haematological diseases. *Gimema Infection Programme. Br J Haematol* 2000;111:272-6.
9. Garnica M, da Cunha MO, Portugal R, Maiolino A, Colombo AL, Nucci M. Risk factors for invasive fusariosis in patients with acute myeloid leukemia and in hematopoietic cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2015;60:875-80.
10. Kebabcı N, van Diepeningen AD, Ener B, Ersal T, Meijer M, Al-Hatmi AM, et al. Fatal breakthrough infection with *Fusarium andiyazi*: new multi-resistant aetiological agent cross-reacting with *Aspergillus galactomannan* enzyme immunoassay. *Mycoses* 2014;57:249-55.
11. Al-Hatmi AM, Bonifaz A, de Hoog GS, Vazquez-Maya L, Garcia-Carmona K, Meis JF, et al. Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist. *BMC Infect Dis* 2014;14:588.
12. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *J Clin Microbiol* 2009;47:3851-61.
13. Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E, Bienvenu AL, et al. French Mycoses Study Group. International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:4446-50.
14. Dalyan Cilo B, Al-Hatmi AM, Seyedmousavi S, Rijs AJ, Verweij PE, Ener B, et al. Emergence of fusarioses in a university hospital in Turkey during a 20-year period. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:1683-91.
15. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group; European Confederation of Medical Mycology. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect* 2014;20S3:27-46.
16. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:695-704.
17. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, et al. Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:2983-5.
18. Sharma S, Das S, Virdi A, Fernandes M, Sahu SK, Kumar Koday N, et al. Re-appraisal of topical 1% voriconazole and 5% natamycin in the

- treatment of fungal keratitis in a randomised trial. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1190-5.
19. Wiederhold NP, Najvar LK, Bocanegra R, Graybill JR, Patterson TF. Efficacy of Posaconazole as Treatment and Prophylaxis against *Fusarium solani* Antimicrob Agents Chemother 2010;54:1055-9.
 20. Mellado E, Garcia-Effron G, Alcázar-Fuoli L, Melchers WJ, Verweij PE, Cuenca-Estrella M, et al. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of *cyp51A* alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1897-1904.
 21. Diaz-Trujillo C, Cordovez da Cunha, Chong P, Kema GJH, Arango-Isaza R, Guzman M, et al. Azole resistance is related to overexpression of the *CYP51* gene in *Mycosphaerella fijiensis*. In: Book of Abstracts EPS PhD Autumn School 'Host-Microbe Interactomics', 01-03 Nov. 2011, Wageningen, The Netherlands, p. 29-27.
 22. Ersal T, Al-Hatmi AS, Cilo BD, Curfs-Breuker I, Meis JF, Özkalemkaş F, et al.
 23. Fatal disseminated infection with *Fusarium petroliphilum*. *Mycopathologia* 2015;179:119-24.
 24. Fan J, Urban M, Parker JE, Brewer HC, Kelly SL, Hammond-Kosack KE, et al. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific *CYP51* function. *New Phytol* 2013;198:821-35.
 25. Becher R, Weihmann F, Deising HB, Wirsal SG. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics* 2011;12:52.
 26. Liu X, Yu F, Schnabel G, Wu J, Wang Z, Ma Z. Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genet Biol* 2011;48:113-23.
 27. Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsal SG. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology* 2010;100:444-53.
 28. Yin Y, Liu X, Li B, Ma Z. Characterization of sterol demethylation inhibitor-resistant isolates of *Fusarium asiaticum* and *F. graminearum* collected from wheat in China. *Phytopathology* 2009;99:487-97.
 29. Koch A, Kumar N, Weber L, Keller H, Imani J, Kogel KH. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 α -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:19324-9.
 30. O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, et al. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J Clin Microbiol* 2008;46:2477-90.
 31. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Mellado E, Rodríguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother* 2008;61:805-9.
 32. Al-Hatmi AM, van Diepeningen AD, Curfs-Breuker I, de Hoog GS, Meis JF. Specific antifungal susceptibility profiles of opportunists in the *Fusarium fujikuroi* complex. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:1068-71.
 33. Azor M, Gené J, Cano J, Manikandan P, Venkatapathy N, Guarro J. Less-frequent *Fusarium* species of clinical interest: correlation between morphological and molecular identification and antifungal susceptibility. *J Clin Microbiol* 2009;47:1463-8.

Identificatie van klinisch relevante gisten met behulp van MALDI-TOF MS

A. Kolecka, T. Boekhout

Samenvatting

MALDI-TOF MS (matrix-gesysteerd laserdesorptie ionisatie time-of-flight massaspectrometrie) heeft zich ontwikkeld tot een krachtig instrument voor de routine-identificatie van micro-organismen, zoals bacteriën, gisten en filamenteuze schimmels. In dit artikel geven wij een overzicht van het gebruik van deze techniek voor de identificatie van gisten, waaronder ook isolaten die resistent zijn voor veelgebruikte antischimmelmedicijnen. De kwaliteit van de identificaties hangt vooral af van de methode van monstervoorbereiding, het aantal referentiespectra in de databank en de gebruikte drempelwaarden. De zogenaamde directe methode waarbij het materiaal direct op de monsterplaatjes wordt aangebracht en alleen met de matrixsubstantie wordt bedekt, behoeft verdere verbetering. Initiële studies naar de toepassing van MALDI-TOF MS voor de identificatie van azoolresistentie bij gistisolaten zijn veelbelovend.

Trefwoorden

MALDI-TOF MS, gisten, identificatie, monstervoorbereiding

Abstract

Matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) became a robust tool for the routine identification of microorganisms, such as bacteria, yeasts and filamentous fungi. In this review we present an overview of the use of this technique for the identification of yeast isolates, including the determination of resistance to the most commonly used antifungal drugs. The quality of the identifications of yeasts depends mainly on the sample preparation method, the number of reference spectra in a database and the cut-off values used. The direct transfer method, in which the microbial material is placed directly on the target plate and covered by matrix, requires further optimization. Initial studies on the identification of azole resistance among yeasts by the technique are promising.

Inleiding

Snelle identificatie van gisten is belangrijk in de klinische microbiologie. Tot voor kort werden gistisolaten

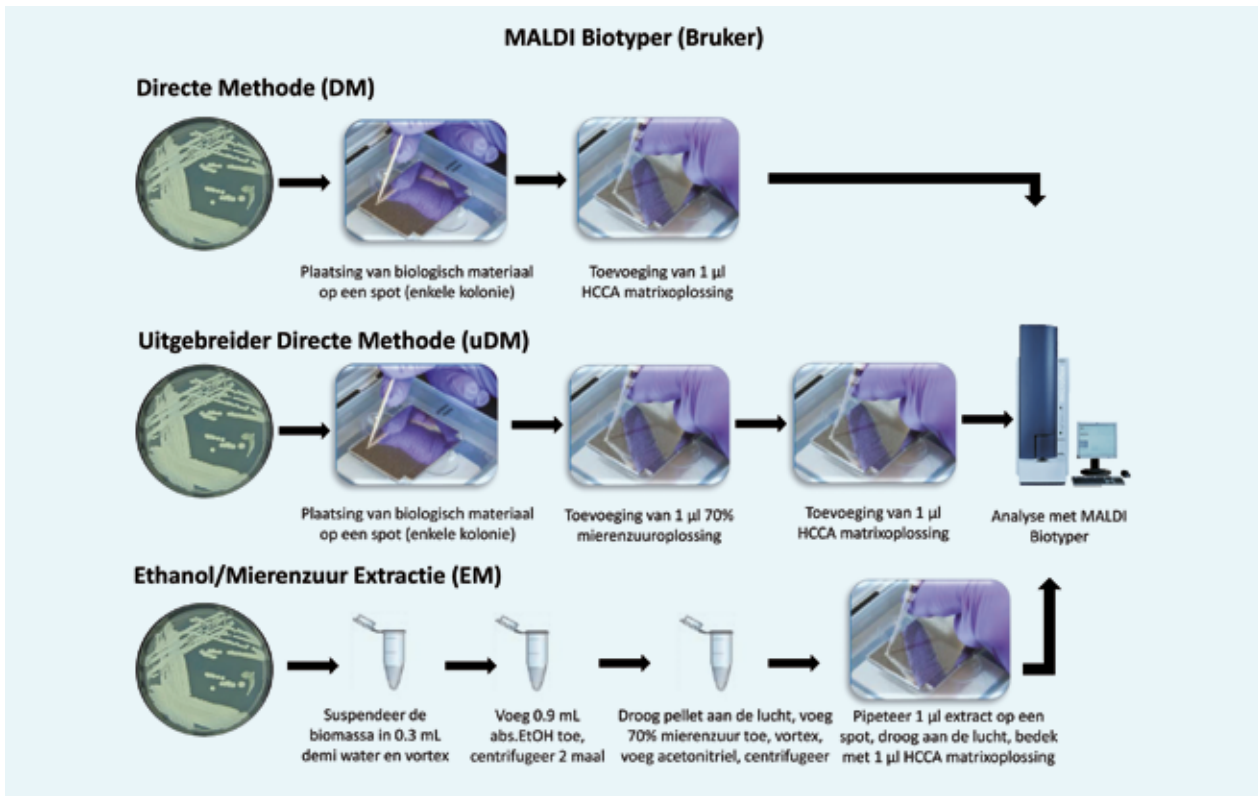
voornamelijk geïdentificeerd met behulp van fenotypische (onder andere auxanogrammen, chromogene media, API-AUX 20C, API-32C ID en VITEK-1 en -2 (bioMérieux, Frankrijk)) en DNA-gebaseerde methoden. Sequentieanalyse van delen van het ribosomale DNA (rDNA), zoals de D1/D2-domeinen van de grote subeenheid (LSU, 26S of 28S) van het rDNA en de intern getranscribeerde spacers 1 en 2 (ITS1/ITS2) (de zogenaamde moleculaire barcodes) heeft recentelijk de fenotypische identificatiemethoden grotendeels vervangen.^{1,2}

Toepassing van MALDI-TOF MS biedt nieuwe perspectieven voor de identificatie van klinisch relevante gisten.^{3,4,5,6} Sinds 1980 is de MALDI-TOF-techniek aanzienlijk verbeterd en de eerste commerciële instrumenten werden in de vroege jaren negentig geïntroduceerd.⁷ In eerste instantie werden deze instrumenten vooral gebruikt voor de identificatie van bacteriën.⁸ Na deze eerste successen heeft MALDI-TOF een ware revolutie in de microbiële identificatie veroorzaakt en wordt de techniek in veel laboratoria over de hele wereld toegepast. MALDI-TOF-machines worden door een aantal fabrikanten op de markt gebracht, waarbij de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Duitsland) marktleider is, gevolgd door de VITEK (bioMérieux, Frankrijk) (figuren 1-2). Een globale vergelijking van de apparaten van deze twee fabrikanten is gepresenteerd in tabel 1.

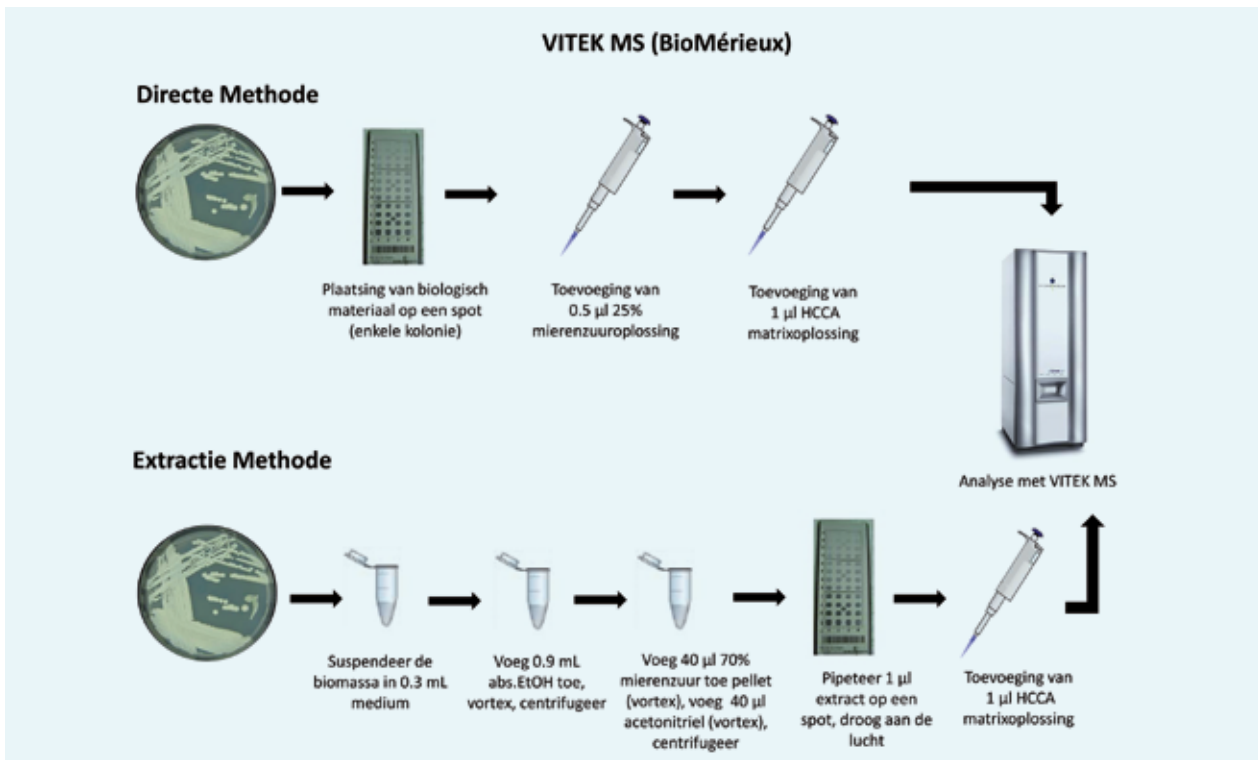
Identificatie van gistisolaten met behulp van MALDI-TOF wordt vooral toegepast in klinische laboratoria, maar ook in de voedingslaboratoria, instellingen voor kwaliteitscontrole, bio- en agro-industrie et cetera. In vergelijking met andere identificatiemethoden, zoals sequentieanalyse van delen van het rDNA, kan MALDI-TOF een betrouwbare identificatie van gisten geven in een relatief korte tijd. De betrouwbaarheid hangt uiteraard af van de technische reproduceerbaarheid en gevoeligheid, maar ook van de kwaliteit van de

A. Kolecka, T. Boekhout, CBS Fungal Biodiversity Centre (CBS-KNAW), Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht. Correspondentieadres: T. Boekhout, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, 3584 CT Utrecht, tel.: +31 (0)30-2122600, fax: +31 (0)30 2512097, e-mail: t.boekhout@cbs.knaw.nl

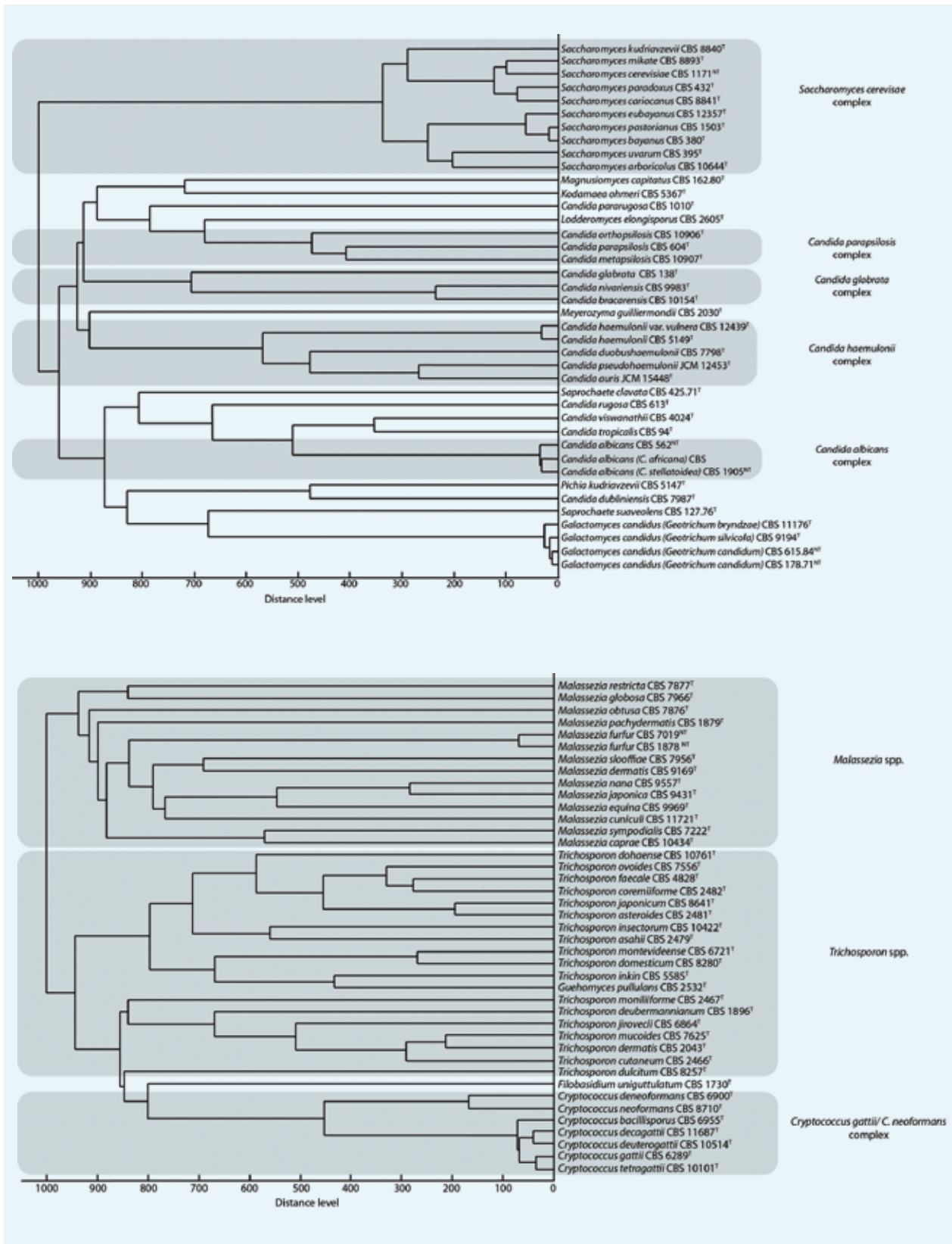
Figuur 1. De monstervoorbereiding voor de MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) met behulp van drie methoden. Directe methode (boven), uitgebreide directe methode (midden) en volledige extractie (onder). De foto's van de monstervoorbereiding zijn verkregen van www.bruker.com. De foto van de gistplaat is gemaakt op CBS.



Figuur 2. De monstervoorbereiding voor de VITEK-machine (bioMérieux). Directe methode voor bacteriën en gisten (boven) en de uitgebreidere extractiemethode voor filamenteuze schimmels (onder). De foto's van de monsterplaatjes en de VITEK MS-machine zijn verkregen van bioMérieux. De foto van de gistplaat is gemaakt op CBS.



Figuur 3. Dendrogrammen van Malditof gegenereerde patronen die laten zien dat verwante soorten van klinisch relevante gisten kunnen worden onderscheiden. Voorbeelden van de geslachten ascomycete gisten *Candida*, *Geotrichum* en *Saccharomyces* (A) en basidiomycete gisten van de geslachten *Cryptococcus*, *Trichosporon* en *Malassezia* (B). De dendrogrammen zijn gemaakt van MSPs ('main mass spectra') met MALDI Biotyper software versie 3.1 (Bruker Daltonics).
 † = Type stam; †† = Neotype stam.



Tabel 1. Vergelijking tussen de twee beschikbare commerciële Maldi-MS-systemen.

| | Maldi Biotyper (Bruker Daltonics, Germany) | VITEK MS (BioMérieux, France) |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Opwerkingsmethoden | DM, uDM, ethanol/mierenzuur extractie (EM) | DM, uDM, ethanol/mierenzuur extractie (EM) |
| Concentratie van gebruikt mierenzuur | 70 procent | 25 procent |
| Monsterplaat | Herbruikbaar; twee typen, ruw (ground steel), gepolijst (polished steel); 96 plaatsen | Wegwerp, één type, 48 plaatsen |
| Matrix | HCCA | HCCA |
| Positieve controle | BTS* | Verse <i>E. coli</i> -stam |
| Aantal referentiespectra in databank (maart 2015) | 5627 | 29873 |
| Aantal soorten in databank (bacteriën, gisten en filamenteuze schimmels) | >2200 | 751 |
| Aantal referentiespectra van gisten in databank; aantal soorten tussen haakjes | 574 (172) | 1266 (110)** |

* BTS: Bacterial Test Standard (commercieel verkrijgbaar en direct te gebruiken)

** Omvat zowel gisten als filamenteuze schimmels

databanken en de expertise van het laboratoriumpersoneel. Uit een onderzoek waaraan klinische laboratoria in België, Duitsland, Nederland, Oostenrijk en Spanje deelnamen blijkt dat de kwaliteit van de identificaties vooral afhangt van de monstervoorbereiding, het aantal beschikbare soorten en referentie-spectra in de databank, de gebruikte drempelwaarden die worden gehanteerd en de deskundigheid en vaardigheid van het laboratoriumpersoneel.⁹

Methoden

Voor de monstervoorbereiding worden voor de Maldi Biotyper (Bruker) drie methoden gebruikt (*figuur 1*): 1. de directe methode (DM), 2. de uitgebreide directe methode (uDM), en 3. een extractie met ethanol en mierenzuur (EM). In de DM-methode wordt een geringe hoeveelheid van het biologisch materiaal op een monsterplaatje gebracht en bedekt met matrixoplossing (meestal alpha-cyano-4-hydroxykaneelzuur). In de uDM wordt de biomassa eerst behandeld met 70 procent mierenzuur op het monsterplaatje alvorens dit wordt bedekt met matrixoplossing. In de EM-werkwijze wordt eerst een eiwitextractie uitgevoerd met ethanol en mierenzuur. Het extract wordt dan na het drogen aan de lucht overdekt met matrixoplossing en geanalyseerd. De monsterplaatjes van Bruker zijn na reiniging met 80 procent waterig trifluorazijnzuur weer klaar voor hergebruik, terwijl de bioMérieux-machine met een wegwerpsysteem werkt (*tabel 1*). Bij deze laatste machine zijn er twee vergelijkbare protocollen als boven beschreven in gebruik, namelijk een directe methode en een extractiemethode met ethanol en mierenzuur

(*figuur 2*). Ook hier wordt bij gebruik van de directe methode de biomassa direct aangebracht op het monsterplaatje en gelyseerd met 25 procent mierenzuur en na het drogen bedekt met matrix. In de directe extractiemethode wordt wat celmateriaal verzameld met een wattenstaafje en gesuspendeerd in steriel gedeïoniseerd water en absolute ethanol. Na centrifugeren wordt de pellet gesuspendeerd in 70 procent mierenzuur en acetonitril. Na opnieuw centrifugeren wordt een kleine hoeveelheid van het supernatant op het monsterplaatje gebracht, gedroogd en bedekt met matrix. Voor gisten kunnen alle drie de methoden worden gebruikt, terwijl voor filamenteuze fungi de EM-methode wordt aanbevolen (*figuur 2*). Overigens geldt dat de DM voor gisten zeer wisselende resultaten laat zien tussen laboratoria.⁹ In een vergelijkend onderzoek waarin de drie gebruikte methoden voor de Maldi Biotyper werden vergeleken voor een set van 35 giststammen, werden aanzienlijke verschillen tussen zowel de afzonderlijke methoden als de deelnemende laboratoria waargenomen: EM > uDM > DM.⁹ De grootste verschillen tussen de laboratoria deden zich voor bij gebruik van de DM. Enkele laboratoria scoorden meer dan 80 procent correcte identificatie met deze methode, terwijl dit percentage voor veel van de andere deelnemende laboratoria aanzienlijk lager was.⁹ Ook andere onderzoeken kwamen tot vergelijkbare conclusies, maar de meeste hiervan werden uitgevoerd in een enkel laboratorium en dat maakt een vergelijking tussen laboratoria moeilijker.^{5,11} Het percentage correcte identificaties varieerde tussen 16 en 21 procent bij DM tot meer dan 90 procent met de EM-extractiemethode.^{3,5,9,10,11}

Standaardisatie van de hoeveelheid biomassa en de manier waarop dit wordt opgebracht zijn van belang voor toepassing bij de DM. Mogelijk dat hierbij onderscheid gemaakt moet worden tussen droge, slijmerige, gistachtige of meer schimmelachtige groeiende gisten (en filamenteuze schimmels). Voor de identificatie van zwarte gisten lijkt de aanwezigheid van melanine een complicerende factor.¹²

Optimalisatie van de DM of uDM is van groot belang voor de kliniek omdat deze aanzienlijk sneller is dan het gebruik van de uitgebreide EM-extractiemethode. Bruker produceert een tweetal soorten monsterplaatjes, namelijk de gepolijste ('polished steel') en de 'ruwe' ('ground steel') variant. Deze laatste wordt door de fabrikant aanbevolen voor de DM en de uDM, terwijl de gepolijste plaatjes beter voor de EM-extractie kunnen worden gebruikt. In een recent onderzoek waaraan vijf ziekenhuizen deelnamen werd de bruikbaarheid van deze twee typen plaatjes vergeleken bij toepassing van de DM voor de identificatie van acht *Candida*-soorten.¹³ Voor de uDM werd geen verschil tussen beide plaatjes waargenomen, terwijl voor de DM de ruwe variant beter presteerde.¹³

Kweekmedia

In de kliniek worden gisten meestal op Sabouraud glucose-agar (SGA) gekweekt. De identificatie van kapselvormende cryptokokken gekweekt op media waarop kapselvorming geremd wordt (SGA + 0,5 NaCl), werd vergeleken met de identificatie na kweek op media waarop dit niet gebeurt (SGA). Voor de identificatie met Maldi-MS bleek dit geen effect te hebben en dus kan voor de kweek van cryptokokken SGA worden gebruikt.¹⁴ Voor de lipide-afhankelijke gist *Malassezia*, is gebruik van speciale media zoals 'modified Dixon's agar' (MDA) of 'modified Leeming & Norman agar' (MLNA) noodzakelijk. Voor deze gisten worden MDA-platen aanbevolen omdat op MLNA olieachtige residuen achterblijven waardoor het opgebrachte materiaal moeilijk te drogen is en er vlekken op de monsterplaatjes achterblijven.¹⁵ Voor de meer schimmelachtige groei van bijvoorbeeld *Trichosporon*- en *Geotrichum*-soorten kan groei op steriele filtratiemembranen van polycarbonaat (PCTE 76 mm grote diameter, 0,1 mm poriegrootte, GE Water & Process Technologies) voorkomen dat materiaal in de agar groeit waardoor dit moeilijk op de plaatjes is aan te brengen.¹⁶

Tijdens het identificatieproces met de Maldi-biotyper worden drempelwaarden met een log-scorewaarde gebruikt om de resultaten te beoordelen. Onderscheid wordt gemaakt tussen scores van meer dan 2,0 voor een betrouwbare soort identificatie, scores (1,7 tot 2,0) voor een betrouwbare genusidentificatie, scores minder dan 1,7 voor een onbetrouwbare identificatie en 'geen pieken gevonden' ('no peaks found', NPF) wat een technische fout inhoudt. Recentelijk zijn diverse onderzoeken gepubliceerd waarin

een score meer dan 1,7 als indicatie voor een betrouwbare soortidentificatie van gisten wordt gegeven.^{4,6,9,17,18} In de studie van Vlek et al. zijn geen foutpositieve identificaties met scores meer dan 1,7 waargenomen voor de onderzochte gistsoorten.⁹

Databank

Zoals eerder aangegeven staat of valt iedere identificatie met de kwaliteit van de gebruikte databank. De standaard Maldi Biotyper micro-database (BDAL, Bruker Daltonics) bevat 5627 spectra ('Main SPectra' of MSPs) van 380 geslachten met meer dan 2200 soorten (maart 2015). Hiervan zijn 649 MSP's van schimmels, waarvan 183 basidiomyceten en 464 ascomyceten, waaronder 399 van Saccharomycotina (lees: *Candida*-gisten en verwanten). In totaal zijn er 574 MSP's van zowel basidiomycete en ascomycete gisten aanwezig in de BDAL-database met 172 soorten behorende tot 28 geslachten. Een groter aantal beschikbare soorten in de databank evenals een groter aantal MSP's per soort gaf een toename van de correcte identificaties.^{4,9,11,15,16,19} Toevoeging van 510 referentiespectra van 447 stammen behorende tot 104 gistsoorten aan de BDAL-database gaf een stijging van 61,5 naar 86,8 procent juiste identificaties.⁹ Het aantal beschikbare MSP's bleek significant geassocieerd te zijn met een correcte identificatie (odds ratio 1,10; 95 procent BI, 1,05-1,15, $p < 0,01$).⁹ Tevens bleek het aantal beschikbare stammen in de database verband te houden met het aantal correcte identificaties (mediaancorrecte identificaties 11 stammen; mediaan niet-correcte identificaties 2 stammen).⁹ Eén van de eerste onderzoeken naar de mogelijkheden de Maldi Biotyper (Bruker Daltonics) voor de identificatie van gisten (zowel ascomyceten als basidiomyceten) werd gepubliceerd door Marklein et al, in 2009.³ In dit onderzoek werden 18 type stammen en 267 klinische isolaten (waaronder 250 *Candida* spp.), maar ook soorten van *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia* en *Magnusiomyces* geïdentificeerd met behulp van de MALDI Biotyper. De meerderheid van de isolaten (92,5 procent) kon correct worden geïdentificeerd. De onjuist en niet-identificeerbare isolaten (20) werden na uitbreiding van de databank tevens correct geïdentificeerd. Ook nauw verwante soorten kunnen goed worden geïdentificeerd (figuur 3), bijvoorbeeld de recent onderscheiden soorten in het *Candida haemulonii*-complex, het *Cryptococcus neoformans*/*Cr. gattii*-complex, maar ook *Candida albicans* en *C. dubliniensis*.^{3,5,14,19,20,21} De *Candida*-soorten, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (ook bekend als *Pichia kudriavzevii* of *Issatchenkia orientalis*), *C. lusitaniae* en *C. dubliniensis* zijn belangrijk in de kliniek omdat deze veel voorkomen en deels verschillen in hun gevoeligheid voor antimycotica. Het genus *Candida* is echter niet goed gedefinieerd en ten gevolge van de toepassing van betrouwbare moleculaire fylogenieën

blijkt dat het genusconcept *Candida* dient te worden herzien. Dit zal resulteren in veel naamsveranderingen die tevens in de verschillende databanken doorgevoerd zullen moeten worden. Ook worden steeds vaker zeldzamere *Candida*-soorten bij patiënten geïsoleerd waarvan het ook van belang is dat ze snel en goed worden geïdentificeerd omdat deze ook in gevoeligheid voor antimycotica kunnen verschillen.^{22,23} Een set van klinische *Candida*-isolaten (n = 201) afkomstig van het Hamad Medical Corporation ziekenhuis (Doha, Qatar), werd geïdentificeerd met behulp van de Maldi Biotyper en de resultaten werden vergeleken met de resultaten verkregen door moleculaire identificatie en conventionele identificatie met behulp van kweek, groei-profielen van API32C, VITEK 2 compact (YST-kaart voor de identificatie van gist) en Chromagar.²⁴ De resultaten verkregen met MaldiToF waren identiek aan de resultaten die verkregen werden met moleculaire identificaties, terwijl aanzienlijke verschillen werden geconstateerd met de conventionele identificatie, waarmee met name *C. orthopsilosis*, *Meyerozyma guilliermondii* (= *C. guilliermondii*), *C. pararugosa*, *Kluyveromyces lactis* (= *C. kefyri*), *Cyberlindnera fabiani* (= *C. fabianii*) en *Lodderomyces elongisporus* onjuist werden geïdentificeerd (totaal 11 procent onjuiste identificaties met de conventionele methoden).²⁴

Bloedkweekflessen en resistentie

Snelle en correcte identificatie van micro-organismen geïsoleerd uit een positieve bloedcultuur, is van cruciaal belang voor de behandeling van de patiënt. De incidentie van candidemieën groeit wereldwijd en *Candida*-infecties zijn een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit vooral bij immuungecompromitteerde patiënten, zoals patiënten met hemato-oncologische maligniteiten of personen met langdurige hospitalisatie.²² De identificatie van gisten rechtstreeks uit bloedkweekflessen door middel van MaldiToF blijft echter een uitdaging.^{25,26} Het menselijk bloed is rijk aan bloedcellen (zoals erythrocyten en leukocyten), eiwitten, peptiden (bijvoorbeeld hemoglobine en albumine) en andere stoffen die kunnen interfereren met het piekenpatroon van het massaspectrum en daardoor het identificatieproces bemoeilijken.²⁷ Er zijn verschillende protocollen ontwikkeld om bloedcomponenten te verwijderen, waaronder filtratie, wassen, centrifugeren en verzeping om de analytische zuiverheid te verhogen. Deze voorbehandelingsstappen kunnen ook worden uitgevoerd met een commerciële kit (Sepsityper), verkrijgbaar van Bruker Daltonics.^{25,28} De volledige verwijdering van bloedcellen met behulp van een lysisoplossing in deze kit is noodzakelijk voor het verkrijgen van identificaties met een hoge nauwkeurigheid die varieert van 91,3 tot 100 procent.^{25,26}

Samengevat suggereren de beschikbare data dat de MaldiToF-methode veelbelovend is voor de analyse van gisten in bloedkweekflessen. Ook zijn er veelbelovende

stappen gezet om azoolresistente *Candida*-isolaten met behulp van MaldiToF te identificeren. Het wijdverbreide gebruik van antifungale middelen, in het bijzonder fluconazol, maar meer recent ook caspofungine, heeft geleid tot een verminderde gevoeligheid of zelfs resistentie van gisten (met name van sommige *Candida*-soorten) voor deze medicijnen. Dit ondersteunt het belang van het bepalen van de gevoeligheid van gisten (en andere fungi) voor antischimmelmiddelen, waarvoor richtlijnen zijn ontworpen door twee instituten, namelijk CLSI en EUCAST.²⁹ Beide worden veel gebruikt voor het betrouwbaar uitvoeren van gevoeligheidstesten in klinische laboratoria. Recent is er echter ook een alternatieve methode beschreven voor het testen van gevoeligheden voor antifungale middelen van klinisch relevante *Candida*- en *Aspergillus*-species met behulp van MaldiToF.³⁰ Ook *Candida*-isolaten met een verlaagde gevoeligheid voor de nieuwere generatie triazolen (voriconazol, posaconazol) kunnen met MaldiToF worden herkend.³¹

Conclusie

Concluderend kunnen we stellen dat de toepassing van MaldiToF een revolutie heeft veroorzaakt in de identificatie van gisten in (klinische) laboratoria. De mogelijkheden zijn nog lang niet uitgeput, maar verdere optimalisatie is nodig voor grootschalige toepassing van de DM, het vaststellen van resistentie en het identificeren van gisten die worden gekweekt in bloedkweekflessen of direct vanuit bloed en andere lichaamsvloeistoffen. De verwachting is echter dat enkele van deze mogelijkheden in de nabije toekomst tot de routinematige toepassingen van MaldiToF in het klinische laboratorium zullen behoren.

Dankwoord

Deze publicatie is mogelijk gemaakt door een subsidie NPRP 5-298-3-086 uit het Fonds Qatar National Research (lid van de Qatar Foundation) aan Teun Boekhout. De verklaringen in dit document zijn uitsluitend de verantwoordelijkheid van de auteurs.

Markus Kostrzewa (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Duitsland) wordt bedankt voor de samenwerking met het CBS.

Referenties

1. Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:331-71.
2. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:6241-6.
3. Marklein G, Josten M, Klanke U, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009;47:2912-7.
4. Stevenson LG, Drake SK, Shea YR, Zelazny AM, Murray PR. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

- spectrometry for identification of clinically important yeast species. *J Clin Microbiol* 2010;48:3482-6.
5. Bader O, Weig M, Taverne-Ghadwal L, Lugert R, Gross U, Kuhns M. Improved clinical laboratory identification of human pathogenic yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1359-65.
 6. Rosenvinge FS, Dzajic E, Knudsen E, Malig S, Andersen LB, Løvig A, et al. Performance of matrix-assisted laser desorption-time of flight mass spectrometry for identification of clinical yeast isolates. *Mycoses* 2013;56:229-35.
 7. Hillenkamp F, Karas M. Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization. *Methods Enzymol* 1990;193:80-95.
 8. Holland RD, Wilkes JG, Rafi F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, et al. Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996;10:1227-32.
 9. Vlek A, Kolecka A, Khayhan K, Theelen B, Groenewald M, Boel E, et al. Interlaboratory comparison of sample preparation methods, database expansions, and cutoff values for identification of yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using a yeast test panel. *J Clin Microbiol* 2014;52:3023-29.
 10. Pinto A, Halliday C, Zahra M, Van Hal S, Olma T, Maszewska K, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry identification of yeasts is contingent on robust reference spectra. *PLoS One* 2011;6:e25712.
 11. Cassagne C, Cella AL, Suchon P, Normand AC, Ranque S, Piarroux R. Evaluation of four pretreatment procedures for MALDITOF MS yeast identification in the routine clinical laboratory. *Med Mycol* 2013;51:371-7.
 12. Buskirk AD, Hettick JM, Chipinda I, Law BF, Siegel PD, Slaven JE, et al. Fungal pigments inhibit the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis of darkly pigmented fungi. *Anal Biochem* 2011;411:122-8.
 13. Riat A., Rentenaar RJ, van Drongelen AM, Barras V, Bertens LC, Vlek AL, et al. Ground steel target plates in combination with direct transfer of clinical yeast isolates improves frequencies of species level MALDITOF MS identifications in comparison with polished steel target plates. *J Clin Microbiol* 2015;53:1993-5.
 14. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacheck I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015;78:16-48.
 15. Kolecka A, Khayhan K, Arabatzis M, Velegriki A, Kostrzewa M, Andersson A, et al. Efficient identification of *Malassezia* yeasts by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDITOF MS). *Br J Dermatol* 2014;170:332-41.
 16. Kolecka A, Khayhan K, Groenewald M, Theelen B, Arabatzis M, Velegriki A, et al. Identification of medically relevant species of arthroconidial yeasts by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013;51:2491-500.
 17. Dhiman N, Hall L, Wohlfiel SL, Buckwalter SP, Wengenack NL. Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast. *J Clin Microbiol* 2011;49:1614-6.
 18. Van Herendael BH, Bruynseels P, Bensaïd M, Boekhout T, De Baere T, Surmont I, et al. Validation of a modified algorithm for the identification of yeast isolates using matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDITOF MS). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:841-8.
 19. Firacative C, Trilles L, Meyer W. MALDITOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans*/*C. gattii* species complex. *PLoS One* 2012;7:e37566.
 20. Cendejas-Bueno E, Kolecka A, Alastruey-Izquierdo A, Theelen B, Groenewald M, Kostrzewa M, et al. Reclassification of the *Candida haemulonii* complex as *Candida haemulonii* (*C. haemulonii* group I), *C. duobushaemulonii* sp. nov. (*C. haemulonii* group II), and *C. haemulonii* var. *vulnera* var. nov.: three multiresistant human pathogenic yeasts. *J Clin Microbiol* 2012;50:3641-51.
 21. Lacroix C, Gicquel A, Sendid B, Meyer J, Accoceberry I, François N, et al. Evaluation of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDITOF MS) systems for the identification of *Candida* species. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:153-8.
 22. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group, and European Confederation of Medical Mycology. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:76-98.
 23. Pfaller MA, Andes DR, Diekema DJ, Horn DL, Reboli AC, Rotstein C, et al. Epidemiology and outcomes of invasive candidiasis due to non-*albicans* species of *Candida* in 2,496 patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy (PATH) Registry 2004-2008. *PLoS One* 2014;9:e101510.
 24. Taj-Aldeen SJ, Kolecka A, Boesten R, Alolagi A, Almaslamani M, Chandra P, et al. Epidemiology of candidemia in Qatar, the Middle East: performance of MALDITOF MS for the identification of *Candida* species, species distribution, outcome, and susceptibility pattern. *Infection* 2013;42:393-404.
 25. Yan Y, He Y, Maier T, Quinn C, Shi G, Li H, et al. Improved identification of yeast species directly from positive blood culture media by combining Sepsityper specimen processing and Microflex analysis with the matrix-assisted laser desorption ionization Biotyper system. *J Clin Microbiol* 2011;49:2528-32.
 26. Spanu T, Posteraro B, Fiori B, Dínzeo T, Campoli S, Ruggeri A, et al. Direct Malditof mass spectrometry assay of blood culture broths for rapid identification of *Candida* species causing bloodstream infections: an observational study in two large microbiology laboratories. *J Clin Microbiol* 2012;50:176-9.
 27. Marinach-Patrice C, Fekkar A, Atanasova R, Gomes J, Djamdjian L, Brossas JY, et al. Rapid species diagnosis for invasive candidiasis using mass spectrometry. *PLoS One* 2012;25:e8862.
 28. Schieffer KM, Tan KE, Stamper PD, Somogyi A, Andrea SB, Wakefield T, et al. Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDITOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK® diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol* 2014;116:934-41.
 29. Posteraro B, Torelli R, De Carolis E, Posteraro P, Sanguinetti M. Antifungal susceptibility testing: current role from the clinical laboratory perspective. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2014;6:e2014030.
 30. De Carolis E, Vella A, Florio AR, Posteraro P, Perlin DS, Sanguinetti M, et al. Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2012;50:2479-83.
 31. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA, Wiederhold NP. Detection of triazole resistance among *Candida* species by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDITOF MS). *Med Mycol* 2015; myvo46v1-myvo46. doi: 10.1093/mmy/myvo46

Strategieën voor optimaal management van geneesmiddelinteracties met azool-antifungale middelen in de klinische praktijk

V.J.C. Lempers, L.C. Martial, R.J.M. Brüggemann

Verantwoording: een Engelstalige versie van dit artikel is recent gepubliceerd in *Current Opinion in Pharmacology* 2015 Oct;24:38-44.

Samenvatting

Het beheersen van interacties met antimycotische middelen is voor klinici en apothekers vaak complex. Een belangrijke interactie met klinische consequenties is de interactie tussen triazolen en immunosuppressiva. De patiënt heeft een verhoogd risico op toxiciteit of rejectie van het transplantaat of 'graft-versus-host disease' (GvHD). Het is een complexe taak voor de clinicus om de concentraties van de immunosuppressiva binnen de gestelde grenzen te houden. Dit vereist een therapie op maat voor de behandeling van de patiënt.

In dit artikel worden de basisprincipes van geneesmiddelinteracties behandeld. Het biedt een richtlijn voor het beoordelen en beheersen van interacties en kan de arts-microbioloog helpen om alert te zijn op geneesmiddelinteracties wanneer antifungale therapie met azolen wordt geadviseerd.

Er wordt een stapsgewijze evaluatie beschreven waarbij gebruik wordt gemaakt van een beslisboom voor het voorkomen van relevante interacties.

Trefwoorden

Azool-antifungaal middel, immunosuppressivum, geneesmiddelinteractie

Abstract

The management of drug-drug interactions (DDIs) between azole antifungals (fluconazole, itraconazole, posaconazole and voriconazole) and immunosuppressants (cyclosporine, tacrolimus, everolimus and sirolimus) in transplant patients remains challenging, as the impact of altered immunosuppressant concentrations puts the patient at high risk for either toxicity or transplant rejection. As a result, it is a complex task for the clinician to maintain immunosuppressant concentrations within the desired therapeutic range and this requires a highly

individualized patient approach. We provide important tools for adequate assessment of the drug interactions that cause this pharmacokinetic variability of immunosuppressants. A stepwise approach for the evaluation and subsequent management options, including a decision flow chart, are provided for optimal handling of these clinically relevant DDIs.

Introductie

Diverse protonpompremmers, midazolam en vincristine: het zijn slechts enkele geneesmiddelen die een gevaarlijke interactie kunnen hebben met antimycotische middelen. Veel geneesmiddelen geven interacties met azolen.¹ In dit artikel zullen wij ons richten op de interactie tussen immunosuppressiva en azolen.

Immunosuppressiva worden toegepast in het voorkomen of behandelen van orgaanafstoting of graft-versus-host disease (GvHD). Hierdoor ontstaat een verhoogd risico op schimmelinfecties. Bij zowel profylaxe als behandeling van invasieve schimmelinfecties spelen de azolen (fluconazol, itraconazol, posaconazol en voriconazol) een prominente rol.

Indien azolen gelijktijdig met immunosuppressiva (cyclosporine, tacrolimus, sirolimus en everolimus) worden gebruikt, zal het metabolisme en transport van de immunosuppressiva worden geremd. Het gevolg is een fors hogere blootstelling aan de immunosuppressiva met daarmee gepaard gaande toxiciteit.² Omgekeerd zal het staken van de azolen zonder aanpassing van de dosering van immunosuppressiva leiden tot een verhoogde kans op subtherapeutische concentraties, met klinisch falen (orgaanrejectie of GvHD) als gevolg.³

V.J.C. Lempers, L.C. Martial, R.J.M. Brüggemann, Radboud universitair medisch centrum, divisie apotheek, Nijmegen, Radboud Institute for Health Sciences, Nijmegen. Correspondentieadres: R.J.M. Brüggemann, ziekenhuisapotheker en klinisch farmacoloog, Radboud universitair medisch centrum, Afdeling apotheek, Geert Grooteplein 10, 6526 GA Nijmegen, e-mail: roger.bruggemann@radboudumc.nl

Geneesmiddeleninteracties tussen azolen en immunosuppressiva zijn uitvoerig beschreven.^{1,3,4} De vroege herkenning is van belang om strategieën ter preventie ervan te kunnen toepassen. Het doel daarvan is enerzijds een minimum aan bijwerkingen en anderzijds het behoud van therapeutische effectiviteit.

Principes van geneesmiddelinteracties

Geneesmiddelinteracties hebben farmacokinetische aspecten (veranderingen in opname, verdeling, metabolisme en excretie) en farmacodynamische aspecten (antagonisme, synergie en additieve effecten op dezelfde receptor/fysiologische processen).⁵

Farmacokinetische interacties ontstaan doordat de azolen het metaboliserende enzymstelsel cytochroom (CYP) P450 3A4/5 en/of de geneesmiddeltransporter P-glycoproteïne (P-gp) in het gastro-intestinale systeem en de lever remmen. De immunosuppressiva zijn substraten voor deze enzymen en transporter.^{1,4,6} De interacties variëren sterk in mate en ernst. Dit komt omdat de remming van deze enzymstelsels concentratieafhankelijk is.⁷ Verder verschilt de selectiviteit en de potentie voor diverse enzymen per azool (tabel 1). Zo zijn itraconazol en voriconazol sterkere remmers van CYP3A4 dan fluconazol en posaconazol, en zijn itraconazol en posaconazol in staat om P-gp te remmen terwijl voriconazol en fluconazol geen effect hebben op deze transporter.^{1,7,8}

Genetische variatie van de CYP-enzymen en P-gp is uitvoerig beschreven in de literatuur.⁹ Deze polymorfismen leiden tot een verlaagde of verhoogde metabole capaciteit en kunnen de interacties tussen azolen en andere middelen verder beïnvloeden. Dit aspect valt buiten het raam van dit artikel.

Middelen om geneesmiddelinteracties te beoordelen

Diverse informatiebronnen kunnen helpen om interacties te identificeren en kwantificeren. Idealiter heeft een multidisciplinaire groep behandelaars toegang tot deze bronnen. De uitgebreide bijsluiter (SmPC, Summary of Product Characteristics) heeft als nadeel dat er gewoonlijk geen klinische adviezen in staan.¹⁰ De 'primaire literatuur' zoals casuïstiek en onderzoeksgegevens van interacties bij gezonde proefpersonen geven die informatie wel, maar deze onderzoeken zijn vaak lastig te extrapoleren naar de kliniek. Casuïstiek kan ondersteunen bij het behandelen van een individuele patiënt en is een stimulans voor verder en meer gedetailleerd onderzoek.

Naast de primaire literatuur en de SmPC zijn er commerciële interactiedatabases beschikbaar zoals Lexicomp Online™ en Micromedex. Deze compendia zijn een belangrijke bron van geactualiseerde informatie. De licentiekosten voor deze interactiedatabanken zijn echter hoog waardoor niet iedereen toegang heeft tot

Tabel 1. Betrokkenheid van cytochroom P450 enzymen en P-glycoproteïne (P-gp) in het metabolisme van antifungale geneesmiddelen.

| Triazol | Substraat voor | Remmer voor |
|-------------|-----------------------------------|-------------------------|
| Fluconazol | - | CYP2C9, CYP3A4, CYP2C19 |
| Itraconazol | CYP3A4 | CYP3A4, CYP2C9, P-gp |
| Posaconazol | Fase II-enzymen (bv. UDP enzymen) | CYP3A4, P-gp |
| Voriconazol | CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 | CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 |

deze informatie. Een interactiedatabank zoals de recent ontwikkelde Fungal Pharmacology (<http://www.fungal-pharmacology.org>) kan een goed alternatief zijn. Fungal Pharmacology is een gratis, online database met actuele onafhankelijke informatie, gecontroleerd door externe referenten ('peer reviewed') over geneesmiddelinteracties met antifungale middelen.¹¹

In het geval dat er geen of zeer beperkte informatie beschikbaar is over een interactie, kan een inschatting van de relevantie van een theoretische interactie worden gemaakt op basis van farmacologische mechanismen. Wanneer bijvoorbeeld itraconazol een geneesmiddel remt dat substraat is voor CYP3A4, kan men een theoretische voorspelling doen dat posaconazol dit geneesmiddel ook zal remmen.

Soms worden conflicterende resultaten gerapporteerd over geneesmiddelinteracties. Deze kunnen een farmacologische achtergrond hebben doordat bijvoorbeeld verschillende dosering zijn gebruikt in het onderzoek, verschillende therapieduur, andere toedienroutes en tijdeffecten (bijvoorbeeld bij de interactie tussen Sint Janskruid en voriconazol, waarbij eerst een initiële remming van de afbraak van voriconazol wordt gezien, gevolgd door een inductie van de afbraak van voriconazol¹²).

Actueel medicatieoverzicht

Een actueel overzicht van recept- en handverkoopgeneesmiddelen is essentieel. In vele Nederlandse ziekenhuizen wordt door de apotheek een opname- en ontslaggesprek gevoerd die voorziet in de beschikbaarheid van deze informatie. Daarnaast moet er een goede overdracht zijn van medicatiegegevens indien de patiënt er voor zou kiezen om bij verschillende apotheken zijn geneesmiddelen te halen. Bij voorkeur gaat de patiënt naar één (poliklinische) apotheek waar een actueel medicatieoverzicht wordt bijgehouden.

Beschikbaarheid van een multidisciplinair team

Een multidisciplinaire groep behandelaren is een vereiste voor het goed afhandelen van geneesmiddelinteracties.¹³ De clinicus (samen met de arts-microbioloog of de infectioloog) is verantwoordelijk voor de diagnose, het behandelplan en de keuze van het anti-infectivum. De clinicus is veelal ook de eerste die wordt geconfronteerd met geneesmiddelinteracties. De (ziekenhuis)apotheker/klinisch farmacoloog is bij uitstek de persoon met expertise op het gebied van farmacokinetiek en geneesmiddelinteracties. Specifiek in het geval van interacties tussen antifungale middelen en immunosuppressiva is het aan te raden de ziekenhuisapotheker in het beleid te betrekken om tot een optimale behandeling van de patiënt te komen. De ziekenhuisapotheker kan dan een medicatiereview uitvoeren en een inschatting maken van de ernst van de interactie en passende managementstappen aandragen.

Elektronisch patiëntendossier

Een elektronisch patiëntendossier inclusief geneesmiddelmodule is inmiddels in veel Nederlandse ziekenhuizen ingevoerd. Niet in alle gevallen is de arts echter verantwoordelijk voor het invoeren van medicatie. In het geval dat deze verantwoordelijkheid wel bij de arts ligt, zal hij/zij ook de medicatiebewakingssignalen getoond krijgen.¹⁴ Veel systemen op de Nederlandse markt geven meteen de nodige achtergrondinformatie om een inschatting te kunnen maken over de interactie. In de ideale situatie is het systeem zo ingericht dat enkel relevante interacties worden getoond om 'signaal-vermoeidheid' ('alert fatigue') te voorkomen.¹⁵ Wanneer het systeem goed is ingericht kan dit een waardevolle toevoeging zijn aan het arsenaal van bronnen voor de beheersing van interacties.

Klinische beoordeling

Klinische beoordeling (controle van bijwerkingen/toxiciteit, afwijkende biochemische en hematologische laboratoriumparameters et cetera) is essentieel om vast te stellen wat de impact is van een interactie. Dit dient vooral te gebeuren bij het starten of staken van therapie, tijdens dosisaanpassingen of bij veranderingen in de klinische omstandigheden die invloed hebben op de farmacokinetiek van het geneesmiddel. Wanneer er sprake is van een interactie dienen adequate controles vooraf te worden afgesproken (bijvoorbeeld leverfunctie- en nierfunctietesten).

Therapeutic drug monitoring

'Therapeutic drug monitoring' (TDM) omvat het individualiseren van de dosering op basis van gemeten spiegels om toxiciteit te voorkomen en effectiviteit te maximaliseren.¹⁶ Voor het uitvoeren van TDM is een (intern en extern) gevalideerde analysemethode een vereiste.^{17,18} Daarnaast is het noodzakelijk dat aan alle randvoorwaarden voor TDM wordt voldaan, zoals het verstrekken van informatie

over het tijdstip van toediening en bijbehorende dosering, tijdstip van bloedafname, route van toediening, farmaceutische formulering, comedicatie en relevante patiëntinformatie (gegevens over lokalisatie van infectie en gevoeligheid van verwekker).^{16,19} Indien mogelijk wordt TDM bij elke patiënt toegepast die een combinatie van immunosuppressiva en azolen ontvangt, waarbij beide middelen worden vervolgd. Het wordt sterk aanbevolen om dit intensief (tweemaal per week) bij aanvang van therapie uit te voeren. De frequentie kan worden verlaagd wanneer de klinische omstandigheden dit toelaten en wanneer stabiele opeenvolgende spiegels gemeten worden.

Onderwijs en opleiding

Essentieel in het vergaren van kennis over geneesmiddelinteracties zijn onderwijs en opleiding. Het voorspellen van het optreden van interacties wordt enorm vergroot door kennis van de onderliggende mechanismen. Hoewel het voor de hand ligt dat (ziekenhuis)apothekers dit onderwijs zullen verzorgen, dient er ook te worden voorzien in een bijdrage van andere leden uit de behandelgroep. Daarnaast moeten patiënten worden betrokken bij hun behandeling. Het opmerkelijk maken op het tijdig signaleren van bijwerkingen die ontstaan als gevolg van de interactie vereist een goede instructie. Hiermee kunnen klinische problemen worden voorkomen (denk onder andere aan interacties met het vrij verkrijgbare omeprazol^{20,21} en Sint-Janskruid²²).

Evalueren van geneesmiddelinteracties: een stapsgewijze benadering

Geneesmiddelinteracties kunnen stapsgewijs worden geëvalueerd waarbij gebruik gemaakt kan worden van de eerder beschreven bronnen van informatie en instructies.

Stap 1: voorspellen

Herkenning van het onderliggende farmacologische principe van geneesmiddelinteracties (substraat, remmer van CYP-enzymen en transporters) tezamen met kennis over de farmacokinetische eigenschappen van de middelen helpt in de voorspelling of een interactie op zal treden. De SmPC en geneesmiddelcompendia zijn daarbij goede bronnen om te raadplegen (zie de paragraaf 'Middelen om geneesmiddelinteracties te beoordelen'). Daarnaast zal onderwijs ook aan de vroegtijdige herkenning van mogelijke interacties bijdragen (zie de paragraaf 'Onderwijs en opleiding').

Stap 2: identificeren

Het identificeren van geneesmiddelinteracties kan worden ondersteund met de hierboven genoemde informatiebronnen. Om de mate van bewijslast in te schatten, is een beoordeling van het ontwerp van het onderzoek en het herkennen van de beperkingen ervan vereist (bijvoorbeeld

cross-over-onderzoek van blootstelling geven een betere bewijslast en kwantificering dan casuïstiek).²³

Stap 3: kwantificeren

De verwachte verandering in concentratie (dal- en topspiegel) die volgt uit de interactie moet worden vastgesteld aan de hand van de beschikbare literatuur. Het effect van de interactie wordt onder andere bepaald door de route van toediening (intraveneus versus oraal), duur van de therapie en concentratie van het geneesmiddel (hogere concentraties geven sterkere remming). Daarnaast is comedatie ook van belang omdat er sprake kan zijn van meer dan één interactie met twee geneesmiddelen. De snelheid van intreden van de interactie is afhankelijk van het mechanisme. Middelen die de afbraak remmen laten een direct effect zien. Wanneer er sprake is van inductie van een enzym dan zal het enige tijd duren (meestal een tot twee weken) voordat het effect maximaal is. Na het staken van de therapie blijft het effect van inductie nog enige tijd aanwezig (soms wel tot vier weken na staken), terwijl bij remming het effect verdwenen is zodra het geneesmiddel uit het lichaam is.¹ Zoals boven beschreven kan TDM helpen om het effect van de interactie te kwantificeren.

Stap 4: classificeren

Veranderingen in blootstelling moeten worden beoordeeld in het licht van het therapeutisch venster van een geneesmiddel om de klinische relevantie in te schatten. Omdat alle immunosuppressiva een nauwe therapeutische breedte bezitten, hebben relatief kleine veranderingen in concentraties al direct klinische gevolgen. Omgekeerd geldt dat bij geneesmiddelen met een breder therapeutisch venster verandering in blootstelling zonder klinische gevolgen kan blijven. De classificatie van het risico zoals deze wordt gebruikt in geneesmiddelinteractiedatabanken kunnen helpen met een snelle identificatie van de ernst van de interactie.¹¹

Stap 5: patiëntgerelateerde factoren

Patiëntgerelateerde factoren kunnen een belangrijke rol spelen bij geneesmiddelinteracties. Ernst van de ziekte, comorbiditeiten en comedatie kunnen de mate en de significantie van de interactie beïnvloeden.²⁴ Door bijvoorbeeld de toevoeging van erythromycine bij een patiënt die reeds behandeld wordt met voriconazol en ciclosporine, kan de ciclosporinespiegel nog verder stijgen door additionele CYP3A-remming. De consequentie is meer kans op de ciclosporine-geassocieerde toxiciteit.

Stap 6. Vermijden of beheersen van de interactie

Als we alle bovengenoemde stappen over de evaluatie van een geneesmiddelinteractie (stap 1 tot 5) in ogenschouw nemen, dan is de laatste stap de adequate afhandeling

van de interactie tussen azolen en immunosuppressiva. Hiermee wordt gestreefd de concentratie van immunosuppressiva binnen het therapeutisch venster te behouden en daarmee onnodige toxiciteit te voorkomen, als ook verlies van effectiviteit te ondervangen. Voor een gestructureerd managementplan gebaseerd op de klinische significantie van de geneesmiddelinteractie, zie *figuur 1*.

Staken van de behandeling van het antifungaal middel

Als het klinisch verantwoord is om de antifungale therapie te staken, is dat de beste keus voor het voorkomen van een interactie. Dit is soms mogelijk, zoals het staken van profylaxe met posaconazol. Wanneer een dergelijke keuze wordt gemaakt, dienen andere maatregelen te worden genomen, zoals vroege detectie van een schimmelinfectie door gericht laboratoriumonderzoek.

Het empirisch verlagen van de dosering van de immunosuppressiva

Bij het toedienen van interacterende medicatie wordt vaak gekozen voor het empirisch reduceren van de dosering van het immunosuppressivum om het risico op bijwerkingen of toxiciteit te reduceren. De mate van dosisreductie is verschillend per immunosuppressivum, maar ook per azool.⁴ Wanneer bijvoorbeeld voriconazol wordt gestart bij een patiënt met tacrolimus, dan is een dosisreductie van 50 tot 66 procent van tacrolimus noodzakelijk.²⁵

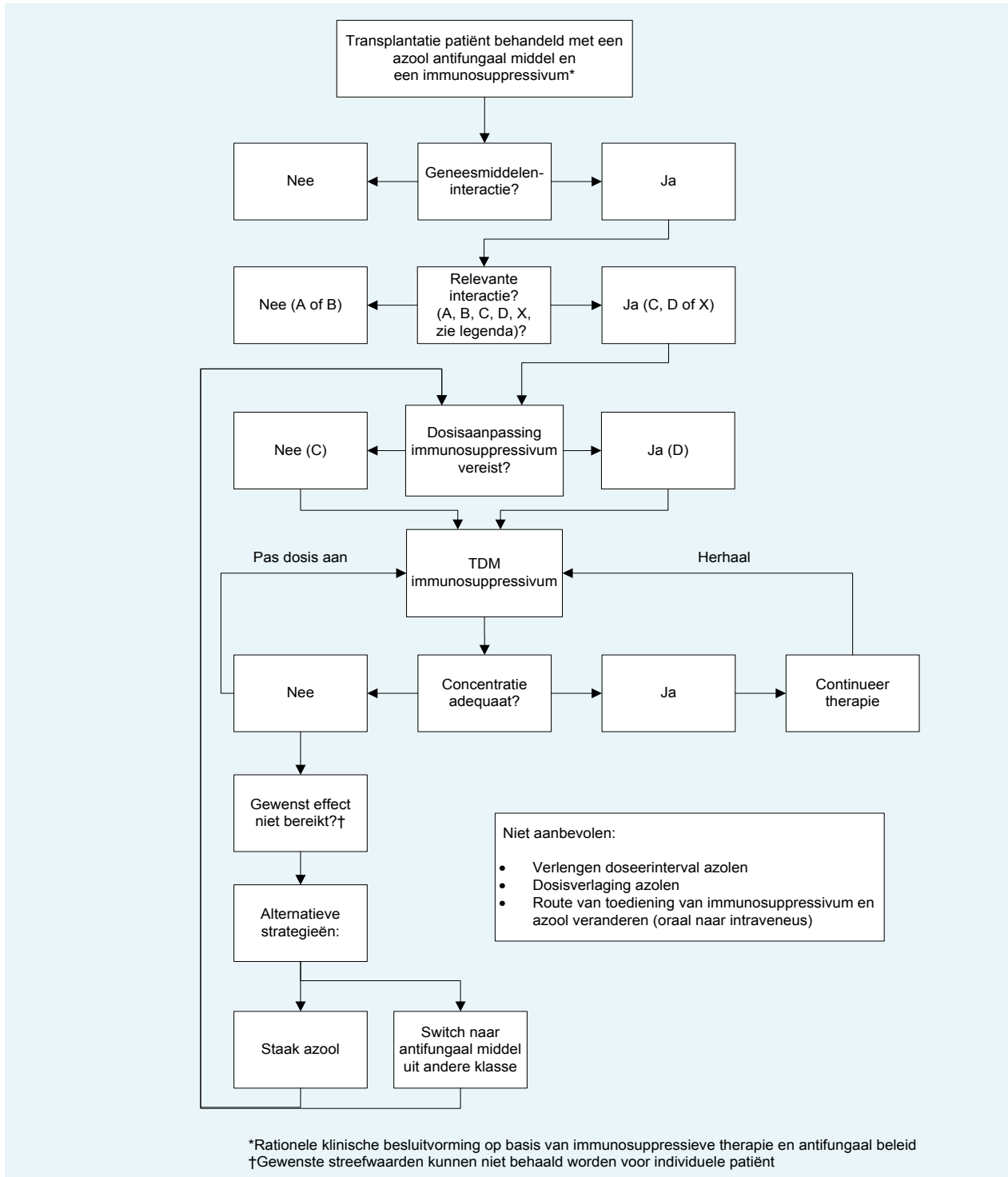
Verlagen van de dosering van het immunosuppressivum op basis van TDM

TDM van immunosuppressiva wordt in Nederland, waar een goede infrastructuur hiervoor bestaat, nagenoeg altijd toegepast. De reden is het vervolgen van de concentraties van de immunosuppressiva na een empirische dosisreductie, maar ook in het geval dat de dosering niet initieel is aangepast wordt TDM toegepast. In het merendeel van de gevallen wordt gekozen voor een empirische dosisreductie van de immunosuppressiva wanneer een azool wordt gestart. Uitzondering op deze situatie is het beginnen van lage dosis fluconazol (200 mg) en gelijktijdig geven van ciclosporine.²⁶ In dit geval wordt de ciclosporinedosering aangepast na het meten van de concentraties van dit middel.

Overstap naar een ander antifungaal middel

In het geval dat een geneesmiddelinteractie niet te beheersen is ondanks inzet van dosisaanpassingen en TDM, kan men ervoor kiezen om over te stappen naar een ander immunosuppressivum of antifungaal middel. Een keuze voor een echinocandine of (een lipideformulering van) amfotericine B ligt dan voor de hand. Over zowel de echinocandines als amfotericine B en de lipideformuleringen ervan zijn maar weinig data beschikbaar betreffende interacties met immunosuppressiva en die

Figuur 1. Beslisboom voor de afhandeling van geneesmiddelinteracties tussen azolen en immunosuppressiva.



- A: Geen interactie bekend (data laten geen farmacokinetische/farmacodynamische veranderingen zien bij gelijktijdig gebruik)
 B: Geen actie vereist (data laten zien dat deze geneesmiddelen interacteren, alhoewel de klinische significantie hiervan beperkt is)
 C: Vervolg therapie (data laten zien dat de geneesmiddeleninteractie klinisch significant is, maar vereisen in het algemeen geen grote aanpassing van therapie. Een geschikt vervolgplan is noodzakelijk om negatieve effecten van de gelijktijdige therapie te kunnen beoordelen. Dosisaanpassingen zijn alleen noodzakelijk in selecte patiënten)
 D: Overweeg therapie aan te passen (data laten zien dat de geneesmiddeleninteractie klinisch significant kan zijn en specifieke klinische besluitvorming vereist (bijvoorbeeld empirische dosis aanpassingen, continue TDM, stap over op een alternatief geneesmiddel) om de voordelen van therapie te realiseren en het risico van toxiciteit te minimaliseren of voorkomen).
 X: Gecontra-indiceerd (data laten zien dat de geneesmiddeleninteractie klinisch significant kan zijn en gelijktijdig gebruik is gecontra-indiceerd. Het risico van de interactie is groter dan de voordelen van therapie).

geven weinig tot geen relevant bewijs voor het optreden van interacties met immunosuppressiva. Een keuze om een ander niet-azool antifungaal middel voor te schrijven dient zich aan bij een interactie tussen een azool en sirolimus. Het effect van deze interactie is dermate sterk en onvoorspelbaar dat een vervanging van het azool door een andere klasse sterk aanbevolen wordt. Indien men wil overstappen is het aan te raden een arts-microbioloog of infectioloog te raadplegen om tot een goede keuze te komen met het oog op de verwekker.²⁷ Uiteraard dient men wel bedacht te zijn op farmacodynamische interacties, bijvoorbeeld het effect op de nierfunctie van lipideformuleringen van amfotericine B en ciclosporine.²⁸

Overige overwegingen: niet aanbevolen

In de literatuur is er sprake van diverse andere mogelijkheden voor het beheersen van interacties tussen azolen en immunosuppressiva.²⁹ Hierbij kan men denken aan het verlengen van de doseerinterval van de azolen (minder vaak een hogere dosis toedienen), meer spreiding in de tijd tussen de inname van beide middelen et cetera. Deze voorbeelden zijn echter niet toepasbaar om diverse redenen: het remmend effect van de azolen is niet afhankelijk van het tijdstip van inname, minder vaak een hogere dosering toedienen zal leiden tot toxiciteit van de azolen en het verminderen van de dosering van de azolen zal leiden tot suboptimale antifungale therapie. Het intraveneus toedienen met als doel de bijdrage van het metabolisme in de darm te omzeilen is een patiëntvriendelijke oplossing en derhalve niet aan te bevelen, ook omdat het bewijs hiervoor ontbreekt.³⁰

De opinie van de expert

Vanwege het zeer nauwe therapeutisch venster van de immunosuppressiva zal gelijktijdig toedienen van azolen in nagenoeg alle gevallen leiden tot een klinische relevante interactie, hetgeen het risico op bijwerkingen voor de patiënt vergroot. Uitgebreide farmacologische kennis over onderliggende mechanismen en farmacokinetiek zijn essentieel voor het maken van goede therapeutische keuzes. De literatuur schrijft uitvoerig over diverse geneesmiddelinteracties. Strategieën om deze interacties in de dagelijkse praktijk te beheersen zijn echter schaars. Preventie van het optreden van interacties is een opgave die een systematische benadering vereist.

Het doel van dit overzicht is om de diverse beschikbare bronnen voor het beoordelen van geneesmiddelinteracties te bespreken. In de ideale situatie hebben behandelaren een multidisciplinair samenwerkingsverband en toegang tot alle in dit artikel beschreven hulpmiddelen. Onze stapsgewijze benadering helpt om geneesmiddelinteracties te voorspellen, identificeren, kwantificeren en classificeren. Dit is de basis waarmee interacties kunnen worden voorspeld en voorkomen.

Het aanreiken van de juiste hulpmiddelen en de stapsgewijze benadering met bijbehorende keuzen kan de patiëntveiligheid bevorderen, complicaties minimaliseren en behandelingsresultaten optimaliseren.

Referenties

- Brüggemann RJ, Alffenaar JW, Blijlevens NM, Billaud EM, Kosterink JG, Verweij PE, et al. Clinical relevance of the pharmacokinetic interactions of azole antifungal drugs with other coadministered agents. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1441-58.
- De Mattos AM, Olyaei AJ, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *Am J Kidney Dis*. 2000;35:333-46.
- 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.
- Dodds-Ashley E. Management of drug and food interactions with azole antifungal agents in transplant recipients. *Pharmacotherapy*. 2010;30:842-54.
- Wilkinson GR. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *New Engl J Med*. 2005;352:2211-21.
- Kirchner GI, Meier-Wiedenbach I, Manns MP. Clinical pharmacokinetics of everolimus. *Clin pharmacokinet*. 2004;43:83-95.
- Baloul S, Nivoix Y, Engel P, Lévêque D, Herbrecht RGU. Inhibition effects of four antifungal triazoles (itraconazole, fluconazole, voriconazole and posaconazole) on specific activities of CYP3A4 in human liver microsomes (Abstract number: P1667). 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID); Helsinki, Finland, 16 - 19 May: 2009.
- Nivoix Y, Leveque D, Herbrecht R, Koffel JC, Beretz L, Ubeaud-Sequier G. The enzymatic basis of drug-drug interactions with systemic triazole antifungals. *Clin Pharmacokinet*. 2008;47:779-92.
- Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, et al. Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;74:245-54.
- Tannenbaum C, Sheehan NL. Understanding and preventing drug-drug and drug-gene interactions. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2014;7:533-44.
- Fungal Pharmacology. Available at: <http://www.fungalpharmacology.com>. 2014.
- Rengelshausen J, Banfield M, Riedel KD, Burhenne J, Weiss J, Thomsen T, et al. Opposite effects of short-term and long-term St John's wort intake on voriconazole pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78:25-33.
- Burger D, Back D. Drug-drug interactions in HIV therapy: is it all clear? *Antivir Ther*. 2013. [Epub ahead of print]
- Kuperman GJ, Bobb A, Payne TH, Avery AJ, Gandhi TK, Burns G, et al. Medication-related clinical decision support in computerized provider order entry systems: a review. *J Am Med Assoc*. 2007;14:29-40.
- Seidling HM, Klein U, Schaefer M, Czock D, Theile D, Pruszydlo MG, et al. What, if all alerts were specific – estimating the potential impact on drug interaction alert burden. *Int J Med Inf*. 2014;83:285-91.
- Brüggemann RJ, Aarnoutse RE. Fundament and Prerequisites for the Application of an Antifungal TDM Service. *Curr Fungal Infect Rep*. 2015;9:122-9.
- Lempers VJ, Alffenaar JW, Touw DJ, Burger DM, Uges DR, Aarnoutse RE, et al. Five year results of an international proficiency testing programme for measurement of antifungal drug concentrations. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69:2988-94.
- European Medicines Agency (EMA). Guidance on bioanalytical method validation 2011. Available at: <http://www.ema.europa.eu>. Accessed: 01-05-2015.
- Gross AS. Best practice in therapeutic drug monitoring. *Br J Clin Pharmacol*. 1998;46:95-9.
- Schouler L, Dumas F, Couzigou P, Janvier G, Winnock S, Saric J. Omeprazole-cyclosporin interaction. *Am J Gastroenterol*. 1991;86:1097.
- Wood N, Tan K, Purkins L, Layton G, Hamlin J, Kleinermans D, et al. Effect of omeprazole on the steady-state pharmacokinetics of voriconazole. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;56:56-61.

22. Bauer S, Stormer E, Johné A, Kruger H, Budde K, Neumayer HH, et al. Alterations in cyclosporin A pharmacokinetics and metabolism during treatment with St John's wort in renal transplant patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2003;55:203-11.
23. Atkins D, Best D, Briss PA, Eccles M, Falck-Ytter Y, Flottorp S, et al. Grading quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ*. 2004;328:1490.
24. Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic-pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet*. 2000;38:41-57.
25. European Medicines Agency (EMA). Vfend; Summary of Product Characteristics. 2009. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000387/WC500049756.pdf
26. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Diflucan: Summary of Product Characteristics. 2014. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/019949s060,020090s044lbl.pdf
27. Dodds Ashley ES, Lewis R, Lewis JS, Martin C, Andes D. Pharmacology of Systemic Antifungal Agents. *Clin Infect Dis*. 2006;43(S1).
28. Kennedy MS, Deeg HJ, Siegel M, Crowley JJ, Storb R, Thomas ED. Acute renal toxicity with combined use of amphotericin B and cyclosporine after marrow transplantation. *Transplantation*. 1983;35(3):211-5.
29. Hansten PD. Drug interaction management. *Pharm World Sci*. 2003;25:94-7.
30. Spriet I, Grootaert V, Meyfroidt G, Debaveye Y, Willems L. Switching from intravenous to oral tacrolimus and voriconazole leads to a more pronounced drug-drug interaction. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;69:737-8.

Referenties en figuur behorend bij casus 'Ernstige opportunistische infectieuze complicaties vele jaren na niertransplantatie' van p. 35-36

Referenties

1. Singh N, Limaye AP. Infections in solid organ transplant recipients, p. 3440-3452. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious diseases. 2015, 8th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia.
2. Hagen F, Verweij PE, van der Ende A, Keijzer W, Ott A, Kampinga GA, et al. Cryptococcus en cryptokokkose – een epidemiologische en taxonomische update. *NTMM* 2016;24:37-42.
3. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50:291-322.
4. Tu HZ, Chang SH, Huaug TS, Huaug WK, Liu YC, Lee SS. Microscopic morphology in smears prepared from MGIT broth medium for rapid presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex and *Mycobacterium kansasii*. *Ann Clin Lab Sci* 2003;33:179-83.
5. Gonzalez J, Tudo G, Gomez J, Garcia A, Navarro M, Jimenez de Anta MT. Use of microscopic morphology in smears prepared from radiometric cultures for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium xenopi*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:493-500.
6. Patel R, Roberts GD, Keating MR, Paya CV. Infections due to nontuberculous mycobacteria in kidney, heart, and liver transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1994;19:263-73.
7. Simpson GL, Raffin TA, Remington JS. Association of prior nocardiosis and subsequent occurrence of nontuberculous mycobacteriosis in a defined, immunosuppressed population. *J Infect Dis* 1982;146:211-9.
8. May RC, Stone NR, Wiesner DL, Bicanic T, Nielsen K. Cryptococcus: from environmental saprophyte to global pathogen. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:106-17.

Figuur 1. Rechterhand van de patiënt met meerdere pijnlijke pustels en bloedingen ten gevolge van opportunistische infectie met *Mycobacterium kansasii*.



Ernstige opportunistische infectieuze complicaties vele jaren na niertransplantatie

L. Mulder, P. Pickkers, J.F. Meis

Samenvatting

Een niertransplantatiepatiënt ontwikkelde acht jaar na de transplantatie opeenvolgende infecties met *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium kansasii* en *Cryptococcus neoformans*. Hoewel deze infecties klinisch konden worden genezen, overleed de patiënt vervolgens aan een Epstein-Barr virus gerelateerd maligne B-celmyeloom van de hersenen.

Abstract

Eight years after transplantation, a renal transplant patient developed subsequent infections with *Nocardia asteroides*, *Mycobacterium kansasii* and *Cryptococcus neoformans*. Although these infections could be cured clinically, the patient subsequently died due to an Epstein-Barr virus related malignant B-cell lymphoma of the brain.

Trefwoorden

Niertransplantatie, *Nocardia*, *Mycobacterium kansasii*, *Cryptococcus neoformans*

Inleiding

Infectieuze complicaties na solide orgaantransplantaties treden meestal op in de eerste maanden na de operatie. Na circa een maand worden postoperatieve infecties minder belangrijk en verschuift het spectrum naar typische opportunistische infecties. Na zes maanden daalt het percentage ernstige infecties tot ongeveer 0,4 infecties per 1000 transplantatiedagen.¹ Deze casusbeschrijving toont echter dat, zelfs vele jaren na niertransplantatie, diverse opportunistische infecties kunnen ontstaan.

Casusbeschrijving

Een 60-jarige mannelijke patiënt presenteerde zich met koorts en een progressief beeld met ulcera en pusuitvloed aan zijn rechterhand. Zijn medische voorgeschiedenis laat een eindstadium nierfalen zien als gevolg van IgA-nefropathie en hypertensie. In 1990 onderging hij een niertransplantatie van een post-mortemdonor. Zijn immunosuppressieve therapie bestond uit prednison en azathioprine. In 1995 ontwikkelde hij een abces van een supraclaviculaire lymfeklier rechts als gevolg van

een infectie met *Nocardia asteroides*, waarvoor hij werd behandeld met chirurgische drainage en cefotaxim (6g/dag), hetgeen leidde tot volledig herstel binnen enkele weken. Hij was werkzaam op een kippenboerderij en had geen buitenlandse reisgeschiedenis. Bij presentatie had hij al enkele weken koorts zonder koude rillingen of aanwijzingen voor een specifieke focus. Vanwege zijn koorts was zijn huisarts empirisch gestart met amoxicilline-clavulaanzuur per os (3 dd 625 mg), echter zonder verbetering. Kort voordat hij werd verwezen naar een lokaal ziekenhuis viel hij met zijn rechterschouder tegen een muur, ontwikkelde vervolgens toenemende pijn in zijn vingertoppen en kreeg splinterbloedingen onder de nagels van zijn rechterhand. Bij opname leek de patiënt geen ernstig zieke indruk te maken, maar zijn lichaamstemperatuur was 40°C. Zijn rechterhand was rood met meerdere pijnlijke pustels en bloedingen (figuur 1, zie pag. 34). Over het hart was een graad II/VI systolisch geruis te horen passend bij mitralisinsufficiëntie. Laboratoriumonderzoek toonde een verhoogd C-reactief proteïne van 59 mg/l en een milde pancytopenie met een hemoglobinegehalte van 5,6 mmol/l, leukocyten van $2,0 \times 10^9/l$ en trombocyten van $91 \times 10^9/l$. De serologie voor hiv was negatief. Het serumcreatinine was met 200 µmol/l stabiel en een röntgenfoto van de rechterhand toonde geen aanwijzingen voor osteomyelitis. Transoesofageaal echografisch onderzoek van de hartkleppen toonde geen vegetaties. Oppervlakkige kweken van de handulcera en 11 bloedkweken bleven negatief. Er werd empirisch gestart met cefazoline (3 dd 1 gram) en ofloxacin (2 dd 200 mg) intraveneus en later overgestapt naar cefotaxim vanwege gebrek aan klinische respons en de voorgeschiedenis van *Nocardia*-infecties.

L. Mulder, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Hengelo, P. Pickkers, Afdeling Intensive Care, Radboudumc, Nijmegen, J.F. Meis, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Nijmegen en Afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Canisius Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen. Correspondentieadres: L. Mulder, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Postbus 516, 7550 AM Hengelo, e-mail: b.mulder@labmicta.nl

Ondanks deze therapie hield de koorts aan en namen de zweren van de hand geleidelijk toe. Na zes weken werd de patiënt overgeplaatst naar ons centrum. Een diepe biopsie van de rechterhand toonde zuurvaste bacillen met een typische gestreepte morfologie. Een PCR op *Mycobacterium tuberculosis* was negatief. De vervolgens uitgevoerde PCR op non-tuberculeuze mycobacteriën was positief voor *M. kansasii*. Anti-mycobacteriële therapie werd gestart, bestaande uit rifampicine, INH en ethambutol. Hierop daalde de koorts en verbeterden de huidlaesies en werd de patiënt twee weken later ontslagen uit het ziekenhuis. Weken later toonden mycobacteriële kweken van zowel bloed als weefselbiopsieën ook *M. kansasii* aan. De kweken bleven negatief voor *Nocardia*.

Een maand later werd de patiënt opnieuw opgenomen wegens koorts en intermitterende hoofdpijn. Vanwege een lage CRP-waarde werd eerst aan de diagnose genesmiddelenkoorts gedacht, maar onderbreking van toediening van respectievelijk INH en rifampicine leidde niet tot verbetering. Een röntgenfoto van de craniale sinussen toonde slijmvlieshypertrofie, waaruit vervolgens bipten werden afgenomen. Kweken waren negatief voor (myco) bacteriën, maar toonden overvloedige groei van *C. neoformans*: (serotype alfa D, AFLP2 type).² In vitro gevoeligheidsbepaling volgens CLSI (M27A3) leverde de volgende MRC's op: amfotericine B 0,25 mg/l; 5-flucytosine 8 mg/l; fluconazol 4 mg/l; itraconazol 0,031 mg/l; voriconazol 0,063 mg/l; posaconazol 0,063 mg/l. Tijdens zijn verblijf in het ziekenhuis werd de patiënt toenemend verward en een lumbaalpunctie toonde 42/3 cellen, met een eiwitgehalte van 934 mg/l en een glucose van 2,4 mmol/l. De cryptokokken-antigeentest was positief (1:64) en de kweek van cerebros핀ale vloeistof (CSF) toonde groei van *C. neoformans*. Behandeling werd gestart met liposomaal amfotericine B intraveneus (1 dd 3 mg/kg) en flucytosine oraal (1 dd 100 mg/kg); na twee weken werd de therapie vervangen door fluconazol 1 dd 400 mg oraal. Na zes weken behandeling waren liquoronderzoeken negatief, ook voor cryptokokkenantigeen en werd de antifungale behandeling gestaakt. Inmiddels schrijven de IDSA-richtlijnen een behandeling van zes maanden voor.³ Vier maanden later werd de patiënt opnieuw opgenomen met duizeligheidsklachten en loopstoornissen. Een cerebrale CT-scan vertoonde twee grote laesies, waarvan uit één laesie een biopsie volgde. Pathologisch onderzoek toonde een kwaadaardig B-cellymfoom. Alle immunosuppressieve therapie werd vervolgens gestopt. Een PCR voor detectie van Epstein-Barr virus was positief op de hersenbiopsie en liquor (afgenomen twee maanden vóór deze presentatie als controleliquor van cryptokokken-antigeentest), maar niet in de op het moment van diagnose afgenomen liquor. De patiënt overleed een maand nadat deze laatste diagnose werd gesteld.

Bespreking

Bij deze patiënt presenteerde zich een aantal zeldzame opportunistische infecties. Na de eerste gedocumenteerde infectie met *Nocardia asteroides* werd deze verwekker vermoed als de oorzaak van de terugkerende klinische problemen, bestaande uit koorts en ulcera van de hand, hoewel bloedkweken en oppervlakkige huidkweken negatief bleven. Dit leidde tot verder diagnostisch en therapeutisch tijdverlies. Pas na enkele weken werden diepe huidbipten uitgevoerd waarbij zuurvaste staven werden gezien, die typisch gestreepte morfologie hadden. In combinatie met het ziektebeeld werd de diagnose atypische mycobacteriële infectie gesteld.

Deze kenmerkende morfologie is beschreven als 99 procent specifiek voor *Mycobacterium kansasii*.^{4,5} Bij niertransplantatiepatiënten kunnen *Mycobacterium kansasii*-infecties zich presenteren met cutane manifestaties, artritis of pulmonale noduli.⁶ Opmerkelijk is dat de associatie tussen voorafgaande nocardiose en *Mycobacterium kansasii*-infectie al eerder is beschreven bij harttransplantatiepatiënten. Nocardiose was hierbij altijd meer dan twee jaar eerder gediagnosticeerd dan de *Mycobacterium kansasii*-infectie.⁷

Het is mogelijk dat de opportunistische infecties die na elkaar werden gediagnosticeerd, reeds bij de initiële presentatie aanwezig waren. Cryptokokkenmeningitis kan zich vrijwel symptomloos presenteren. Zijn beroep als kippenboer vormt hierbij een duidelijke risicofactor.⁸ Gezien het optreden van deze reeks van opportunistische infecties, zou men kunnen stellen dat de transplantatienier onmiddellijk had moeten worden opgegeven. Tot en met de huidinfectie, veroorzaakt door *Mycobacterium kansasii*, was de patiënt voortdurend in een relatief goede conditie geweest met, op het eerste gezicht, alleen goed behandelbare bijkomende infecties. De indrukwekkende reeks van ernstige levensbedreigende opportunistische infecties bij deze patiënt laat zien hoe ernstig zijn immuunsysteem onderdrukt werd en men zou kunnen stellen dat alle immunosuppressieve therapie eerder had moeten worden gestopt. Het is echter onduidelijk of hierdoor de overlevingskans van de patiënt zou zijn beïnvloed.

De figuur en referenties behorend bij deze casus zijn te vinden op pagina 34.

Cryptococcus en cryptokokkose – een epidemiologische en taxonomische update

F. Hagen, P.E. Verweij, A. van der Ende, W. Keijzer, A. Ott, G.A. Kampinga, J.F. Meis

Samenvatting

In Nederland komen infecties met de basidiomycete gist *Cryptococcus* relatief weinig voor. Hoewel vooral bekend als opportunistisch pathogeen bij immuungecompromiteerde patiënten, worden in toenemende mate infecties gerapporteerd bij immunocompetente individuen. Recentelijk is de taxonomie van het *C. gattii/C. neoformans* soortencomplex gereviseerd waarbij de twee *C. neoformans*-variëteiten elk tot separate soort zijn verheven en *C. gattii* is opgesplitst in vijf soorten overeenkomstig de bekende genotypen. Moleculaire karakterisatie van cryptokokken heeft tot nieuwe epidemiologische inzichten geleid waaruit is gebleken dat er van een zwart-wit onderverdeling van *C. neoformans* sensu lato- en *C. gattii* sensu lato-infecties in verschillende patiëntengroepen geen sprake meer is. *Cryptococcus gattii* s.l.-infecties zijn vooralsnog zeldzaam in Nederland, maar zowel autochtone als reis-gerelateerde casussen van deze voorheen tropische pathogeen zijn reeds gerapporteerd.

Trefwoorden

Cryptococcus gattii, *Cryptococcus neoformans*, epidemiologie, moleculaire typering, taxonomie, typering

Abstract

Infections with the basidiomycete yeast *Cryptococcus* are relatively infrequently reported in the Netherlands. Although it has been recognized as an opportunistic pathogen infecting immunocompromised patients, there is an increase of infections among immunocompetent individuals. The taxonomy of the *C. gattii/C. neoformans* species complex has recently been thoroughly revised, the two varieties of *C. neoformans* were each raised to the species level and five species were recognized within *C. gattii* according to the five known genotypes. Molecular characterization of cryptococci has led to new epidemiological findings which revealed that there is no longer a clear separation of *C. neoformans* and *C. gattii* infections among different patient groups. *Cryptococcus gattii* s.l. infections are still rare in the Netherlands, but both autochthonous and travel-related cases of this otherwise tropical pathogen have been reported.

Inleiding

Het genus *Cryptococcus* behoort tot de basidiomycetisten en omvat ruim 100 soorten waarvan slechts enkelen als pathogeen worden beschouwd.¹ De meeste cryptokokkeninfecties worden veroorzaakt door de soorten *Cryptococcus neoformans* en *C. gattii*. Daarnaast zijn er sporadische rapportages van infecties met *C. adeliensis*, *C. albidus*, *C. curvatus*, *C. flavescens*, *C. laurentii* en *C. uniguttulatus*.² In het milieu worden cryptokokken veelal geïsoleerd uit vogeluitwerpselen (vooral van duiven) en uit bloemen, planten en meer specifiek rottend plantenmateriaal.^{3,3} Zowel van vogeluitwerpselen als plantenmateriaal is aangetoond dat cryptokokken hun seksuele cyclus hierop kunnen voltooien waarbij vegetatieve gistcellen uiteindelijk hyfen vormen waarbij basidiosporen geproduceerd worden.^{4,5} In tegenstelling tot *Cryptococcus*-gistcellen kunnen de basidiosporen, met een diameter van circa 2 µm, wel tot in de longalveoli doordringen en het wordt aangenomen dat deze laatstgenoemde infecties veroorzaken ondanks dat de seksuele fase van *Cryptococcus* enkel waargenomen is bij kruisingsexperimenten.⁶ Het soortencomplex *C. gattii/C. neoformans* heeft recentelijk een taxonomische revisie ondergaan. Tot een decennium geleden werd *C. neoformans* in drie variëteiten

F. Hagen, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen, P.E. Verweij, Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Nijmegen, A. van der Ende, Afdeling Medische Microbiologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam en Referentielaboratorium voor Bacteriële Meningitis, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, W. Keijzer, Referentielaboratorium voor Bacteriële Meningitis, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam, A. Ott, Afdeling Medische Microbiologie, Certe, Groningen en Afdeling Medische Microbiologie, Universiteit van Groningen, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen, G.A. Kampinga, Afdeling Medische Microbiologie, Universiteit van Groningen, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen, J.F. Meis, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen en Afdeling Medische Microbiologie, Radboudumc, Nijmegen. Correspondentieadres: F. Hagen, Medisch Moleculair Microbioloog, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten C70, Weg door Jonkerbos 100, 6532 SZ Nijmegen, tel.: 024-365 7514, e-mailadres: f.hagen@cwz.nl en f.hagen@gmail.com

onderverdeeld: *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), var. *neoformans* (serotype D) en var. *gattii* (serotype B en C). Deze onderverdeling was hoofdzakelijk gebaseerd op epidemiologische en biochemische karakteristieken, zoals geografische verspreiding en het serotype.¹ Met de opkomst van moleculaire technieken werd duidelijk dat er meer diversiteit in het soortencomplex aanwezig is dan eerder werd verondersteld. Dit leidde er onder andere toe dat *C. neoformans* var. *gattii* tot een aparte soort werd verheven, logischerwijs *C. gattii* genaamd.^{7,8} Met behulp van de typeringstechnieken PCR-fingerprinting, pulsed-field gel-elektroforese (PFGE), amplified-fragment-length-polymorphism-fingerprinting (AFLP), microsatellietypering en multi-locus-sequence-typing (MLST) is er veel inzicht verkregen in de moleculaire epidemiologie van *Cryptococcus*.^{7,9,10} De combinatie van moleculaire, epidemiologische en ecologische data leverde voldoende bewijskracht om alle genotypen in het *C. gattii/C. neoformans*-soortencomplex als afzonderlijke soorten te beschrijven (tabel 1).¹ Bij het samenstellen van de nieuwe naamgeving voor elk van de zeven soorten is rekening gehouden met de kliniek, taxonomische regelgeving en het gebruik van moleculaire nomenclatuur. Het merendeel van de wereldwijd beschreven infecties (circa 90 procent) worden veroorzaakt door *C. neoformans* var. *grubii* (serotype A), in de huidige taxonomie is dit vereenvoudigd tot *C. neoformans*. Isolaten met het serotype D zijn bekend als *C. neoformans* var. *neoformans*. Deze variëteit is nu verheven tot de soort *C. deneoformans*, waarbij 'de-' refereert naar zowel het serotype als het ontnemen van de naam 'neoformans'. Grootste wijzigingen zijn er voor *C. gattii*. Deze soort is in de vernieuwde taxonomie opgesplitst in vijf soorten die qua naamgeving refereren naar 'gattii', overeenkomstig de vijf genotypen in *C. gattii* sensu lato (tabel 1). In het *Cryptococcus*-soortencomplex zijn diverse hybriden aangetroffen tussen de verschillende soorten waarbij de *C. neoformans* × *C. deneoformans* (serotype AD) hybride frequent wordt aangetroffen in de kliniek.¹⁷ Daarentegen zijn de hybriden *C. neoformans* × *C. gattii* s.s. (serotype AB) en *C. deneoformans* × *C. gattii* s.s. (serotype BD) tot op heden zelden aangetroffen in zowel klinisch als omgevingsmateriaal (tabel 1).¹⁷

Cryptococcus en aids

Sinds de opkomst van de aids-pandemie in de tachtiger jaren van de vorige eeuw is het aantal gevallen van schimmel- en gistinfecties sterk toegenomen, met name *Candida*, *Pneumocystis* en *C. neoformans* worden hierbij aangetroffen als opportunistische infecties.¹¹ Ondanks het feit dat wereldwijd het aantal *Cryptococcus*-infecties sterk afnam door de introductie van de 'highly active antiretroviral therapy' (HAART) zijn heden ten dagen invasieve schimmelinfecties bij hiv-positieve individuen nog steeds een onderkend probleem, vooral in niet-westerse

landen.¹²⁻¹⁴ Op basis van de gepubliceerde epidemiologische studies hebben Park en collega's becijferd dat jaarlijks bijna één miljoen hivgeïnfecteerden cryptokokkenmeningitis ontwikkelen, waarvan er jaarlijks circa 625.000, vooral in Sub-Sahara-Afrika, door de cryptokokkeninfectie overlijden.¹⁵

Tot circa tien jaar geleden rapporteerden epidemiologische studies dat cryptokokkeninfecties, veroorzaakt door *C. neoformans* (serotype A), voornamelijk werden aangetroffen bij individuen met een gecompromitteerd immuunsysteem. Infecties met *C. gattii* s.l. werden minder frequent gediagnosticeerd en vooral beschreven bij patiënten die ogenschijnlijk geen onderliggende afweersstoornis vertoonden. Deze zwart-witverdeling is echter op een hellend vlak komen te staan door diverse epidemiologische studies uit Oost-Azië waarbij 13 tot 92 procent van de bestudeerde patiënten met *C. neoformans*-infecties geen (bekende) onderliggende immunostoornis bleek te hebben. Ook in een cohort van Nederlandse patiënten was dit het geval bij bijna 10 procent van de bestudeerde casussen.¹⁶ Eenzelfde waarneming is er voor *C. gattii* s.l., de vijf genotypen in dit soortencomplex zijn recent tot soort verheven op basis van genetische verschillen, maar ook op basis van hun epidemiologische karakteristieken (tabel 1).¹ In Afrika wordt veelal het *C. gattii*-genotype AFLP7/VGIV (= *C. tetragattii*) aangetroffen bij hivpatiënten, terwijl in Mexico en de Verenigde Staten genotype AFLP5/VGIII (= *C. bacillisporus*) veel wordt aangetroffen bij hivgeïnfecteerden.^{17,18}

Gedurende de afgelopen jaren zijn er diverse immunologische factoren beschreven die geassocieerd kunnen worden met *C. gattii* s.l.-infecties bij individuen met een ogenschijnlijk goed functionerend immuunsysteem. Een recente studie beschrijft dat anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) autoantilichamen een risicofactor zijn voor een zenuwstelsel-gerelateerde *C. gattii* s.l.-infectie.¹⁹ Anti-GM-CSF-autoantilichamen werden in deze studie aangetroffen in plasma van 7 van de 30 ogenschijnlijk immunocompetente patiënten met meningo-encefalitis veroorzaakt door *C. gattii* s.l. en was afwezig bij 19 van de 20 gezonde controlepersonen. Saijo en collega's concludeerden dat GM-CSF mogelijk een rol speelt in de afweerreactie tegen *C. gattii* s.l.-infecties.¹⁹

Epidemiologie van cryptokokkose in Nederland

De eerste Nederlandse casus van *C. neoformans* stamt uit 1934. De Utrechtse neuroloog Hendrik W. Stenvers beschreef het fatale ziekteverloop van de infectie bij een voorheen gezonde man.²⁰ In de daaropvolgende drie decennia zijn er nog tien andere gevallen van cryptokokkeninfectie gedocumenteerd die in 1967 door Klokke zijn samengevat, waarbij de opmerking werd gemaakt dat door toename van antibiotica- en corticosteroidengebruik het aantal opportunistische (schimmel)infecties zal

Tabel 1. Taxonomische revisie van het *C. gattii*/*C. neoformans*-soortencomplex.

| Oude soort/ variëteitsnaam | Nieuwe soortnaam | Sero- type | AFLP- genotype ^g | PCR-finger- printing/ RFLP- genotype ^h | Epidemiologische cut-offwaarden (ECV) [µg/ml] ^{***} | | | | | | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|
| | | | | | AMB | 5FC | FLU | ITR | POS | VOR | ISA |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> ^a | <i>Cryptococcus neoformans</i> (sensu stricto) | A | AFLP1 | VNI | 0,5 | 8 | 8 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,12 |
| | | A | AFLP1A/ VNB ⁱ | VNII | 1 | 8 | 8 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,06 |
| | | A | AFLP1B | VNII | 1 | 8 | 8 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,06 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> ^b | <i>Cryptococcus deneoformans</i> | D | AFLP2 | VNIV | 1 | 16 | 16 | 0,5 | 0,25 | 0,12 | 0,06 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> inter- variety hybride | <i>Cryptococcus neoformans</i> × <i>Cryptococcus deneoformans</i> hybride | AD | AFLP3 | VNIII | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cryptococcus gattii</i> ^c | <i>Cryptococcus gattii</i> (sensu stricto) | B | AFLP4 | VGI | 0,5 | 4 | 8 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,25 |
| | <i>Cryptococcus bacillisporus</i> | C | AFLP5 | VGIII | 1 | 4 | 8 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,25 |
| | <i>Cryptococcus deuterogattii</i> | B | AFLP6 | VGII | 1 | 16 | 32 | 0,5 | 0,5 | 0,25 | 0,25 |
| | <i>Cryptococcus tetragattii</i> | C | AFLP7 | VGIV | 1 | 4 | 16 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,25 |
| | <i>Cryptococcus decagattii</i> | B | AFLP10 | VGIV*/ VGIIIc** | 1 | 4 | 16 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,25 |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> × <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP4/VGI hybride ^d | <i>Cryptococcus deneoformans</i> × <i>Cryptococcus gattii</i> hybride | BD | AFLP8 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> × <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP4/VGI hybride ^e | <i>Cryptococcus neoformans</i> × <i>Cryptococcus gattii</i> hybride | AB | AFLP9 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>grubii</i> × <i>Cryptococcus gattii</i> AFLP6/VGII hybride ^f | <i>Cryptococcus neoformans</i> × <i>Cryptococcus deuterogattii</i> hybride | AB | AFLP11 | - | - | - | - | - | - | - | - |

^a Geïntroduceerd voor serotype A-isolaten.⁴¹

^b Geïntroduceerd voor serotype D-isolaten.⁴¹

^c Geïntroduceerd om *C. neoformans* var. *gattii* tot aparte soort te verheffen.⁸

^d Beschreven door Bovers en collega's.⁴²

^e Beschreven door Bovers en collega's.⁴³

^f Beschreven door Amminejad en collega's.⁴⁴

^g Nomenclatuur gebaseerd op AFLP-genotypering.^{7,17}

^h PCR-fingerprinting en RFLP-gebaseerde nomenclatuur.¹⁰

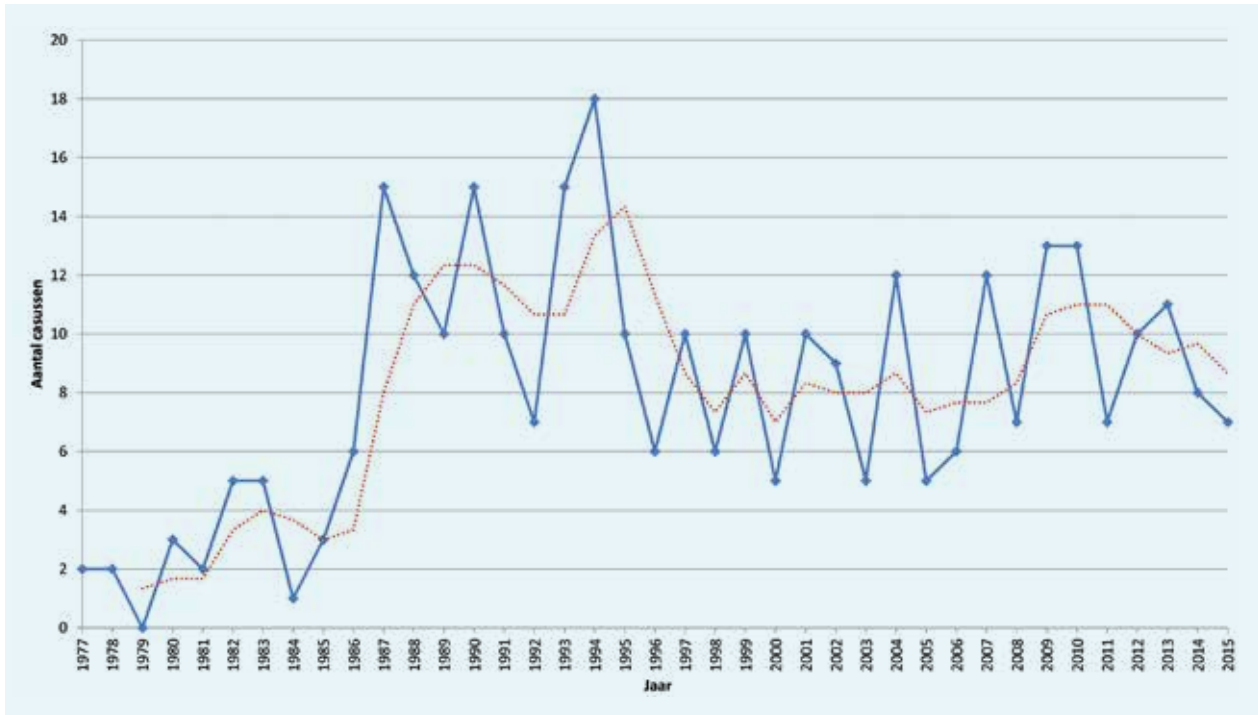
ⁱ Geïntroduceerde nomenclatuur voor een cluster Afrikaanse isolaten bevestigd dat dit gelijk is aan genotype AFLP1A.^{9,45}

* Vastgesteld op basis van eerdere PCR fingerprinting data.^{17,28}

** Vastgesteld op basis van MLST-data.¹⁸

***AMB = Amfotericine B, 5FC = 5-Fluorocytosine, FLU = Fluconazole, ITR = Itraconazole, POS = Posaconazole, VOR = Voriconazole, ISA = Isavuconazole, gebaseerd op gepubliceerde datasets.^{1,38-40}

Figuur 1. Gerapporteerde *Cryptococcus*-infecties in Nederland gedurende 1977-2015.



Het aantal gerapporteerde patiënten met een cryptokokkeninfectie per jaar. Het aantal infecties over 2015 is geëxtrapoleerd op basis van het aantal infecties bekend op 1 augustus 2015. De rode lijn geeft het zwevende gemiddelde aan over een periode van 3 jaar.

stijgen.²¹ In 1955 werd het antimycoticum amfotericine B ontdekt, wat in de jaren erna succesvol wordt toegepast in de behandeling van schimmelinfecties, inclusief cryptokokkenmeningitis, zoals beschreven in een Nederlandse casus uit 1969.²²

In 1982 wordt het ziektebeloop van de eerste twee Nederlandse aidspatiënten beschreven, waarbij bij de tweede casus cryptokokkenmeningitis werd vastgesteld.²³ De incidentie van cryptokokkeninfecties bij hivpositieve individuen is in de westerse wereld 5 tot 10 procent, terwijl dit in ontwikkelingslanden veel hoger ligt waarbij incidenties van 20 tot 40 procent zijn gerapporteerd.²⁴ Uit een epidemiologische studie bleek dat er bij de eerste honderd Nederlandse hivgeïnfecteerden er vier infecties met *Cryptococcus* waren vastgesteld.²⁵ In een daaropvolgende studie waarbij specifiek het voorkomen van schimmelinfecties bij hivgeïnfecteerden werd onderzocht, blijkt dat het jaarlijkse percentage cryptokokkeninfecties schommelt tussen de 4 tot 10 procent.²⁶ Door de introductie van HAART in 1996 is het aantal gevallen van cryptokokkose drastisch gedaald. In een Nederlandse patiëntencohort bleek het aantal *Cryptococcus*-infecties met 55 procent afgenomen te zijn (figuur 1).¹⁴

De meest recente epidemiologische studie naar cryptokokkose in Nederland is in 2012 gepubliceerd en beschrijft 300 *Cryptococcus*-isolaten geïsoleerd uit 237 patiënten in de periode 1997-2007.¹⁶ Genotypering door middel van AFLP-fingerprinting toonde aan dat 82 procent van

de stammen behoorde tot *C. neoformans* (serotype A; genotype AFLP1) en kleinere percentages tot *C. deneoformans* (12 procent; serotype D; genotype AFLP2) en *C. neoformans* × *C. deneoformans*-hybriden (5 procent; serotype AD; genotype AFLP3). Bij enkele patiënten werd retrospectief een *C. gattii* s.l.-infectie vastgesteld. Met MLST kon worden vastgesteld dat deze patiënten de 'tropische' latente infectie hadden opgelopen tijdens verblijf in (sub) tropische endemische gebieden waarna – soms wel jaren na terugkeer uit een endemisch gebied – een reactivatie van de *C. gattii* s.l.-infectie optrad bij een verminderde immunologische weerstand.^{16,27,28}

Op basis van verstrekte gegevens van het Nationaal Referentielaboratorium voor Bacteriële Meningitis (AMC/RIVM) en de diverse participerende academische en perifere medisch microbiologische laboratoria blijkt dat de afgelopen jaren het aantal gedocumenteerde cryptokokkeninfecties fluctueert rond de 8 tot 10 gevallen per jaar (figuur 1).

Uitbraken met *Cryptococcus gattii* sensu lato

Veterinair specialisten op Vancouver Island (British Columbia, Canada) bemerkten aan het begin van dit decennium een toename in het aantal cryptokokkeninfecties bij een variëteit van diersoorten. Niet veel later werd er ook een stijging in humane infecties gesignaleerd waarbij opviel dat het grotendeels immuuncompetente

individuen betrof. Door de cryptokokken te kweken op canavanine-glycerine-bromothymolblauw (CGB)-medium stelde men vast dat het om infecties door *C. gattii* s.l. ging. Verdere typering met behulp van PCR fingerprinting, RFLP en AFLP toonde aan dat deze uitbraak werd veroorzaakt door het zeldzame genotype AFLP6/VGII (= *C. deuterogattii*).²⁹ Sinds de opkomst van deze 'tropische' ziekteverwekker heeft de uitbraak zich steeds verder verspreid tot ver in British Columbia en in de nabij gelegen Amerikaanse staten Washington en Oregon, waarbij vele honderden voorheen gezonde bewoners – en toeristen – van dit gebied een infectie opliepen.^{27,30-32} Met behulp van verschillende moleculair biologische technieken en populatiebiologische analyses kon worden vastgesteld dat deze uitbraak niet door één maar door drie subgenotypen wordt veroorzaakt die hun herkomst hebben in het Amazone-regenwoud.³³

De vraag blijft hoe deze voorheen 'tropische' ziekteverwekker vanuit de subtropische en tropische klimaatzones de oversteek heeft weten te maken naar de gematigde klimaatzones. Wat opvalt is dat alle uitbraken met *C. deuterogattii* zich voor hebben gedaan in gebieden met een mediterraan zeeklimaat.³³ Ook in mediterraan Europa zijn er diverse autochtone infecties met *C. deuterogattii* bekend, maar het overgrote deel van de gerapporteerde infecties in Europa wordt veroorzaakt door *C. gattii* genotype AFLP4/VGI (= *C. gattii* s.s.). Recent is *C. gattii* s.s. zelfs gekweekt uit een boomholte in de regio Nijmegen. Verdere typering met behulp van MLST toonde aan dat de drie aldaar verkregen isolaten een uniek genotype hebben.³⁴ Dit suggereert dat zelfs in Nederland autochtone infecties met *C. gattii* s.s. potentieel mogelijk zijn, zoals blijkt uit een casus uit 1957 waarvan retrospectief de stam werd geïdentificeerd als zijnde *C. gattii* s.s. (CBS2502).^{28,35} Met dezelfde typeringmethode is een set van 100 Europese *C. gattii* s.l.-isolaten vergeleken met 200 isolaten van buiten Europa. Daaruit kwam naar voren dat infecties met *C. gattii* s.s. veelal voorkomen in mediterraan Europa en dat deze bijna allemaal lokaal opgelopen zijn. De klinische isolaten afkomstig uit de meer noordelijkere Europese landen hadden een hoge mate van genetische diversiteit vergeleken met mediterraan Europa.²⁸ Veelal kon de herkomst van het *C. gattii* s.l.-isolaat gelinkt worden aan de reishistorie van de patiënt, soms wel tot enkele decennia voor aanvang van de infectie.²⁸ Dit suggereert dat *C. gattii* s.l. niet langer als primair pathogeen gezien moet worden, maar ook als een opportunist die latent aanwezig kan blijven totdat de afweer dusdanig verzwakt is dat de infectie kan reactiveren.

Behandeling en antifungale gevoeligheid van cryptokokken

De eerste richtlijn uitgegeven door de Infectious Disease Society of America (IDSA) voor de behandeling van

cryptokokkeninfecties stamt uit 2000 en is 10 jaar later gereviseerd waarbij aanbevelingen zijn toegevoegd voor specifieke patiëntgroepen, maar ook voor infecties met *C. gattii* s.l.^{36,37} De IDSA-richtlijn voor de behandeling van cryptokokkeninfecties omvat een inductietherapie van ten minste twee weken bestaande uit amfotericine B en 5-fluycytosine met verschillende geadviseerde doses voor specifieke patiëntgroepen, gevolgd door consolidatietherapie met fluconazole voor minimaal acht weken.³⁶ Op basis van in vitro-gevoeligheidsdata van vele duizenden getypeerde *Cryptococcus*-isolaten zijn epidemiologische afkappaarden (ECVs) vastgesteld voor amfotericine B, 5-fluycytosine, fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole en isavuconazole.³⁸⁻⁴⁰ Veelal kon voor elk genotype in het *C. gattii*/*C. neoformans*-soortencomplex een ECV worden vastgesteld voor elk van de antifungale middelen. Dit is samengevat en bijgewerkt op basis van de gereviseerde taxonomie voor elk van de *Cryptococcus*-soorten en tevens weergegeven in tabel 1.¹

Conclusie

De incidentie van cryptokokkeninfecties in Nederland is sinds de introductie van HAART in 1996 afgenomen. Jaarlijks worden er circa 10 gevallen van cryptokokkenmeningitis gerapporteerd bij zowel immuun-gecompromitteerde als -competente individuen. De opkomst van moleculaire technieken heeft er mede toe geleid dat de genotypen in het *C. gattii*/*C. neoformans*-soortencomplex recent zijn verheven tot separate soorten. In Nederland zijn er de afgelopen jaren diverse (reisgerelateerde) infecties met *C. gattii* s.l. vastgesteld. Deze dienen veelal intensiever behandeld te worden. Naast de conventionele kweek-gebaseerde diagnostiek zijn er een scala aan moleculair-diagnostische technieken voorhanden om cryptokokkeninfecties aan te tonen en tevens te typeren, wat van belang kan zijn bij de behandeling.

Referenties

1. Hagen F, Khayhan K, Theelen B, Kolecka A, Polacke I, Sionov E, et al. Recognition of seven species in the *Cryptococcus gattii*/*Cryptococcus neoformans* species complex. *Fungal Genet Biol* 2015;78:16-48.
2. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:76-98.
3. Chowdhary A, Randhawa HS, Prakash A, Meis JF. Environmental prevalence of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in India: an update. *Crit Rev Microbiol* 2012;38:1-16.
4. Nielsen K, De Obaldia AL, Heitman J. *Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization. *Eukaryot Cell* 2007;6:949-59.
5. Xue C, Tada Y, Dong X, Heitman J. The human fungal pathogen *Cryptococcus* can complete its sexual cycle during a pathogenic association with plants. *Cell Host Microbe* 2007;1:263-73.
6. Velagapudi R, Hsueh YP, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 2009;77:4345-55.

7. Boekhout T, Theelen B, Diaz M, Fell JW, Hop WC, Abeln EC, et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* 2001;147:891-907.
8. Kwon-Chung KJ, Boekhout T, Fell JW, Diaz M. (1557) Proposal to conserve the name *Cryptococcus gattii* against *C. hondurians* and *C. bacillisporus* (Basidiomycota, Hymenomycetes, Tremellomycetidae). *Taxon* 2002;51:804-6.
9. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Boekhout T. Six monophyletic lineages identified within *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* by multi-locus sequence typing. *Fungal Genet Biol* 2008;45:400-21.
10. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med Mycol* 2009;47:561-70.
11. Rosen FS. The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *J Clin Invest* 1985;75:1-3.
12. Armstrong-James D, Meintjes G, Brown GD. A neglected epidemic: fungal infections in HIV/AIDS. *Trends Microbiol* 2014;22:120-7.
13. Dromer F, Mathoulin-Pélissier S, Fontanet A, Ronin O, Dupont B, Lortholary O. Epidemiology of HIV-associated cryptococcosis in France (1985-2001): comparison of the pre- and post-HAART eras. *AIDS* 2004;18:555-562.
14. Van Elden LJ, Walenkamp AM, Lipovsky MM, Reiss P, Meis JF, de Marie S, et al. Declining number of patients with cryptococcosis in the Netherlands in the era of highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 2000;14:2787-88.
15. Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 2009;23:525-530.
16. Hagen F, Illnait-Zaragoza MT, Meis JF, Chew WH, Curfs-Breuker I, Mouton JW, et al. Extensive genetic diversity within the Dutch clinical *Cryptococcus neoformans* population. *J Clin Microbiol* 2012;50:1918-26.
17. Hagen F, Illnait-Zaragoza MT, Bartlett KH, Swinne D, Geertsens E, Klaassen CH, et al. In vitro antifungal susceptibilities and amplified fragment length polymorphism genotyping of a worldwide collection of 350 clinical, veterinary, and environmental *Cryptococcus gattii* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5139-45.
18. Springer DJ, Billmyre RB, Filler EE, Voelz K, Pursall R, Mieczkowski PA, et al. *Cryptococcus gattii* VGIII isolates causing infections in HIV/AIDS patients in Southern California: identification of the local environmental source as arboreal. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004285.
19. Saijo T, Chen J, Chen SC, Rosen LB, Yi J, Sorrell TC, et al. Anti-granulocyte-macrophage colony-stimulating factor autoantibodies are a risk factor for central nervous system infection by *Cryptococcus gattii* in otherwise immunocompetent patients. *mBio* 2014;5:e00912-14.
20. Stenvers HW. Torula-infectie van het centrale zenuwstelsel. *Ned Tijdschr Geneesk* 1934;78:3361-67.
21. Klokke AH. General cryptococcosis with skin ulceration in an Indian woman. *Clinical, mycological and epidemiological studies*. *Ned Tijdschr Geneesk* 1967;111:1748-54.
22. Boone RM. A case of torula meningitis. *Ned Tijdschr Geneesk* 1969;113:1430-3.
23. Zegerius L, Speelman JD. Cryptococcal meningitis, herpes genitalis and oral candidiasis in a homosexual man with acquired immunodeficiency. *Ned Tijdschr Geneesk* 1983;127:817-20.
24. Jarvis JN, Harrison TS. HIV-associated cryptococcal meningitis. *AIDS* 2007;21: 2119-29.
25. Danner SA, Eeftinck Schattenkerk JK, Lange JM, van Steenwijk RP, de Gans J, Menardi TR. Disease symptoms and clinical course in the first 100 patients with AIDS. *Ned Tijdschr Geneesk* 1987;131:1474-81.
26. Van 't Wout JW, Kullberg BJ, Meis JF, Reiss P. Yeast infections in patients with immunologic disorders. *Ned Tijdschr Geneesk* 1995;139:1430-6.
27. Hagen F, van Assen S, Luijckx GJ, Boekhout T, Kampinga GA. Activated dormant *Cryptococcus gattii* infection in a Dutch tourist who visited Vancouver Island (Canada): a molecular epidemiological approach. *Med Mycol* 2010;48:528-31.
28. Hagen F, Colom MF, Swinne D, Tintelnot K, Latta R, Montagna MT, et al. Autochthonous and dormant *Cryptococcus gattii* infections in Europe. *Emerg Infect Dis* 2012;18:1618-24.
29. Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17258-63.
30. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Epidemiologic differences between the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. *Am J Epidemiol* 1984;120:123-30.
31. Lindberg J, Hagen F, Laursen A, Stenderup J, Boekhout T. *Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver Island, Canada. *Emerg Infect Dis* 2007;13:178-9.
32. Lockhart SR, Iqbal N, Harris JR, Grossman NT, DeBess E, Wohrle R, et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: genotypic diversity of human and veterinary isolates. *PLoS One* 2013;8:e74737.
33. Hagen F, Ceresini PC, Polacheck I, Ma H, van Nieuwerburgh F, Gabaldón T, et al. Ancient dispersal of the human fungal pathogen *Cryptococcus gattii* from the Amazon rainforest. *PLoS One* 2013;8:e71148.
34. Chowdhary A, Randhawa HS, Boekhout T, Hagen F, Klaassen CH, Meis JF. Temperate climate niche for *Cryptococcus gattii* in Northern Europe. *Emerg Infect Dis* 2012;18:172-4.
35. Janssens J, Beetstra A. Torulosis bij een zwangere vrouw, met lokalisatie in de longen. *Ned Tijdschr Geneesk* 1957;101:824-6.
36. Perfect JR, Dismukes WE, Dromer F, Goldman DL, Graybill JR, Hamill RJ, et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2010;50:291-322.
37. Saag MS, Graybill RJ, Larsen RA, Pappas PG, Perfect JR, Powderly WG, Sobel JD, Dismukes WE. Practice guidelines for the management of cryptococcal disease. *Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis* 2000;30:710-8.
38. Espinel-Ingroff A, Aller AI, Canton E, Castañón-Olivares LR, Chowdhary A, Córdoba S, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for fluconazole, itraconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:5898-906.
39. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Fothergill A, Fuller J, Hagen F, et al. *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex: an international study of wild-type susceptibility endpoint distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B and flucytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:3107-13.
40. Espinel-Ingroff A, Chowdhary A, Gonzalez GM, Guinea J, Hagen F, Meis JF, et al. Multicenter study of isavuconazole MIC distributions and epidemiological cutoff values for the *Cryptococcus neoformans-Cryptococcus gattii* species complex using the CLSI M27-A3 broth microdilution method. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:666-8.
41. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietal status for *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999;37:838-40.
42. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Diaz MR, Spanjaard L, Dromer F, et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *FEMS Yeast Res* 2006;6:599-607.
43. Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, et al. AIDS patient death caused by novel *Cryptococcus neoformans* x *C. gattii* hybrid. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1105-8.
44. Aminnejad M, Diaz M, Arabatzis M, Castañeda E, Lazera M, Velegraki A, et al. Identification of novel hybrids between *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* VNI and *Cryptococcus gattii* VGII. *Mycopathologia* 2012;173:337-46.
45. Litvitseva AP, Thakur R, Vilgaly R, Mitchell TG. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 2006;172:2223-38.

Casuïstiek: keratomyose bij contactlensdragers

A.C.G. Voordouw, E.J. Kuijper, Y.Y.Y. Cheng, H.F. Wunderink

Samenvatting

Fungale hoornvliesontsteking of keratomyose is een zeldzaam optredende complicatie bij contactlensdragers. Eerder dit jaar werd in het signaleringsoverleg een toename van patiënten met keratomyose bij het gebruik van (zachte) contactlenzen gemeld.¹ Dit artikel beschrijft twee patiënten met een keratomyose veroorzaakt door *Fusarium oxysporum* en *Aspergillus fumigatus* bij dragers van zachte contactlenzen. Daarnaast wordt aandacht besteed aan de epidemiologie, de diagnostiek en de behandeling van deze infecties.

Abstract

Fungal keratitis or keratomycosis is an uncommon infectious complication of contact lens wear. Earlier this year a public health alert was published reporting an increased frequency of cases of fungal keratitis in the Netherlands possibly associated with soft contact lenses. In this article we describe two patients with fungal keratitis caused by *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus fumigatus* associated with soft contact lenses, and discuss the epidemiology, diagnosis and treatment of these infections.

Inleiding

Microbiële keratitis, een potentieel ernstig verlopende infectie van de cornea, wordt zelden gezien bij een gezond en onbeschadigd oog.² Het spectrum van veroorzakende micro-organismen varieert met wisselende klimatologische en predisponerende factoren. In een gematigd klimaat zijn dit meestal grampositieve bacteriën, waaronder *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, coagulase-negatieve stafylokokken (postoperatief), *Propionibacterium acnes* (postoperatief), maar ook gramnegatieve bacteriën zoals *Pseudomonas aeruginosa* (in contactlensdragers), schimmels, *Acanthamoeba* spp. en verschillende virussen waaronder HSV, VZV en Adenovirus.^{2,3,4}

De belangrijkste risicofactoren voor het optreden van keratomyose bij gezonde volwassenen zijn microtraumata en het dragen van contactlenzen.⁵

Naast gisten worden tegenwoordig in toenemende mate *Fusarium* spp. en *Aspergillus* spp. gerapporteerd.^{2,6} Dit artikel beschrijft twee recente gevallen van keratomyose bij jonge gezonde contactlensdragers die zich presenteerden met een acuut beeld en goed reagerend op lokale antimycotica.

Casuïstiek

Casus 1

Een 21-jarige vrouw met een blanco voorgeschiedenis werd in mei 2015 op de SEH gezien met een sinds die ochtend bestaande roodheid en pijn van het linkeroog. De patiënte droeg zachte maandcontactlenzen en meldde dat het lenzendoosje een dag eerder nog werd schoongemaakt. Meer informatie omtrent algemene hygiëne van lenzen en het contactlensdoosje is niet verkregen. Oogheelkundig onderzoek liet twee kleine cornea-infiltraten zien zonder duidelijk epitheeldefect en bij verdenking op een infectieuze keratitis werd een corneaschraapsel afgenomen. Diagnostiek naar banale verwekkers, schimmels, Acanthamoeben en virussen werd ingezet. Tevens werd de lenzenvloeistof uit het doosje en de fles ingezet voor kweek (tabel 1). Bij verdenking op een bacteriële of Acanthamoeba-keratitis werd empirisch met lokale antimicrobiële therapie gestart: propamidine-isetonate, chloorhexidine 0,02 procent, gentamicine 3 mg/ml en ofloxacin 3 mg/ml.

Na drie dagen incubatie groeide er op de bloedplaat een schimmel. Microscopisch werden gesepteerde hyfen en 'banaan'-vormige macroconidia met drie segmenten gezien, verdacht voor *Fusarium* spp. (figuur 1), waarop is gestart met topicaal amfotericine B 0,25 procent + voriconazol 1 procent eenmaal per uur. Uit het corneaschraapsel werden geen andere micro-organismen gekweekt. De kweek van de vloeistof uit het lenzenbakje toonde echter naast een *Fusarium* spp. ook *Klebsiella oxytoca*, *Rhodotorula mucilaginosa* en *Candida guilliermondii*. Daarnaast was ook de PCR voor herpes simplexvirus type 1 positief in deze lenzenvloeistof (Ct 32,1). De lenzenvloeistof uit de fles bleef steriel. De *Fusarium* spp. is opgestuurd naar het mycologisch referentielaboratorium in Nijmegen voor typering en gevoeligheidsbepaling en naar het Centraal Bureau voor Schimmelcultures

A.C.G. Voordouw, E.J. Kuijper, H.F. Wunderink, Afdeling Medische Microbiologie, LUMC, Leiden
 Y.Y.Y. Cheng, Afdeling Oogheelkunde, LUMC, Leiden.
 Correspondentieadres: H.F. Wunderink, LUMC, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 9600, 2300 RC, Leiden.

Tabel 1. Microbiologische bevindingen casus 1 en casus 2

| | Corneaschraapsel | Vloeistof lenzenbakje | Vloeistof flesje | MIC (mg/l) |
|---------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Casus 1 | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Fusarium</i> spp. <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Rhodotulora mucilaginosa</i> <i>Candida guilliermondii</i> HSV 1 (Ct 32.1) | Geen groei | AMB: 0,5 ITR: 16 VOR: 4 POS >16 ISA 16 ANI >16 CAS >32 |
| Casus 2 | <i>Aspergillus fumigatus</i> | <i>Aspergillus</i> spp. (waarschijnlijk <i>A. fumigatus</i>) | Geen groei | AMB: 1 VOR: 0,5 POS: 0,125 CAS: 0,25 |

HSV1: herpes simplexvirus 1; MIC: minimum inhibitory concentration, AMB: amfotericine B, ITR: itraconazol, VOR: voriconazol, POS: posaconazol, ISA: isavuconazol, ANI: anidulafungin, CAS: caspofungin

(CBS) in Utrecht voor typering. Beiden centra typeerden de stam als *F. oxysporum*. Wegens de *K. oxytoca* uit de lenzenvloeistof werden de gentamicine- en ofloxacin-oogdruppels vier weken gecontinueerd, chloorhexidine is na twee weken gestaakt. De HSV-1, *R. mucilaginosa* en *C. guilliermondii* uit het lenzenbakje werden als niet relevant beschouwd. De laatste twee hadden een MIC van 0,064 mg/l voor voriconazol. Behandeling met amfotericine B en voriconazol werd gedurende 15 weken gecontinueerd. Drie weken na het staken van de medicatie was er sprake van een rustig litteken en geen verdere klachten.

Casus 2

Een 18-jarige man met een blanco voorgeschiedenis presenteerde zich augustus 2015 bij de polikliniek oogheelkunde met sinds 2 dagen bestaande klachten aan het rechter oog. Hij droeg zachte maandcontactlenzen en meldde dat de huidige lenzen al 6 weken in gebruik

waren. Meer informatie omtrent algemene hygiëne van lenzen en contactlensdoosje werd niet verkregen. Bij oogheelkundig onderzoek was een epitheeldefect met een stroomaal infiltraat te zien met sprieterige uitlopers (figuur 2). Wegens de klinische diagnose infectieuze keratitis werd een corneaschraapsel afgenomen voor diagnostiek van banale verwekkers, schimmels, Acanthamoeben en virussen. Ook de lenzenvloeistof uit het doosje en de fles werden ingezet voor kweek. Bij verdenking op een bacteriële keratitis werd gestart met topicaal gentamicine 1,4 procent en cefazoline 50 mg/ml druppels, chlooramfenicol 10 mg oogzalf en oraal voriconazol 200 mg. In een natief preparaat werden schimmeldraden gezien, waarop gestart werd met topicaal amfotericine B 0,25 procent + voriconazol 1 procent eenmaal per uur. Na twee dagen incubatie groeide er een schimmel op de Sabouraud-plaat bij 25°C. Microscopisch werden uniseriate en columnaire 'hoofdjes' gezien, passend bij *Aspergillus fumigatus* en later bevestigd in het mycologisch referentielaboratorium. Het isolaat bleek gevoelig voor voriconazol. Ook in de vloeistof van het lenzenbakje groeide *A. fumigatus*. Er werden geen andere micro-organismen geïsoleerd. Na een maand behandelen was het epitheel gesloten. Oraal voriconazol werd na vijf weken gestaakt en topicaal voriconazol na drie maanden. De patiënt heeft geen klachten meer.

Figuur 1. Casus 1: plakbandpreparaat in lactophenol-blauw kleuring, 400x vergroting



Beschouwing

In korte tijd presenteerden zich in het LUMC twee dragers van zachte, maandelijks te vervangen contactlenzen met een keratomycose. In beide gevallen werd de veroorzakende schimmel, respectievelijk *F. oxysporum* en *A. fumigatus*, ook uit de vloeistof van het lenzenbakje gekweekt, maar niet in de vloeistof uit de originele lenzenvloeistoffles. Dit suggereert dat vooral de toepassing van hygiëne bij het gebruik van de contactlenzen bij deze twee patiënten een belangrijke rol heeft gespeeld bij het veroorzaken van de ontsteking. De soorten lenzen die werden gebruikt en de

Figuur 2. Spleetlampfoto's van casus 2. Fungale keratitis met multipale spietterige midstromale infiltraten.



samenstelling van de gebruikte lenzenvloeistoffen waren niet meer te achterhalen.

Keratomyosen worden wereldwijd gerapporteerd, waarbij de filamenteuze schimmels vooral voorkomen in gebieden met een tropisch of subtropisch klimaat en gisten vaker in gebieden met een gematigd klimaat.² Filamenteuze schimmels kunnen het intacte cornea-epitheel niet passeren en risicofactoren voor keratomyose zijn dan ook lokaal trauma, oculaire chirurgie, oppervlakkige oogziekten, gebruik van corticosteroiden en het dragen van contactlenzen.⁷

De causale relatie tussen het gebruik van zachte contactlenzen en het vaker voorkomen van keratomyose is niet eenduidig, maar gesuggereerd wordt dat hechting van de lenzen aan het cornea-epitheel (grotere kans op microtraumata), het herhaald gebruik van de lenzen, contaminatie van de lenzenvloeistof en de hechting van schimmels aan de zachte contactlens een rol spelen.⁴ Bij een patiënt-controleonderzoek met 164 patiënten in de VS werd een verband gelegd tussen een epidemische verheffing van keratitis door *Fusarium* met een bepaald merk contactlensvloeistof, welke inmiddels van de markt is gehaald.⁸ Analyse van 39 isolaten toonde een grote genetische diversiteit van 30 isolaten in het *F. Solani*-complex en 7 in het *F. Oxysporum*-complex. Jurkunas et al. rapporteren vervolgens een verdere absolute toename van

filamenteuze schimmels als veroorzaker van keratitis, met name *Fusarium* spp.⁶

Er zijn geen recente data beschikbaar over het voorkomen van keratomyose in Nederland. Een studie naar microbiële keratitis in 1996 rapporteerde een jaarlijkse incidentie van 1,1/10.000 bij contactlensgebruikers.⁹ Bij geen van deze patiënten werd een schimmel gekweekt. In Denemarken wordt de jaarlijkse incidentie van keratomyose op tenminste 0,6/miljoen inwoners geschat.¹⁰

In het LUMC is in de periode van 2010 tot 2015 bij 176 patiënten een corneaschraapsel afgenomen. Bij 11 patiënten (6 procent) werd een schimmel of gist gekweekt. Hiervan waren er 6 contactlensdragers (55 procent). Opmerkelijk is dat 6 van de 11 patiënten met keratomyose in 2014 of de eerste helft van 2015 zijn gediagnosticeerd. Een duidelijke seizoensinvloed kon bij deze kleine aantallen niet worden vastgesteld. Of dit betekent dat er sprake is van een toenemend probleem zal uit meer systematisch onderzoek moeten blijken.

Aspergillus spp. en *Fusarium* spp. zijn wereldwijd de belangrijkste veroorzakers van keratomyose.^{4,6} De schimmels komen voor in grond, op planten en in kraanwater. Vermoedelijk dient een defect in het corneaepitheel als 'porte d'entree', omdat filamenteuze schimmels het intacte epitheel niet kunnen passeren. Na traumata ontwikkelen de conidia zich in het stroma tot hyfen en bij contactlenzen kan deze ontwikkeling mogelijk ook plaatsvinden op de lens zelf of in de lenzenvloeistof met inoculatie van de hyfen bij het aanbrengen van de lens op het oog.¹¹ De hyfen penetreren vervolgens de basale membraan van Descemet, waarna infectie kan optreden van de voorste oogkamer met ernstige pijn, fotofobie en visusverlies tot gevolg.¹¹ De eventuele rol van mycotoxinen is onduidelijk.

Bij verdenking op een keratomyose is goede diagnostiek een vereiste. Voor optimale diagnostiek wordt het corneaschraapsel direct na afname met een steriele pincet geïnoculeerd op de kweekmedia.

De microbiologische diagnostiek richt zich direct na afname van het corneaschraapsel met name op de directe microscopie met een gram- en blankophor-preparaat om zo snel mogelijk een eerste indruk van de verwekker te krijgen.¹²

Naast bloed- en chocolade-media wordt in het LUMC altijd een Sabouraud met chlooramphenicol/gentamicine-plaat bij 25°C ingezet (alle van bioMérieux) voor de isolatie van schimmels en gisten.

Geïsoleerde schimmelstammen worden daarnaast voor typering en gevoeligheidsbepaling opgestuurd naar het mycologisch referentielaboratorium in Nijmegen en in enkele gevallen ook naar het CBS in Utrecht.

Er is weinig onderbouwing voor de optimale behandeling van keratomyose.¹³ De SWAB adviseert empirisch topicaal amfotericine B 0,5 tot 1 procent. In de literatuur worden

ook concentraties tussen 0,15 tot 0,5 procent gerapporteerd.^{2,5} Gezien de a priori-kans op verminderde gevoeligheid voor amfotericine B, wordt bij de verdenking van keratomyose ten gevolge van *Fusarium* spp. in de empirie vaak gecombineerde therapie met voriconazol overwogen, mede aangezien de effectiviteit van voriconazol bij *Fusarium* spp. onafhankelijk lijkt van de in vitro gemeten gevoeligheid.¹⁴

Conclusie

Keratomyose is een zeldzame maar ernstige complicatie bij dragers van (zachte) contactlensen, waarbij *Fusarium* spp. steeds frequenter worden aangetroffen. In de afgelopen 5 jaar werd in het LUMC bij 11 patiënten een keratomyose gediagnosticeerd, waarvan bij 5 patiënten veroorzaakt door *Fusarium* spp. en bij 3 patiënten ten gevolge van *Aspergillus* spp. Bij een keratitis en in het bijzonder bij een keratitis niet reagerend op antibiotica, dient gedacht te worden aan een keratomyose en dient er gerichte diagnostiek plaats te vinden aangezien *Fusarium* spp. in toenemende mate als veroorzakend micro-organisme wordt geïsoleerd en dit adequate behandeling vereist.

Referenties

1. Verweij P. Verheffing van *Fusarium*-keratitis in verschillende ziekenhuizen. Signaleringsoverleg 25 juni 2015, nr.2675 http://signaleringsoverleg.infectieziekten.eu/signalen/launcher.php?action=signal_view&id=3712.
2. Stapleton F, Carnt N. Contact lens-related microbial keratitis: how have epidemiology and genetics helped us with pathogenesis and prophylaxis. *Eye* 2012;26:185-93.
3. Baron EJ, Thomson RB. 2011. Specimen Collection, Transport and Processing: Bacteriology, p. 228-271. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 2011, 10th ed. ASM Press, Washington DC.
4. Barnes SD, Pavan-Langston D, Azar DT. Microbial Keratitis, p. 1539-1552. In: Mandell, Douglas, Bennett's. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 2010, 7th ed. Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia.
5. Srinivasan M. Fungal keratitis. *Curr Opin Ophthalmol* 2004;15:321-7.
6. Jurkunas U, Behlau I, Colby K. Fungal keratitis: changing pathogens and risk factors. *Cornea* 2009;28:6:638-43.
7. Thomas PA. Mycotic keratitis: epidemiology, diagnosis and management. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:210-20.
8. Chang DC, Grant GB, O'Donnell K, Wannemuehler KA, Noble-Wang J, Rao CY, et al. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA* 2006;296:953-63.
9. Cheng KH, Leung SL, Hoekman HW, Beekhuis WH, Mulder PG, Geerards AJ, et al. Incidence of contact-lens-associated microbial keratitis and its related morbidity. *Lancet* 1999;354:181-5.
10. Nielsen SE, Nielsen E, Julian HO, Lindegaard J, Højgaard K, Ivarsen A, et al. Incidence and clinical characteristics of fungal keratitis in a Danish population from 2000 to 2013. *Acta Ophthalmol* 2015;93:1:54-8.
11. Leal SM Jr, Pearlman E. The role of cytokines and pathogen recognition molecules in fungal keratitis – Insights from human disease and animal models. *Cytokine* 2012;58:107-11.
12. Punia RS, Kundu R, Chander J, Arya SK, Handa U, Mohan H. Spectrum of fungal keratitis: clinicopathologic study of 44 cases. *Int J Ophthalmol* 2014;7:114-7.
13. FlorCruz NV, Evans JR. Medical interventions for fungal keratitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;4:CD004241.
14. Sun CQ, Lalitha P, Prajna NV, Karpagam R, Geetha M, O'Brien KS, et al. Association between in vitro susceptibility to natamycin and voriconazole and clinical outcomes in fungal keratitis. *Ophthalmology* 2014;121:8:1495-500.

Het polio-eradicatieprogramma 'one gone, two to go'

A.C.G. Voordouw

Sinds 1988 is het 'Global Polio Eradication Initiative' van kracht met als doel polio de wereld uit te helpen. Dit groot-schalige programma heeft ertoe geleid dat in 2015 de detectie van 'wild type' poliovirus type 1 (PV1) was teruggebracht tot 51 individuen in Pakistan en Afghanistan, de enige nu nog endemische landen ter wereld. De laatste detectie van PV3 dateert uit 2012 en van PV2 uit 1999. In verschillende landen waren er nog wel uitbraken van vaccinstammen van poliovirus (VDPV), vooral type 1 en 2.

In september 2015 heeft het 'Global Certification Committee' (GCC) van het 'Global Polio Eradication Initiative' besloten dat wild poliovirus type 2 (WPV2) is uitgeroeid. Dit betekent dat het risico op PV2-infectie nu alleen nog maar gerelateerd is aan toediening van de levend verzwakte 'Sabin' PV2-stam in het oraal poliovaccin (OPV). Het is daarom dat op korte termijn de 'Sabin' PV2-stam uit het OPV gehaald zal worden. Op 20 oktober 2015 heeft de WHO dan ook besloten dat dit per 16 april 2016 wereldwijd geïmplementeerd moet worden. Momenteel wordt in Europa alleen in Polen nog het trivalente OPV (tOPV) gebruikt. In andere landen is het tOPV al jaren niet meer beschikbaar. De kans op detectie van VDPV2 in Nederland lijkt minimaal, echter import kan nog niet uitgesloten worden.

Tijdens de 14^{de} 'WHO/UNICEF Consultation with OPV & IPV Manufacturers and National Regulatory Authorities' werden de consequenties op korte en langere termijn hiervan besproken en de plannen voor onder andere vaccinproductie en vaccinatieprogramma's.¹ In de praktijk betekent dit dat in de periode van 17 april tot 1 mei 2016 in totaal 194 landen (waarvan 148 nog een actief OPV-programma hebben) hun tOPV op een door het land vastgestelde dag moet inwisselen voor het bivalente OPV.

Deze zogenaamde 'nationale switch dag' vergt een lange en secure voorbereiding. In de aanloop hier naartoe moeten de voorraden tOPV langzaam afgebouwd worden om minimale restanten over te houden. Twee weken na de switch volgt in al deze landen een nationale validatiedag. Op die dag moeten de restanten tOPV gedocumenteerd vernietigd zijn, aangezien alle voorraden levend verzwakt PV2 een potentieel risico vormen voor de volksgezondheid.

De consequentie van de eradicatie van PV2 is ook dat alle PV2-isolaten vernietigd of uiterst beveiligd opgeslagen moeten worden. De maatregelen om ervoor te zorgen dat PV2 alleen binnen een beperkt aantal vooraf gemarkeerde laboratoria beschikbaar blijft, zijn vastgelegd in het zogenaamde

Global Action Plan III (GAPIII) van de WHO.² GAP III voorziet zowel in het selecteren van de voor de bereiding van poliovaccin essentiële laboratoria, als in de vernietiging of verplaatsing van PV2 naar deze laboratoria en in maatregelen om onverwachte verspreiding vanuit deze laboratoria en de consequenties hiervan te minimaliseren ('containment'). Voor wild type PV2 zijn deze maatregelen al sinds eind 2015 van kracht; voor Sabin-PV2 is de doelstelling eind 2016.

De gevolgen van GAP III voor diagnostische surveillance zijn besproken tijdens de 21^{ste} 'Informal Consultation on the Global Polio Laboratory Network'.³ De toegewezen laboratoria voor diagnostiek, surveillance en biorisk-minimalisatie hebben een belangrijke rol in het uitvoeren van de maatregelen binnen GAP III. Deze omvatten onder andere snelle identificatie van transmissie in endemische gebieden, signaleren van import van nieuwe virussen, detectie van VDPV en surveillance van de eliminatie van OPV2. De laboratoria hebben ook een belangrijke rol in het vervolgen van de effectiviteit van de inperkingsmaatregelen.

De dagelijkse praktijk van onze microbiologische laboratoria zal door het verdwijnen van PV2 uit OPV niet veranderen. Diagnostiek en maatregelen bij verdenking van polio-infectie blijven hetzelfde conform de LCI-richtlijn.⁴ Voor Nederland is het RIVM verantwoordelijk voor surveillance. Het is tevens aanwezig als het verantwoordelijk laboratorium van kwaliteitsrondzendingen voor de WHO.

De volgende transmissieroute wordt geschreven door Marja Konstantinovski, AIOS medische microbiologie LUMC, op stage in New York.

Referenties

1. http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame_objective2/oral_polio_vaccine/implementation/en/
2. http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/PostEradication/GAPIII_2014.pdf
3. http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/GPLN_publications/GPLN_Meeting_recommendations_2015.pdf
4. LCI-richtlijn poliomyelitis anterior acuta. <http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:13845&type=org&disposition=inline>

Correspondentieadres: A.C.G. Voordouw, AIOS aan het Laboratorium Medische Microbiologie, LUMC en senior klinisch beoordelaar infectieziekten College ter Beoordeling van Geneesmiddelen (CBG), e-mail: A.C.G.Voordouw@lumc.nl

Start derde landelijke sero-epidemiologisch onderzoek (Pienter3)

L. Mollema, H.E. de Melker, E.M. Swart, Y.W.M. van Weert, F.R. van der Klis

Samenvatting

In februari 2016 is het derde landelijke sero-epidemiologisch onderzoek (Pienter3) gestart. In de twee eerdere onderzoeken (1995/1996 en 2006/2007) is een serumbank opgericht van de algemene Nederlandse bevolking met het doel inzicht te geven in de bescherming tegen infectieziekten waartegen routinematig wordt gevaccineerd. In Pienter3 wordt weer een dwarsdoorsnede-onderzoek uitgevoerd met een tweetraps-steekproeftrekking. Inwoners van Nederland tussen de 0 en 89 jaar wordt gevraagd om bloed af te staan en om een vragenlijst in te vullen. Naast deze landelijke steekproef zullen extra niet-westerse migranten worden uitgenodigd. Ook zal een steekproef genomen worden onder inwoners uit gemeenten met een lage vaccinatiegraad waar relatief veel Orthodox Gereformeerden wonen die deels vaccinatie afwijzen op basis van religieuze gronden. Nieuw in Pienter3 is dat er ook feces, neusswabs, keelwabs en speeksel worden afgenomen. Deelnemers zal gevraagd worden of zij in de toekomst benaderd mogen worden voor vervolgonderzoek. Regelmatig herhalen van het Pienter-project is van belang om te volgen of er groepen zijn die mogelijk minder goed beschermd zijn tegen ziekten uit het RVP, om het effect van veranderingen in het schema te evalueren en om inzicht te krijgen in de (veranderende) dynamiek van infectieziekten onder invloed van vaccinatie.

Summary

In February 2016 the third national seroepidemiological study (Pienter3) has started. In the two earlier studies (1995/1996 and in 2006/2007) a serum bank has been established which represents the general Dutch population to gain insight in the level of protection of the Dutch population against vaccine-preventable diseases through the national immunization programme (NIP). Also in Pienter3 a two-stage cluster sampling technique was used to draw a nationwide sample. Inhabitants of the Dutch population (0 to 89 years) were asked to complete a questionnaire and to donate a blood sample. Apart from this nationwide sample, a sample of extra non-Western migrants will be drawn. In addition, a sample of low vaccination coverage municipalities will be taken where

relative many Orthodox Reformed individuals live, who partly refuse vaccination based on religious grounds. What is new in Pienter3 is that we will also collect a faecal sample, a nose and throat swab and saliva. The participants will be asked whether we may approach them in the future for follow-up research. By repeating such studies within ten year intervals we can identify population groups who are less protected, evaluate the effect of changes in the vaccination scheme and gain insight into the (changing) dynamics of infectious diseases due to vaccination.

Achtergrond en doelstelling

Gedurende 1995 en 1996 is een eerste serumbank opgericht van de algemene Nederlandse bevolking met het doel inzicht te geven in de volksgezondheid en in het bijzonder infectieziekten waartegen routinematig wordt gevaccineerd. Om ontwikkelingen in de tijd te monitoren is 10 jaar later (in 2006 en 2007) een tweede serumbank opgericht. Begin 2016 start het derde landelijke sero-epidemiologisch onderzoek (Pienter3). Pienter staat voor Peiling Immunisatie Effect ter Evaluatie van het Rijksvaccinatieprogramma (RVP). Het primaire doel van het project is om aan de hand van sero-epidemiologisch onderzoek de effecten van vaccinatie op lange termijn te evalueren. Serosurveillance is een van de vijf surveillancecijfers (ziekte, kiem, bijwerkingen, vaccinatiegraad (waaronder ook vaccinatiebereidheid) en serosurveillance) aan de hand waarvan het vaccinatieprogramma wordt geëvalueerd. Met behulp van serosurveillance wordt inzicht verkregen in de bescherming van de bevolking tegen infectieziekten en epidemiologische veranderingen onder invloed van routinevaccinatie. Ook wordt de serumbank benut voor schatting van het vóórkomen van infectieziekten met name voor infectieziekten die vaak subklinisch

L. Mollema, H.E. de Melker, E.M. Swart, Y.W.M. van Weert, F.R. van der Klis, RIVM, Centrum Infectieziektebestrijding, correspondentieadres: L. Mollema, RIVM, Centrum Infectieziektebestrijding, Centrum Epidemiologie en Surveillance van Infectieziekten, Postbus 1 (Interne postvak 75), 3720 BA Bilthoven, Nederland, e-mail: Liesbeth.Mollema@rivm.nl

verlopen, zoals kinkhoest. Het is van belang dat dit onderzoek regelmatig herhaald wordt vanwege de veranderingen in het schema van het RVP, om groepen personen met minder goede bescherming tegen infectieziekten te identificeren en om inzicht te krijgen in de (veranderende) dynamiek van infectieziekten onder invloed van vaccinatie.

Opzet Pienter1 (1995/1996) en Pienter2 (2006/2007)

Zowel in Pienter1 als in Pienter2 is een serumbank opgezet van de algemene Nederlandse bevolking door middel van een dwarsdoorsnede steekproef. Eerst is Nederland opgedeeld in 5 regio's met ongeveer een gelijk aantal inwoners. Vervolgens zijn er aselect 8 gemeenten per regio getrokken, rekening houdend met de populatiegrootte van de gemeente. In elke gemeente werden aselect 380 tot 500 inwoners geselecteerd, verdeeld over 17 leeftijdsklassen, waarbij er in de eerste twee leeftijdsklassen (0 en 1- tot 4-jarigen) 40 inwoners werden getrokken en 20 inwoners in de overige 5-jaar leeftijdsklassen 5 tot 9, ..., 74 tot 79. In Pienter2 heeft er gedurende het onderzoek vanwege de lage respons nog een ophoging van het aantal uit te nodigen inwoners plaatsgevonden voor bepaalde leeftijdsgroepen.

Naast een algemene steekproef is er ook een steekproef getrokken van acht gemeenten met een lage vaccinatiegraad (vaccinatiegraad variërend van 68 tot 83 procent voor de primaire serie met DKTP-Hib versus een landelijke vaccinatiegraad van 95 procent).¹ In deze gemeenten wonen relatief veel Orthodox Gereformeerden die deels vaccinatie afwijzen vanwege hun geloof (gemeenten in de zogeheten Bijbelgordel). Dit geeft ons inzicht in de kans op en grootte van epidemieën zoals de afgelopen mazelenepidemie in 2013/2014. Naast een lage vaccinatiegraad is er ook gekeken naar de geografische spreiding van de gemeenten in de Bijbelgordel. In de gemeenten met een lage vaccinatiegraad hebben we een aselecte steekproef getrokken van 380 inwoners per gemeente. Vanwege de groeiende aanwezigheid van niet-westerse allochtonen in Nederland (ongeveer 11 procent van de totale populatie in 2007) zijn er extra niet-westerse allochtonen uitgenodigd in 12 van de 40 gemeenten in de nationale steekproef van Pienter2. De verwachting was dat er in de nationale steekproef zonder extra uitgenodigde niet-westerse allochtonen niet voldoende allochtonen zouden zijn voor betrouwbare seroprevalentieschattingen in deze groep. Daarnaast is er nog maar weinig bekend over de bescherming tegen ziekten uit het RVP in deze groep. Goede surveillance in deze groep is van belang omdat sommige ziekten nog endemisch voorkomen in de niet-westerse landen, er verschillende vaccinatieprogramma's daar worden gebruikt en er frequent gereisd wordt naar het land van herkomst.

Bij de deelnemers is bloed afgenomen om te kijken hoeveel antistoffen de deelnemers hebben tegen de ziekten uit het RVP maar ook tegen andere (infectie)ziekten. Daarnaast hebben deelnemers een vragenlijst ingevuld over hun persoonlijke gegevens, gezondheid, leefstijl en doorge maakte ziekten. De deelnemers werd gevraagd om hun vaccinatieboekjes mee te nemen en indien ze die niet bij zich hadden is geprobeerd om deze informatie te achterhalen via de lokale inentingskantoren. De personen die geen bloed wilden geven en geen vragenlijst wilden invullen is gevraagd om een verkorte vragenlijst in te vullen om te weten te komen waarom men niet mee wilde doen en in hoeverre zij verschilden van de deelnemers. Pienter2 is ook als paraplu gebruikt voor drie additionele onderzoeken, namelijk onderzoek naar sociale contacten tussen individuen van verschillende leeftijden door middel van een dagboekje, het meten van IgE-antistoffen in het bloed in combinatie met vragen over allergieën in de vragenlijst en onderzoek naar genetische factoren in relatie tot vaccinatie respons.

Bevindingen uit het Pienter-project 1995/1996 en 2006/2007

In de voorgaande Pienter-onderzoeken zijn antistoffen in de bevolking tegen de ziekten uit het RVP, dus difterie, tetanus, poliomyelitis, kinkhoest, *Haemophilus influenzae* type b (hib), bof, mazelen, rodehond, meningokokken C (MenC), pneumokokken en Humaan papillomavirus (HPV) gemeten en vervolgens zijn er epidemiologische analyses uitgevoerd. De resultaten zijn gerapporteerd in wetenschappelijke publicaties.²⁻¹¹ De respons in Pienter1 was 55 procent (n = 8359 algemene steekproef + n = 1589 lage vaccinatiegraad-gemeenten) en de respons in Pienter2 was 33 procent (n = 6386 algemene steekproef inclusief extra uitgenodigde niet-westerse allochtonen + n = 1518 lage vaccinatiegraad-gemeenten). Mogelijke verklaringen voor de lagere respons in Pienter2 zijn dat de gemeenten groter zijn geworden waardoor de afstanden naar het spreekuur voor bloedafname groter waren. Daarnaast was het aantal telefoonnummers dat achterhaald kon worden lager gedurende Pienter2 ten opzichte van de eerdere onderzoeken. Een telefonische herinnering bleek in de eerste studie tot een hogere respons te leiden. In Pienter3 wordt hier rekening mee gehouden door te proberen de spreekuren dichterbij de uitgenodigde personen te laten plaatsvinden. Ook krijgen zij de mogelijkheid om spreekuren te bezoeken in nabijgelegen gemeenten. Deelnemers kunnen digitaal hun telefoonnummer en e-mailadres opgeven, daardoor verwachten we de beoogde deelnemers beter te kunnen herinneren aan hun uitnodiging voor onderzoek. Ten slotte wordt een hogere vergoeding aangeboden.

Om resultaten tussen Pienter1 en Pienter2 goed te vergelijken werd er gewogen naar de Nederlandse populatie voor de meest belangrijke variabelen zoals leeftijd en geslacht. In de 10 jaar tijd tussen de Pienter-onderzoeken zijn laboratoriumbepalingen geëvolueerd; desondanks konden – hiermee rekening houdend – de resultaten van beide Pienter-onderzoeken met elkaar vergeleken worden. Belangrijke resultaten betroffen onder meer de kortere duur van bescherming van zuigelingen tegen mazelen doordat gevaccineerde moeders lagere antistofniveaus hebben doorgegeven aan hun kinderen dan natuurlijk geïnfecteerde moeders.¹² Deze bevinding is mede aanleiding geweest voor de introductie van vervroegde vaccinatie tijdens de mazelenepidemie in de Bijbelgordel in 2013/2014. Zowel voor mazelen als voor rubella werd uit de seroprevalentie zoals gemeten onder Orthodox Gereformeerden in de Bijbelgordel het risico op een epidemie na introductie van het virus zichtbaar.⁹⁻¹⁰ Voor mazelen trad deze epidemie reeds op in 2013/2014.¹³ Voor rubella wordt een dergelijke epidemie de komende jaren verwacht.¹⁰

Voor kinkhoest bleek dat de frequentie van infecties in de periode 2006/2007 ten opzichte van 1995/1996 verdubbeld was.² Dit impliceert dat er een toename is van circulatie van *Bordetella pertussis* zoals ook zichtbaar is in de wettelijke meldingen wegens kinkhoest.¹⁴

Vergelijking van de seroprevalentie en antistofniveaus van meningokokken tussen 1995/1996 (voor invoering van de massavaccinatie tegen MenC in 2002) en 2006/2007 (na invoering van de massavaccinatie) gaf onder meer aan dat naarmate men ouder was op het moment van de inhaalvaccinatie tegen MenC de antistofconcentraties hoger waren. Ook werd een snelle afname van antistofconcentraties gezien direct na de eerste vaccinatie op de leeftijd van 14 maanden waardoor er in de toekomst mogelijk een grotere groep ontstaat met minder goede bescherming. De lagere antistofconcentraties in de oudere cohorten die niet in aanmerking kwamen voor vaccinatie zijn een duidelijke aanwijzing van de afname van circulatie door de invoering van vaccinatie.³ De resultaten zijn aanleiding voor verdere vaccinatie-onderzoeken waarin de optimale leeftijd van een booster-vaccinatie wordt vastgesteld.¹⁵

De serologische gegevens werden ook veelvuldig gebruikt voor mathematische modellering zoals voor varicella zoster en HPV. Voor varicellazoster bleek zowel in 1995/1996 en 2006/2007 dat de leeftijd van infectie in Nederland laag is. Op de leeftijd van 6 jaar heeft meer dan 95 procent van de inwoners al een waterpokkeninfectie doorgemaakt.¹⁶ Deze informatie bleek erg belangrijk bij mathematische modellen en kosteneffectiviteitsanalyse van effecten van universele waterpokkenvaccinatie.

Voor HPV is in Pienter2 onderzocht wat de geslacht-specifieke seroprevalentie was door verdelingen van

seronegatieven en seropositieven te nemen in plaats van één vaste waarde voor seropositiviteit (afkapwaarde). Het bleek dat HPV16-seropositiviteit geassocieerd is met hogere antistofconcentraties bij vrouwen dan bij mannen. Dit wordt mogelijk veroorzaakt door verschil in locatie van de infectie (cervix versus penis). Op deze locaties verschilt de weefselstructuur en daarmee de mate waarin het virus in het weefsel door kan dringen.¹⁷

De serumbanken uit 1995/1996 en 2006/2007 zijn ook veelvuldig gebruikt voor onderzoek naar andere infectieziekten. Voorbeelden zijn Q-koorts, hepatitis A en het cytomegalovirus.¹⁸⁻²⁰

De resultaten voortkomend uit dit sero-epidemiologisch onderzoek hebben in samenhang met andere surveillance en onderzoeksresultaten een bijdrage geleverd aan het infectieziektenbeleid in Nederland.

Pienter3 (2016/2017)

Het hierboven beschreven dwarsdoorsnede-onderzoek met herhaling circa eens per 10 jaar is een krachtige studieopzet om de kwaliteit van het RVP te vervolgen. Het is een aselecte steekproef van de Nederlandse bevolking met grote aantallen waardoor leeftijdsgroepen (en/of cohorten) en subgroepen (bijvoorbeeld personen die alleen de vaccinaties in het RVP hebben gehad) bestudeerd kunnen worden. Daarnaast worden gegevens over vaccinatiestatus, contactpatronen en andere determinanten verzameld waardoor mogelijke risicogroepen geïdentificeerd kunnen worden. Daarom zal in 2016 de derde Pienter beginnen met een vergelijkbare opzet (met extra uit te nodigen niet-westerse allochtonen en aanvullende onderzoeken) zodat vergelijking met de eerdere projecten in 1995/1996 en 2006/2007 mogelijk is. Hierdoor kan verandering in de dynamiek van infectieziekten onder invloed van vaccinatie beter bestudeerd worden. Nadelen van deze opzet zijn dat er geen gegevens zijn voor tussenliggende perioden, er geen longitudinale gegevens zijn en er niet gereageerd kan worden op tussentijds ontstane vragen. Een deel van deze nadelen zal ondervangen worden doordat we de deelnemers aan het Pienter3-project vragen of zij ook in de toekomst benaderd mogen worden voor een aanvullende vragenlijst en biologisch onderzoek (serum, ander materiaal). Hiermee bestaat de mogelijkheid een cohort te creëren die voor een nader te bepalen onderzoeksvraag gebruikt kan worden.

Het dwarsdoorsnede-onderzoek met representatieve opzet leent zich bij uitstek voor aanvullende infectieziekten-gerelateerde onderzoeken zoals vragen die de immuniteit betreffen waarvoor extra bloed afgenomen zal worden en het onderzoek van de relatie tussen immuniteit en microbiom waarvoor feces, neusswabs, keelwabs en speeksel zal worden afgenomen. Ook zal er in de materialen onderzoek gedaan worden naar het voorkomen van antibioticumresistentie.

Toekomstige vragen

In Pienter3 zullen we primair leeftijdsspecifieke antistoffen meten tegen ziektes waartegen we vaccineren in het RVP, maar ook tegen andere ziekten zoals gastro-enterale infecties (bijvoorbeeld toxoplasmosis), seksueel overdraagbare aandoeningen (bijvoorbeeld chlamydia) en respiratoire infecties (bijvoorbeeld Q-koorts). Voor het RVP belangrijke vragen die we met Pienter3 kunnen beantwoorden zijn onder andere: Wat is het effect van introductie van pneumokokkenvaccinatie bij kinderen in 2006? Wat is het effect van HPV-vaccinatie van 12-jarige meisjes sinds 2010? Hoe lang zijn zuigelingen door maternale antistoffen beschermd tegen onder meer bof, mazelen en rodehond? Is een boosterdosering op adolescentie leeftijd tegen MenC nodig? Zijn ouderen die voor invoering van massavaccinatie tegen difterie een natuurlijke difterie-infectie hebben doorgemaakt nog voldoende beschermd? Zijn de Hib-antistofconcentraties in 6 tot 11 maanden oude zuigelingen verlaagd? Daarnaast zullen we meer te weten komen over de relatie tussen immuniteit en het microbiom en over het voorkomen van antibioticum-resistentie. Door de koppeling van de vele resultaten met andere databestanden kan meer inzicht verkregen worden in de relatie van omgeving, leefstijl, chronische ziekten en risicogedrag met de bescherming tegen infectieziekten. De resultaten van Pienter3 zullen nieuw inzicht geven in de dynamiek van infectieziekten en immunologie in Nederland om daarmee het toekomstige infectieziektenbeleid te ondersteunen.

Uitvoering

In februari 2016 is het Pienter3-onderzoek gestart en de verwachting is dat de uitvoering van het onderzoek zal duren tot medio 2017. In 2018 zullen de eerste resultaten beschikbaar komen. Ook zal medio 2016 een klein Pienter-onderzoek uitgevoerd gaan worden op de drie eilanden van Caribisch Nederland (Bonaire, Sint Eustatius en Saba).

Voor meer informatie: www.rivm.nl/pienteronderzoek

Referenties

1. Van Lier EA, Oomen PJ, Oostenbrug MWM, Zwakhals SLN, Drijfhout IH, de Hoogh PAAM, et al. Vaccinatiegraad Rijksvaccinatieprogramma Nederland; verslagjaar 2006-2008. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu; 2008 (RIVM-rapport 210021007).
2. De Greeff SC, de Melker HE, van Gageldonk PG, Schellekens JF, van der Klis FR, Mollema L, et al. Seroprevalence of pertussis in The Netherlands: evidence for increased circulation of *Bordetella pertussis*. *PLoS One* 2010;5:e14183.
3. De Voer RM, Mollema L, Schepp RM, de Greeff SC, van Gageldonk PG, de Melker HE, et al. Immunity against *Neisseria meningitidis* serogroup C in

the Dutch population before and after introduction of the meningococcal c conjugate vaccine. *PLoS One* 2010;5:e12144.

4. Steens A, Mollema L, Berbers GA, van Gageldonk PG, van der Klis FR, de Melker HE. High tetanus antitoxin antibody concentrations in the Netherlands: a seroepidemiological study. *Vaccine* 2010;28:7803-9.
5. Elberse KE, de Greeff SC, Wattimena N, Chew W, Schot CS, van de Pol JE, et al. Seroprevalence of IgG antibodies against 13 vaccine *Streptococcus pneumoniae* serotypes in the Netherlands. *Vaccine* 2011;29:1029-35.
6. Hahné SJ, de Melker HE, Kretzschmar M, Mollema L, van der Klis FR, van der Sande MA, et al. Prevalence of hepatitis B virus infection in The Netherlands in 1996 and 2007. *Epidemiol Infect* 2012;140:1469-80.
7. Scherpenisse M, Mollers M, Schepp RM, Boot HJ, Meijer CJ, Berbers GA, et al. Changes in antibody seroprevalence of seven high-risk HPV types between nationwide surveillance studies from 1995-96 and 2006-07 in The Netherlands. *PLoS One* 2012;7:e48807.
8. Smits G, Mollema L, Hahné S, de Melker HE, Tcherniaeva I, Waaijenborg S, et al. Seroprevalence of mumps in the Netherlands: dynamics over a decade with high vaccination coverage and recent outbreaks. *Plos One* 2013;8:3:e58234.
9. Mollema L, Smits GP, Berbers GA, van der Klis FR, van Binnendijk RS, de Melker HE, et al. High risk of a large measles outbreak despite 30 years of measles vaccination in the Netherlands. *Epidemiol Infect* 2014;142:1100-8.
10. Smits G, Mollema L, Hahné S, de Melker H, Tcherniaeva I, van der Klis F, et al. Seroprevalence of rubella antibodies in The Netherlands after 32 years of high vaccination coverage. *Vaccine* 2014;32:1890-5.
11. Van der Maas NA, Mollema L, Berbers GA, van Rooijen DM, van der Avoort HG, Conyn-Van Spaendonck MA, et al. Immunity against poliomyelitis in the Netherlands, assessed in 2006 to 2007: the importance of completing a vaccination series. *Euro Surveill* 2014;19:20705.
12. Waaijenborg S, Hahné SJ, Mollema L, Smits GP, Berbers GA, van der Klis FR, et al. Waning of maternal antibodies against measles, mumps, rubella, and varicella in communities with contrasting vaccination coverage. *J Infect Dis* 2013;208:10-6.
13. Knol M, Urbanus A, Swart E, Mollema L, Ruijs W, van Binnendijk R, et al. Large ongoing measles outbreak in a religious community in the Netherlands since May 2013. *Euro Surveill* 2013;18:pii=20580.
14. De Greeff SC, de Melker HE, Mooi FR. Kinkhoest in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010;154:A1383.
15. Stoof SP, van der Klis FR, van Rooijen DM, Knol MJ, Sanders EA, Berbers GA. Timing of an adolescent booster after single primary meningococcal serogroup C conjugate immunization at young age; an intervention study among Dutch teenagers. *PLoS One* 2014;9:e100651.
16. Van Lier A, Smits G, Mollema L, Waaijenborg S, Berbers G, van der Klis F, et al. Varicella zoster virus infection occurs at a relatively young age in The Netherlands. *Vaccine* 2013;31:5127-33.
17. Vink MA, van de Kasstele J, Wallinga J, Teunis PF, Bogaards JA. Estimating seroprevalence of human papillomavirus type 16 using a mixture model with smoothed age-dependent mixing proportions. *Epidemiology* 2015;26:8-16.
18. Schimmer B, Notermans DW, Harms MG, Reimerink JH, Bakker J, Schneeberger P, et al. Low seroprevalence of Q fever in The Netherlands prior to a series of large outbreaks. *Epidemiol Infect* 2012;140:27-35.
19. Verhoef L, Boot HJ, Koopmans M, Mollema L, van der Klis F, Reimerink J, et al. Changing risk profile of hepatitis A in The Netherlands: a comparison of seroprevalence in 1995-1996 and 2006-2007. *Epidemiol Infect* 2011;139:1172-80.
20. Korndewal MJ, Mollema L, Tcherniaeva I, van der Klis F, Kroes AC, Oudesluys-Murphy AM, et al. Cytomegalovirus infection in the Netherlands: seroprevalence, risk factors, and implications. *J Clin Virol* 2015;63:53-8.

Ernstige acute luchtweginfecties: de ontbrekende bouwsteen in de surveillancepiramide

S.D. Marbus, J.A. Oost, W. van der Hoek, A. Meijer, F.N. Polderman, C.P.C. de Jager, G.H. Groeneveld, P.M. Schneeberger, A.B. van Gageldonk-Lafeber

Samenvatting

In Nederland bestaat al meer dan 40 jaar surveillance van acute respiratoire infecties in de eerste lijn. De registratie van influenza-achtig ziektebeeld door huisartsen aangevuld met virologische analyses van keelneuswatten vormt de huidige basis van de surveillancepiramide van respiratoire infecties in Nederland. De ontbrekende schakel tussen registraties uit de eerste lijn en monitoring van sterfte is de surveillance van patiënten met ernstige acute luchtweginfecties/'severe acute respiratory infections' (SARI), waarvoor ziekenhuisopname noodzakelijk is. Een structureel surveillancesysteem voor SARI maakt het mogelijk om uitbraken te detecteren in tijd, plaats, oorzakelijk pathogeen en persoon. Zo kunnen bestrijdingsmaatregelen tijdig genomen en geëvalueerd worden. Door aanbevelingen van onder andere de World Health Organization (WHO), bestaan er in het buitenland al enkele surveillancesystemen voor SARI. In oktober 2015 is in het Jeroen Bosch Ziekenhuis en Leids Universitair Medisch Centrum een studie gestart met als hoofddoel het opzetten van een surveillancesysteem voor patiënten met SARI in Nederland. De toekomst van surveillance van SARI wordt beschreven aan de hand van syndroomsurveillance, het essentiële belang van diagnostiek en de uiteindelijke ontwikkeling van een structureel geïntegreerd surveillancesysteem voor respiratoire infecties.

Trefwoorden

Surveillance, influenza, epidemie, SARI, severe acute respiratory infection, ziekenhuisopname

Abstract

Surveillance of respiratory infections in primary care in the Netherlands was established more than 40 years ago. The registration of influenza-like illness by general practitioners, complemented by virological analysis of nasal/throat swabs, represent the current base of the surveillance pyramid of respiratory infections in the Netherlands. The missing link between primary care and crude mortality

monitoring is the surveillance of patients with severe acute respiratory infections (SARI) requiring hospital admission. A sustained SARI surveillance system detects outbreaks in time, place, causative pathogen and person in order to implement and evaluate health care interventions. Several other countries have implemented an operative SARI surveillance system as advised by the World Health Organization (WHO). From October 2015 onwards, a pilot study started at the Jeroen Bosch Hospital and Leiden University Medical Center with the main objective to set up a sentinel surveillance system for SARI patients in the Netherlands. The future of SARI surveillance is outlined by syndrome surveillance, the crucial importance of diagnostics and the final development of a sustained integrated respiratory surveillance system.

Introductie

Surveillance geeft actuele informatie over de verspreiding van ziekten en de omvang van uitbraken.¹ De huidige surveillancepiramide voor respiratoire infecties in Nederland bestaat uit meerdere lagen, waaronder sterfmonitoring door het Centraal Bureau voor de Statistiek (CBS), surveillance van influenza-achtig ziektebeeld (IAZ) en klinisch vastgestelde pneumonie door huisartsen in de eerste lijn (*figuur 1*). Surveillance van ernstige acute luchtweginfecties (SARI) bij patiënten in de tweede lijn is

S.D. Marbus, W. van der Hoek, A. Meijer, A.B. van Gageldonk-Lafeber, Centrum Infectieziektebestrijding, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven, J.A. Oost, Faculteit Geneeskunde, Universiteit Utrecht, Utrecht, F.N. Polderman, C.P.C. de Jager, Afdeling Intensive Care, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch, G.H. Groeneveld, Afdeling Interne Geneeskunde, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden, P.M. Schneeberger, Regionaal Laboratorium Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's-Hertogenbosch. Correspondentieadres: S.D. Marbus, internist-infectioloog, Centrum infectieziektenbestrijding (Cib), Epidemiologie & Surveillance, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, e-mail: Sierk.Marbus@rivm.nl

een belangrijke ontbrekende schakel in het huidige surveillancesysteem. Een patiënt met SARI is gedefinieerd als een opgenomen patiënt met:

1. ten minste één systemisch symptoom (koorts, malaise, hoofdpijn of spierpijn) of achteruitgang in algemene conditie of functionele status;
2. ten minste één respiratoir symptoom (hoesten, keelpijn of dyspnoe) tot 48 uur na opname;
3. symptomen die 7 dagen of minder voor opname zijn begonnen.²

Deze casusdefinitie voor SARI komt in hoofdlijnen overeen met die van de WHO opgesteld in 2014.³

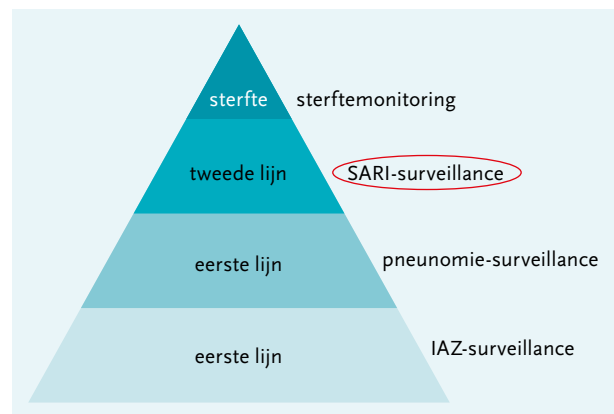
Dit overzichtartikel beschrijft de noodzaak van surveillance van SARI binnen het huidige surveillancesysteem voor respiratoire infecties in het kader van de nationale influenzasurveillance. Tevens geeft het een overzicht van bestaande surveillancesystemen van SARI in het buitenland. Hierbij is gekeken naar de toepasbaarheid voor de Nederlandse praktijk. Ten slotte beschrijft het de geplande toekomst van surveillance van SARI in Nederland.

De noodzaak van surveillance van SARI

Syndroomsurveillance is gebaseerd op gegevens over specifieke ziekte-indicatoren (zoals gedrag, symptomen of ziektebeelden) zonder dat een verwekker bekend is. Syndroomsurveillance, zoals SARI-surveillance, heeft als doel deze gegevens zo snel mogelijk te verzamelen en te interpreteren om vervolgens een indruk te krijgen van de morbiditeit in een populatie.¹ Syndroomsurveillance kan aangevuld worden met diagnostiek om cruciale informatie te krijgen over oorzakelijk en circulerende pathogenen. De behoefte aan surveillance van SARI wordt geïllustreerd door de ervaring die is opgedaan tijdens de influenzapandemie in 2009.^{4,5} Vergelijking met eerdere, reguliere influenzaseizoenen was toen moeilijk, omdat er geen informatie beschikbaar was over het aantal ziekenhuisopnames van patiënten met een ernstige acute luchtweginfectie en in het laboratorium bevestigde infectie door influenzavirus.

In Nederland bestaat nog geen surveillancesysteem van SARI, ondanks de aanbevelingen van het European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) en de World Health Organization (WHO) om deze te implementeren.^{6,7} Het Dutch Hospital Data-initiatief verstrekt wel gegevens over ziekenhuisopname in verband met pneumonie, maar deze gegevens komen vertraagd beschikbaar en vaak is het oorzakelijk pathogeen onbekend.⁸ Dit betekent dat een toename van incidentie van SARI lang onopgemerkt kan blijven en dat (pathogeen-specifieke) preventieve gezondheidszorgmaatregelen niet tijdig genomen kunnen

Figuur 1. De surveillancespiramide van respiratoire infecties in Nederland.



worden. Een toename van die incidentie kan optreden tijdens zowel een regulier influenzaseizoen, als tijdens uitbraken veroorzaakt door andere pathogenen. Een idealiter 'real-time' surveillancesysteem van SARI geeft fundamentele informatie over de ernst van een epidemie in tijd, plaats, oorzakelijk pathogeen en persoon. Die informatie kan leiden tot implementatie van interventies, zoals (influenza)vaccinatie, opschalen van diagnostiek bij nieuw opkomend pathogeen en – indien nodig – tot het isoleren van patiënten. Tevens is het mogelijk om de gedane interventies te evalueren, belasting van deze luchtweginfecties op de gezondheidszorg in te schatten en onderzoeksvragen te beantwoorden in zowel epidemiologische als wiskundige modelleringsstudies.

Surveillancesystemen van SARI in het buitenland

Ondanks het belang en de aanbevelingen om surveillance van SARI op te zetten, is dit in de praktijk nog moeilijk te realiseren. Dit blijkt onder andere uit de grote internationale verschillen tussen diverse surveillancesystemen in casusdefinitie, bemonstering en diagnostiek. De overeenkomst tussen de surveillancesystemen is dat er altijd wel diagnostiek van influenzavirus wordt verricht. De verschillen in breedte van de verrichte diagnostiek tussen landen heeft mogelijk te maken met kosten en inschatting van de klinische relevantie in de dagelijkse praktijk. De toepasbaarheid van de surveillancesystemen op de Nederlandse situatie is vaak beperkt door het afwijkende gezondheidszorgsysteem (tabel 1).

Toekomst surveillance van SARI in Nederland

Syndroomsurveillance

In 2015 is met het Strategisch Programma RIVM (SPR)-project 'Ernstige acute luchtweginfecties: de ontbrekende schakel in de surveillancespiramide' begonnen. Hierin ontwikkelt het RIVM in samenwerking met het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC) en het Jeroen Bosch Ziekenhuis (JBZ) een specifiek, zo mogelijk

Tabel 1. Surveillancesystemen van SARI in het buitenland

| Land | Casusdefinitie | Afdeling | Peilstations | Bemonstering | Diagnostiek |
|----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| België ⁹ | acute respiratoire ziekte en - koorts $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - hoesten en dyspnoe - ontstaan ≤ 7 dagen - opname >24 uur | regulier ⁱ en IC ⁱⁱ | 6 | keelneuswat | influenzavirus RT-PCR, (sub)typering, genetische/antigene karakterisering |
| Oost-Europa, Centraal-Azië ^{iii 10} | acute respiratoire ziekte en - koorts $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - hoesten en dyspnoe - ontstaan ≤ 7 dagen - opname >24 uur | regulier en IC | 4-26 | monster niet gedefinieerd | influenzavirus RT-PCR/virusweek, (sub)typering |
| Zuid-Afrika ¹¹ | acute respiratoire ziekte en - koorts $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - hoesten - ontstaan ≤ 7 dagen - opname >24 uur | regulier | 6 | keelneuswat | - influenzavirus RT-PCR, (sub)typering - 10 soorten non-influenza respiratoire virussen |
| Nieuw-Zeeland ¹² | acute respiratoire ziekte en - koorts $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - hoesten - ontstaan ≤ 10 dagen - opname >24 uur | regulier en IC | 1 | keelneuswat, trachea aspiraats of broncho-alveolaire lavage (BAL) urine | - influenzavirus RT-PCR, (sub)typering, genetische/antigene karakterisering - 5 soorten non-influenza respiratoire virussen - Multiplex tandem PCR voor atypische pneumonie - urine sneltest (Binax); <i>Streptococcus pneumoniae</i> en <i>Legionella pneumophila</i> serogroep 1 |
| Verenigd Koninkrijk ¹³ | opname en - koorts $\geq 38^{\circ}\text{C}$ - 2 of meer symptomen: hoesten, rinorroe, braken, diarree, keel-, hoofd- en/of spierpijn - lab-bevestigde influenza | regulier en IC | 23 | monster niet gedefinieerd | influenzavirus RT-PCR, (sub)typering |
| Duitsland ¹⁴ | 4 verschillende SARI-casusdefinities | regulier en IC | 9 | keelneuswat | influenzavirus RT-PCR, (sub)typering |
| China ¹⁵ | - temp $\geq 37,3^{\circ}\text{C}$ - opname - ten minste 1 symptoom: hoesten, keelpijn, dyspneu, sputum, hemoptoë, thoracale pijn | regulier en IC | 4 | keelneuswat | influenzavirus RT-PCR, (sub)typering |
| USA ¹⁶ | - inclusie op basis van ICD-9-CM codes | regulier en IC | 19 | monster niet gedefinieerd | influenzavirus RT-PCR, gedeeltelijke subtypering |

ⁱ regulier: ziekenhuisafdeling met reguliere zorg

ⁱⁱ IC: intensive care

ⁱⁱⁱ Albanië, Armenië, Belarus, Georgië, Kazachstan, Kirgistan, Roemenië, Russische Federatie en Oekraïne

‘real-time’ surveillancesysteem van SARI. Dit systeem levert fundamentele informatie over het voorkomen van patiënten met SARI, waarvoor ziekenhuisopname noodzakelijk is. De studie SARI-surveillance in het LUMC en JBZ is representatief voor twee geografische gebieden in Nederland. De surveillancegegevens zijn daarom niet representatief voor heel Nederland.

Tijdens de studie wordt onderzocht hoe het opzetten van een surveillancesysteem van SARI op een praktische wijze het beste te realiseren is, door:

1. te inventariseren welke ziekenhuisgegevens het meest geschikt zijn voor een specifiek en indien mogelijk real-time surveillancesysteem van SARI;

- te onderzoeken hoe deze gegevens op efficiënte wijze verzameld kunnen worden; en
- te onderzoeken hoe microbiologische testuitslagen kunnen worden toegevoegd.

In het LUMC bestaat al een passief surveillancesysteem sinds oktober 2013, namelijk het Integrated Alert and Response System (ICARES). ICARES is een geautomatiseerd clusterdetectiesysteem op basis van DBC- en DOT-codes en maakt gebruik van een beperkt aantal gegevens over de datum van opname, leeftijdsgroep, geslacht, 4-cijferige postcode en IC-opname. In de studie wordt het passieve surveillancesysteem in het LUMC vergeleken met het nog op te zetten actieve surveillancesysteem in het JBZ. Hiervoor worden patiënten die voldoen aan de casusdefinitie actief geregistreerd door medisch personeel op de afdeling Spoedeisende Hulp.

Verwacht aantal patiënten met SARI

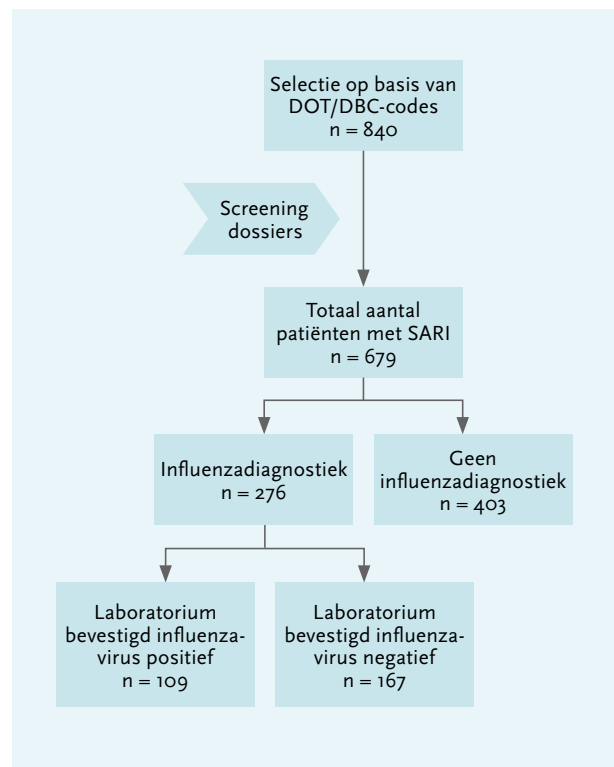
Onder andere op grond van historische data uit ICARES, worden er per jaar ongeveer 800 patiënten met SARI verwacht in zowel het LUMC als het JBZ. Om een nauwkeurigere schatting te kunnen geven is er een statusonderzoek in het JBZ verricht. Hierbij is gekeken naar het aantal patiënten met SARI dat is opgenomen gedurende het influenzaseizoen 2014/2015. In dit statusonderzoek werden de patiënten geselecteerd op basis van DBC- en DOT-codes, die gerelateerd waren met diagnoses of symptomatologie van SARI (figuur 2). Het statusonderzoek toonde 679 ziekenhuisopnames wegens SARI tijdens het influenzaseizoen 2014/2015 (van 1 december 2014 tot en met 26 april 2015). Als een patiënt met SARI binnen een periode van 10 dagen opnieuw werd opgenomen, werd dit geduid als één enkele ziekte-episode. Verreweg het grootste aantal patiënten met SARI (n = 497, 73 procent) werd opgenomen door de afdeling Longziekten.

SARI surveillance en diagnostiek

De surveillance van SARI wint aan waarde als de microbiologische gegevens kunnen worden gekoppeld, waardoor inzicht wordt verkregen in de circulerende respiratoire pathogenen. Daardoor kunnen epidemische verheffingen van bekende pathogenen, zoals influenzavirus, gedetecteerd worden. Het verrichten van diagnostiek is ook van belang voor onder andere het bepalen van veranderingen in de virulentie van het pathogeen, het optreden van resistentie en antigene overeenkomst met het vaccin. Bij voorkeur wordt er een goed gekoppelde surveillance gevormd van oorzakelijke pathogenen voor pneumonie, SARI en het vervolgen van sterfte.

Naast deze voordelen, zijn er ook nadelen verbonden aan een structureel surveillancesysteem van SARI gekoppeld aan microbiologische data. Het leidt tot verhoging van de werk- en registratielast en de (initiële) kosten. Bovendien moet ongewenste herleidbaarheid tot een patiënt

Figuur 2. Flowdiagram statusonderzoek patiënten met SARI en influenza-diagnostiek in JBZ.



voorkomen worden.¹ In de toekomst zal meer inzicht moeten worden verkregen in de kosten en baten van een structureel surveillancesysteem van SARI.

Surveillance van SARI en diagnostiek in het JBZ

In het kader van de studie wordt in het JBZ restmateriaal gebruikt van routinematig afgenomen respiratoire en urinemonsters. De residuale respiratoire monsters, die positief zijn voor influenzavirus, worden gebruikt voor influenza-(sub)typering. De residuale urinemonsters worden geanalyseerd op de aanwezigheid van *Streptococcus pneumoniae*-antigeen met een pneumokokken-urine-antigeentest en gevolgd door serotypering van de pneumokok. Daarnaast wordt er een vragenlijst afgenomen voor aanvullende informatie over onder andere de datum van de eerste ziekte-episode, symptomatologie, gebruik antivirale medicatie, vaccinatiestatus, co-morbiditeit en risicofactoren zoals roken, obesitas, zwangerschap en de Algemene Dagelijkse Levensverrichtingen-score (ADL).

Het statusonderzoek over het influenzaseizoen 2014/2015 in het JBZ toonde dat er bij 276 van de 679 patiënten met SARI (41 procent) influenzadiagnostiek werd verricht; bij 109 van deze 276 patiënten (39 procent) werd de laboratoriumdiagnose influenza gesteld (figuur 2). Pneumonie was de meest voorkomende ontslagdiagnose (n = 358/679, 53 procent), gevolgd door exacerbatie COPD door een bovenste virale luchtweginfectie (n = 152/679, 22 procent).

Effectiviteit van het influenzavaccin

Hoewel het influenzavaccin geen volledige bescherming biedt, is vaccinatie nog steeds de belangrijkste maatregel tegen influenza. De jaarlijkse griepvaccinatie is vooral bedoeld om ernstig verloopende infecties en complicaties in de tweede lijn te voorkomen. Op dit moment wordt de effectiviteit van het influenzavaccin gebaseerd op data uit de huisartsenpraktijk. Om de vaccineffectiviteit te bepalen wordt in de studie, naast surveillance van SARI, bij een groot aantal patiënten met SARI van 65 jaar en ouder influenzavirusdiagnostiek uitgevoerd op restmateriaal. Deze analyse maakt deel uit van een Europees project binnen het I-MOVE ('Influenza Monitoring Vaccine Effectiveness')-programma.^{17,18} Hierbij worden data uit 11 verschillende Europese landen samengevoegd om de effectiviteit van het vaccin al tijdens het lopende influenzaseizoen te kunnen berekenen.

Tot slot

Aan het eind van de studie verwachten we in twee ziekenhuizen een specifiek surveillancesysteem van SARI ontwikkeld en ingevoerd te hebben. Indien de surveillance van SARI met voldoende kwaliteit van epidemiologische en diagnostische data, efficiëntie en kosteneffectiviteit haalbaar blijkt te zijn, kunnen meer medische centra geïncorporeerd worden in Nederland. Dit vergroot de generaliseerbaarheid. Het beoogde eindresultaat is een geïntegreerd respiratoir surveillancesysteem dat het volledige spectrum van luchtweginfecties dekt en dat daarmee een belangrijke bijdrage levert aan de volksgezondheid.

Referenties

1. Van Asten L, Fanoy EB, Hooiveld M, Koopmans MP, Kretzschmar ME. Syndroomsurveillance, een vinger aan de pols van de volksgezondheid. *Ned Tijdschr Geneesk* 2014;158:1-8.
2. Epiconcept. I-MOVE+: Protocol for hospital-based test negative case control studies to measure seasonal influenza vaccine effectiveness against influenza laboratory confirmed SARI hospitalisation among the elderly across the European Union and European Economic Area Member States 2015.
3. WHO. SARI case definition. http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/ili_sari_surveillance_case_definition/en/.
4. Van Gageldonk-Lafeber AB, Hooiveld M, Meijer A, Donker GA, Veldman-Ariesen M, van der Hoek W, et al. The relative clinical impact of 2009

pandemic influenza A (H1N1) in the community compared to seasonal influenza in the Netherlands was most marked among 5-14 year olds. *Influenza Other Respir Viruses* 2011;5:e13-20.

5. Van 't Klooster TM, Wielders CC, Donker T, Isken L, Meijer A, van den Wijngaard CC, et al. Surveillance of hospitalisations for 2009 pandemic influenza A(H1N1) in the Netherlands, 5 June - 31 December 2009. *Euro Surveill* 2010;15.
6. WHO. Global epidemiological surveillance standards for influenza. Geneva: World Health Organization 2013.
7. ECDC. Severe influenza surveillance in Europe. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2012.
8. Dutch Hospital Data. <http://www.dutchhospitaldata.nl/Paginas/default.aspx>.
9. Thomas I HA, Van Gucht S, Weyckmans J, Bauwens D, el Kadaani K, Abady M, Fdillate I. Virological surveillance of influenza in Belgium: season 2013-2014. Scientific Institute of Public Health 2014.
10. Meerhoff TJ, Simaku A, Ulqinaku D, Torosyan L, Gribkova N, Shimanovich V, et al. Surveillance for severe acute respiratory infections (SARI) in hospitals in the WHO European region – an exploratory analysis of risk factors for a severe outcome in influenza-positive SARI cases. *BMC Infect Dis* 2015;15:1-12.
11. Budgell E, Cohen AL, McAnerney J, Walaza S, Madhi SA, Blumberg L, et al. Evaluation of two influenza surveillance systems in South Africa. *PLOS One* 2015;10:e0120226.
12. Huang QS, Baker M, McArthur C, Roberts S, Williamson D, Grant C, et al. Implementing hospital-based surveillance for severe acute respiratory infections caused by influenza and other respiratory pathogens in New Zealand. *Western Pacific surveillance and response journal : WPSAR* 2014;5:23-30.
13. Bolotin S, Pebody R, White PJ, McMenamin J, Perera L, Nguyen-Van-Tam JS, et al. A new sentinel surveillance system for severe influenza in England shows a shift in age distribution of hospitalised cases in the post-pandemic period. *PLOS One* 2012;7:e30279.
14. Nachtnebel M, Greutelaers B, Falkenhorst G, Jorgensen P, Dehnert M, Schweiger B, et al. Lessons from a one-year hospital-based surveillance of acute respiratory infections in Berlin- comparing case definitions to monitor influenza. *BMC Public Health* 2012;12:245.
15. Yu H, Huang J, Huai Y, Guan X, Klens J, Liu S, et al. The substantial hospitalization burden of influenza in central China: surveillance for severe, acute respiratory infection, and influenza viruses, 2010-2012. *Influenza Other Respir Viruses* 2014;8:53-65.
16. Ortiz JR, Neuzil KM, Cooke CR, Neradilek MB, Goss CH, Shay DK. Influenza pneumonia surveillance among hospitalized adults may underestimate the burden of severe influenza disease. *PLOS One* 2014;9:e113903.
17. Valenciano M, Kissling E, Cohen JM, Oroszi B, Barret AS, Rizzo C, et al. Estimates of pandemic influenza vaccine effectiveness in Europe, 2009-2010: results of Influenza Monitoring Vaccine Effectiveness in Europe (I-MOVE) multicentre case-control study. *PLOS Medicine* 2011;8:e1000388.
18. Valenciano M, Ciancio B, I-MOVE study team. I-MOVE: A European network to measure the effectiveness of influenza vaccines. *Euro Surveill* 2012;17.

PROMOTIES

2 december 2015

M.C. Boer

Regulatory, pro-inflammatory and inhibitory human T-cell responses to *M. bovis* BCG: opposing T-cell forces in TB-vaccination

Promotor: prof. dr. T.H.M. Ottenhoff

Co-promotor: dr. S.A. Joosten

LUMC Leiden, afd. Infectieziekten

8 december 2015

X. Meng

Mutational and biochemical analysis of the reaction and linkage specificity of *Lactobacillus reuteri* glucansucrase enzymes

Promotores: prof. dr. L. Dijkhuizen en prof. dr. J.P. Kamerling
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie.

Rijksuniversiteit Groningen, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute

10 december 2015 **F.E.M. Scholte**
Host factors involved in chikungunya virus replication
Promotor: prof. dr. E.J. Snijder
Co-promotor: dr. M.J. van Hemert
LUMC Leiden, afd. Medische Microbiologie

14 december 2015 **G.A.F.S. van Liere**
Chlamydia trachomatis testing policy and control: the neglected role of the anorectal site
Promotor: prof. dr. C.J.P.A. Hoebe
Co-promotor: dr. N.H.T.M. Dukers-Muijers
UMC Maastricht, afd. Medische Microbiologie. GGD Zuid Limburg

16 december 2015 **E.E. Treffers**
A +RNA virus diptych: Chikungunya virus-host interactions and arteriviral programmed ribosomal frameshifting
Promotor: prof. dr. E.J. Snijder
Co-promotors: dr. M.J. van Hemert en dr. P.A. van Veelen
LUMC Leiden, afd. Medische Microbiologie

17 december 2015 **W.E. van der Starre**
Treatment duration and prognostics in febrile urinary tract infection
Promotor: prof. dr. J.T. van Dissel
Co-promotor: dr. C. van Nieuwkoop
LUMC Leiden, afd. Infectieziekten. RIVM Bilthoven, Centrum Infectieziektebestrijding (CIb)

22 december 2015 **E.M. Bijker (cum laude)**
Constructing protection and immune responses against malaria. Studies on whole sporozoite immunization approaches
Promotors: prof. dr. R.W. Sauerwein en prof. dr. L.G. Visser
Co-promotor: dr. A. Scholzen
Radboud UMC Nijmegen, afd. Medische Microbiologie.
LUMC Leiden, afd. Infectieziekten

8 januari 2016 **O.V. Salo**
Secondary metabolism by industrially improved Penicillium chrysogenum strains
Promotor: prof. dr. A.J.M. Driessen
Rijksuniversiteit Groningen, afd. Moleculaire Microbiologie – Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute

15 januari 2016 **L.M. Sanchez**
Quorum sensing in Streptomyces coelicolor. Regulation of the SCB signalling system that controls the synthesis of antibiotics
Promotor: prof. dr. L. Dijkhuizen
Co-promotor: dr. J.M. Petrusma
Rijksuniversiteit Groningen, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute

15 januari 2016 **S.H. Merkling**
Resistance and tolerance to virus infection in Drosophila
Promotor: prof. dr. R. Sauerwein
Co-promotor: dr. R. van Rij
Radboud UMC Nijmegen, afd. Medische Microbiologie

22 januari 2016 **C.E. van de Sandt**
Influenza Virus-specific CD8+ T cells
Promotor: prof. dr. G.F. Rimmelzwaan en prof. dr. A.D.M.E. Osterhaus (emeritus)
Erasmus MC Rotterdam, afd. Viroscience

22 januari 2016 **C.M.A. van den Bosch**
Development of quality indicators for appropriate antibiotic use in daily hospital practice
Promotors: prof. dr. J.M. Prins en prof. dr. S.E. Geerlings
Co-promotor: prof. dr. M.E.J.L. Hulscher
AMC Amsterdam, Sectie Infectieziekten, Tropische Geneeskunde en AIDS, afd. Inwendige Geneeskunde

3 februari 2016 **M.K.S. van Duijl-Richter**
Dengue and chikungunya virus. Cell entry mechanisms and the impact of antibodies on infectivity
Promotors: prof. dr. J.M. Smit en prof. dr. A.M. van Oijen
UMC Groningen, afd. Medische Microbiologie -Moleculaire Virologie. Rijksuniversiteit Groningen, The Zerkine Institute for Advanced Materials (ZIAM)

4 februari 2016 **B.A. van Cleef**
MRSA in pig farms: human epidemiology
Promotors: prof. dr. J.A.J.W. Kluytmans en prof. dr. A. Voss
Co-promotor: dr. B.H.B van Benthem
VUmc Amsterdam, afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie. Radboud UMC Nijmegen, afd. Medische Microbiologie

5 februari 2016 **G.S. Freidl**
Influenza Virus Serology at the Human-Animal Interface
Promotor: prof. dr. M.P. G. Koopmans
Erasmus MC Rotterdam, afd. Viroscience

16 februari 2016 **M.A. van de Klundert**
On the molecular biology of the hepatitis B virus X protein
Promotor: prof. dr. H.L. Zaaijer
Co-promotor: dr. N.A. Kootstra
AMC Amsterdam, Sectie Infectieziekten, Tropische Geneeskunde en AIDS, afd. Inwendige Geneeskunde. Sanquin Research Amsterdam, afd. Bloedoverdraagbare Infecties

18 maart 2016 **Y. Bai**
Characterization of 4,6- α -glucanotransferase enzymes and their functional role in Lactobacillus reuteri
Promotor: prof. dr. L. Dijkhuizen
Co-promotor: dr. R.M. van der Kaaij
Rijksuniversiteit Groningen, Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute

AFSCHEIDSCOLLEGE

17 juni 2016 **prof. dr. H.A. Drexhage**
“Zoeken naar evenwicht. Over witte bloedcellen, hormonen, de schildklier, diabetes en ziekten van de geest”
Erasmus MC Rotterdam, afd. Immunologie

