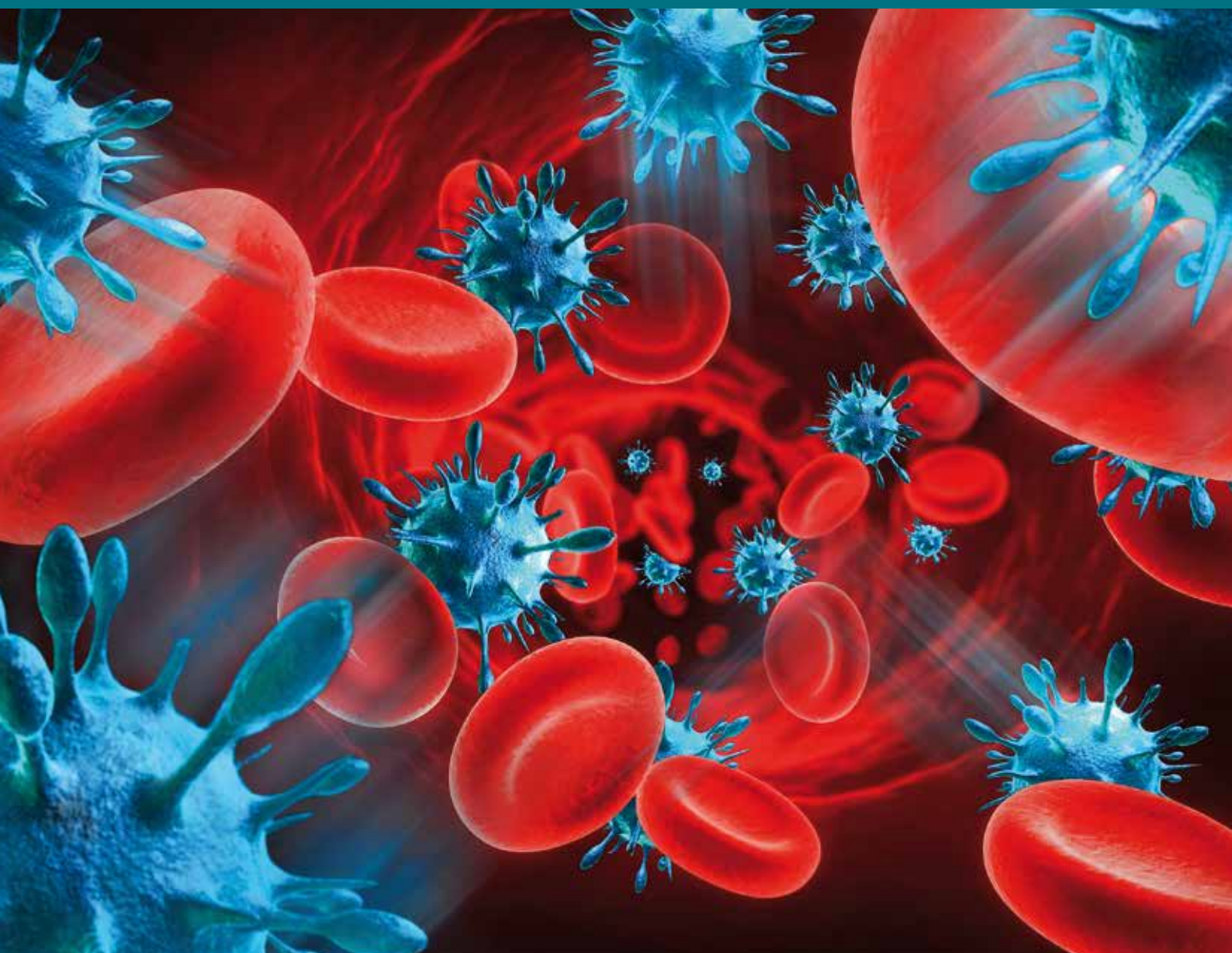


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Enterovirus- en parechovirusdiagnostiek en
-surveillance in Nederland

Infectieuze complicaties en antibiotische profylaxe
bij prostaatbiopsie

Moleculaire detectie van *Helicobacter pylori* en
de resistentie voor claritromycine

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

Hoofredactie

Dr. G.I. Andriess, mw. dr. E. Heikens

Redactie

Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,
mw. drs. M. Jager, dr. J.A. Kaan,
dr. J.S. Kalpoe, dr. M. Van Rijn,
dr. C. Vink, dr. H.F.L. Wertheim

Redactiesecretariaat

Van Zuiden Communications B.V.
Mw. M.S. Kapteyn-Brus
Tel. (0172) 476191, e-mail:
kapteyn@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: € 61,- per jaar
Buiten Nederland, in Europa: 85,- per jaar
Losse nummers: 12,50
Opgave abonnementen:
Tel. (0172) 47 61 91



© 2013, 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	48
Transmissieroute	
Gemeenschapsvoorzieningen: wie zal ze betalen? <i>G. Ruijs</i>	49
Artikelen	
Verleden, heden en toekomst van de enterovirus- en parechovirusdiagnostiek en -surveillance in Nederland <i>E. Duizer, K. Benschop, G. Uslu, E. Jusic, M. Schalk, G. Koen, H. van Eijk, K. de Haan, S. van der Sanden, H. van der Avoort, M. Koopmans, K. Wolthers</i>	50
Infectieuze complicaties en antibiotische profylaxe bij transrectale echogeïde prostaatbiopsie. Een retrospectief onderzoek en literatuuroverzicht <i>AL.M. Vlek, A.E.C. Ruiter, P.L.M. Vijverberg, J.A. Kaan</i>	56
Moleculaire detectie van <i>Helicobacter pylori</i> en de resistentie voor claritromycine <i>H.F. Wunderink, A. Russcher, M.J.A.W.M. van Bussel, E.C.J. Claas, K.E. Veldkamp</i>	62
Ingezonden	
COMBACTE <i>M.J.M. Bonten</i>	68
Nieuw onderzoek naar diagnostiek van STEC en HUSEC: STEC-ID-net <i>A.M.D. Kooistra-Smid, R.F. de Boer, P.D. Croughs, I.H.M. Friesema, D.W. Notermans, B. Wolters, M. Petrignani, T.P. Zomer, C.H.F.M. Waegemaekers, A. Ott, J.W.A. Rossen, A.W. Friedrich</i>	70
CBG	
Nieuwe behandelopties voor tuberculose <i>A. Vollaard, B. Voordouw</i>	74
Verenigingsnieuws	
'Biofilms on the move: foreign material-related infections'. Verslag 20 ^e NVAMM-symposium <i>M. McCall</i>	75
Samenvatting proefschrift	
Microbiological safety in endoscope reprocessing <i>J. Kovaleva</i>	78
Promoties en afscheidsrede	79, 81
Agenda	82
Auteursrichtlijnen	83

Foto omslag: Loes van Damme (l.h.vandamme@erasmusmc.nl) en Hans den Boer (j.denboer@erasmusmc.nl)
Erasmus MC, Afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten,
Postbus 2040, 3000 CA, Rotterdam.

De jaargetijden

E. Heikens

Onlangs heb ik met veel plezier 'ja' gezegd op de uitnodiging tot de hoofdredactie van het NTMM toe te treden, die ik nu samen vertegenwoordig met Gunnar Andriessse. Tijdens de Voorjaarsvergadering van de NVMM, op 17 april, is in de Algemene Ledenvergadering formeel mijn benoeming in de hoofdredactie bekrachtigd. Bij dezen wil ik dan ook de leden bedanken voor het vertrouwen.

Wij hebben helaas afscheid moeten nemen van een zeer gewaardeerd redactielid, Tineke Herremans. Hierbij wil ik haar, namens de redactie, hartelijk danken voor de inzet en betrokkenheid die ze de afgelopen jaren heeft getoond voor het NTMM.

Het winterseizoen is pas net voorbij of we spreken al weer over de aankomende zomer. De vier jaargetijden boeit de mens al eeuwen. Vivaldi componeerde er zelfs een wereldberoemd muziekstuk over, waarbij elk jaargetijde anders klinkt. Zo klinkt de zomer vrolijk en de winter weemoedig en somber. Het winterseizoen duurde dit jaar lang. Sinds 1987 is de maand maart met gemiddeld 2,5°C niet zo koud geweest en sinds 1955 is de luchtvochtigheid niet zo laag geweest. In koude, droge aerosolen is het influenza-virus goed stabiel, terwijl het virus in vochtige lucht snel sterft. Deze koude en droogte hebben er waarschijnlijk voor gezorgd dat we in 2012-2013 de langst durende, zei het mild verlopen, influenza-epidemie hebben gehad sinds 25 jaar. Met de komst van de zomer kunnen we ons opmaken voor de volgende seizoensgebonden infecties als gastro-enteritiden door onder meer barbecues en importziekten door reizen. Voordat u zich gaat richten op deze aankomende infecties, wil ik u meenemen naar een aantal interessante artikelen in deze uitgave van het NTMM, waarbij resistentieproblematiek centraal staat.

Methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en vancomycine-resistente enterokokken (VRE) komen steeds meer voor in ziekenhuizen over de hele wereld. In Nederland is de VRE veelvuldig in het nieuws geweest en kampen verschillende ziekenhuizen nog steeds met deze problematiek. Naast resistentie bij grampositieve bacteriën, neemt de prevalentie van multiresistente *Enterobacteriaceae* wereldwijd toe. Door deze resistentieproblematiek wordt de noodzaak van nieuwe antibiotica steeds groter. Om de ontwikkeling van nieuwe antibiotica

te stimuleren, is in 2012 een groot Europees programma gelanceerd. Marc Bonten laat ons kennis maken met dit Europese programma, waarvan de COMBACTE-studie een onderdeel vormt.

In het afgelopen decennium is het gebruik van ciprofloxacine én de resistentie ertegen toegenomen. Ciprofloxacine wordt onder meer gebruikt als profylacticum bij transrectale echogeleide prostaatbiopsie (TRUS-PB). Vlek en collega's onderzochten of er met de stijging van ciprofloxacine-resistentie, ook een toename wordt gezien in de incidentie van infectieuze complicaties (urinewegs-infecties en sepsis) na een TRUS-PB.

Een stijging in claritromycine-resistentie wordt onder meer gezien bij de moeilijk te kweken *Helicobacter*-bacterie. Claritromycine-resistentie is de belangrijkste oorzaak van het falen van de standaard eradicatortherapie bij *H. pylori*-infecties. Wunderink en collega's beschrijven de ontwikkeling van een moleculaire methode om *H. pylori* en claritromycine-resistentie te detecteren in maagbiopten, waardoor de noodzakelijke kweek voor het verkrijgen van een gevoeligheidsbepaling, mogelijk in de toekomst niet meer nodig is.

In de column van Vollaard en Voordouw worden we eraan herinnerd dat niet alleen resistentie onder gramnegatieve en grampositieve bacteriën een groeiend probleem is, maar ook resistentie onder mycobacteriën. De prevalentie van MultiDrugResistance-tuberculose (MDR-TB)-stammen blijft wereldwijd toenemen. Het behandelingschema voor MDR-TB is complex en de uitkomsten zijn matig. Echter, na jaren van wachten lijken er nieuwe perspectieven te zijn voor behandeling, welke in deze column besproken worden.

Naast resistentieproblematiek passeren in dit nummer van het NTMM nog een paar zeer interessante onderwerpen de revue. Mij rest dan ook niet anders dan u veel leesplezier toe te wensen en daarnaast, met het aankomende zomerseizoen, een fijne vakantie met zon en ontspanning!

Gemeenschapsvoorzieningen: wie zal dat betalen?

G.J.H.M. Ruijs

Al is de verleiding groot om het met u te hebben over wat in de oude Maya-geschriften staat geschreven over 01-01-2015, of over wat Nostradamus daarover heeft gezegd, toch ga ik iets anders, ook voorspelbaar, bespreken. Wat me altijd is opgevallen aan Nederlanders is dat hun gemeenschapszin goed is ontwikkeld. Zet ergens een Vinexwijk neer en het bestuur van de nieuwe voetbalclub is al gevormd nog voordat de eerste groene waas op het hoofdveld te zien is. Er wordt al bij de buurtbarbecue aan de rosé genipt nog voordat de eerste straatklinkers zijn gelegd. Ook in de medische microbiologie zijn genoeg voorbeelden van die gemeenschapszin. Ook zo'n behoefte aan een helder isolatiebeleid in je ziekenhuis, aan rechttoe-rechtaanrichtlijnen voor preventie van postoperatieve wondinfecties, hoe we het beste lijninfecties kunnen voorkomen? En ziedaar, de Werkgroep Infectiepreventie (WIP) is geboren. Wil ik wat meer inzicht in mijn eigen laboratoriumdiagnostiek? De Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Microbiologie (SKMM), inmiddels opgegaan in de multidisciplinaire Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoriumdiagnostiek (SKML), ziet het licht. En zo kennen we nu vele initiatieven, zoals de Stichting Werkgroep Antibioticabeleid (SWAB), de Kwaliteitsrichtlijn voor Infectiepreventie in Ziekenhuizen (KRIZ) met bijbehorende visitatie, de Stichting voor de bevordering van de kwaliteit van het laboratoriumonderzoek en voor de accreditatie van laboratoria in de gezondheidszorg (CCKL), opgegaan in de Raad voor Accreditatie, het Infectieziekten-surveillance Informatie systeem – web (ISIS-web) en nog veel meer. Die stichtingen werden opgericht en bestuurd door bevlogen collega's. Uiteraard *pro deo*, want een dergelijke functie is natuurlijk een grote eer en streling van het soms meer dan kamerbrede ego. Ook de werkzaamheden in de verschillende werkgroepen van dergelijke stichtingen werden – en worden – in de regel om niet verricht. Het kan ook inderdaad erg inspirerend zijn om met leuke, geïnteresseerde collega's samen te werken. Die oprichters zijn natuurlijk niet helemaal de domsten en veel stichtingen zijn gaan bloeien. Na verloop van tijd gaan dan de werkzaamheden de mogelijkheden van de bestuursleden overstijgen en de eerste professional wordt aangetrokken, een secretaresse. De staf wordt gaandeweg verder uitgebreid met eigen beleidsmedewerkers, een

managing director en zo voort. De *vrijwilligersfase* gaat over in de *professionele fase*.

De subsidiënt, vaak het ministerie van VWS (via het Centrum voor Infectieziektebestrijding van het RIVM), soms klanten van stichtingen, merkt dat de kosten stijgen en is daar vaak erg kritisch over. Geheel onterecht, hij zou er juist erg tevreden over moeten zijn, want de stichting is een succes. De stichting doet er toe! Professionalisering is de uiting daarvan. Want hoe romantisch het beeld van stichtingen vol met druk *pro deo* rondzoemende moeder Theresa's ook is, het is weinig realistisch.

Veel stichtingen zijn ooit begonnen met subsidie van het ministerie van VWS. Als het om beperkte bedragen gaat, is dat ook de meest efficiënte oplossing. Je vermijdt inningskosten. Maar het is ook riskant. Het kan zijn dat de stichting moet inkrimpen omdat de ABN AMRO een steuntje in de rug nodig heeft, of dat we onze Mediterrane vrienden moeten bijspringen omdat die wat ruimhartige opvattingen hebben over het vanuit publieke middelen verwennen van familie, vrienden en kennissen. Zeker voor doorgroeiende stichtingen is het beter om de financieringsbronnen te verleggen naar de klanten. Dat is eenvoudiger als er fysieke producten worden geleverd (SKML, PREZIES) dan wanneer het product meer op een gemeenschapsvoorziening lijkt (WIP, SWAB). Toch is het ook in het laatste geval wijs om met de klanten, in dit geval de ziekenhuizen, een financiële relatie aan te gaan, bijvoorbeeld bij de WIP in de vorm van een abonnement op de richtlijnen. Een nadeel is wel dat dit ten koste gaat van het karakter van gemeenschapsvoorziening, maar de door de klanten gewenste groei wordt in ieder geval wel mogelijk. Heb ik deze voorspelbare natuurlijke historie zelf bedacht? Natuurlijk niet. Dat kon je al lezen in de oude Maya-geschriften. Of was het in die van Nostradamus...

De Transmissieroute wordt voorgezet door J.A. Kaan, arts-microbioloog in het Diaconessenhuis Utrecht.

Dr. G.J.H.M., Ruijs, arts-microbioloog Laboratorium voor Medische, Microbiologie en Infectieziekten, Isala klinieken, Zwolle, e-mail: g.j.h.m.ruijs@isala.nl.

Verleden, heden en toekomst van de enterovirus- en parechovirusdiagnostiek en -surveillance in Nederland

E. Duizer, K. Benschop, G. Uslu, E. Jusic, M. Schalk, G. Koen, H. van Eijk, K. de Haan, S. van der Sanden, H. van der Avoort, M. Koopmans, K. Wolthers

Samenvatting

De diagnostiek van enterovirussen is decennialang verricht op basis van viruskweekmethoden. Suspensies van klinische materialen zoals feces of liquor werden meestal geënt op drie verschillende celculturen, waaronder tertiaire apenniercellen (TAN). Momenteel gebruiken de meeste Nederlandse laboratoria moleculairbiologische methoden voor de detectie van enterovirussen en parechovirussen. Omdat deze methoden gevoeliger zijn en veel sneller tot een diagnose kunnen leiden, is het aantal laboratoria dat nog viruskweek verricht afgenomen. Daarmee is ook de vraag naar de TAN afgenomen, en deze worden dan ook niet meer geproduceerd en geleverd. Ten behoeve van de laboratoria die nog wel virus willen kweken is voor de entero- en parechovirussen uitgezocht welke combinatie van celculturen een vergelijkbare of betere gevoeligheid hebben dan de TAN: een combinatie van RD- en HT29-cellen lijkt hiervoor het meest geschikt.

Door moleculaire detectiemethoden voor enterovirussen en parechovirussen is de tijd-tot-resultaat verkort van 5 tot 7 dagen naar minder dan 24 uur. Deze verandering impliceert ook de noodzaak tot een andere opzet van enterovirus-surveillance-activiteiten. Op dit moment wordt hiertoe een pilot van een nieuw EV-surveillancestelsel uitgevoerd, TypeNed, waarbij de Nederlandse virologische laboratoria samen met het RIVM de surveillance van entero- en parechovirussen via een gezamenlijk database verrichten.

Trefwoorden

Enterovirus, parechovirus, viruskweek, TypeNed

Abstract

For many years, the diagnosis of enteroviruses was based on virus culture methods. Suspensions of feces or liquor were used to infect different cell cultures, of which the tertiary monkey kidney cells (TMKs) were one. Currently most Dutch clinical laboratories use molecular biological techniques for the detection of enteroviruses and parecho-

viruses. The molecular techniques are more sensitive and have a shorter time-to-result. Hence, the demand for TMKs is decreasing and the RIVM has ceased to produce and deliver these cells. We investigated which combination of cells can replace the TMK. We found that a combination of the RD and HT29 cell lines was at least as sensitive and generic for detecting enteroviruses and parechovirus as the cell combinations that included TMKs. The changes in detection methods for the entero- and parechoviruses and implementation of (decentralized) molecular typing necessitated implementation of a new surveillance system. Currently, several Dutch Virology laboratories and the RIVM are cooperating in the TypeNed Enterovirus initiative, in which the entero- and parechovirus surveillance is based on detection and typing in any of the participating labs and data are collected and available for analysis via a central database.

Inleiding

Humane enterovirussen (EV) en humane parechovirussen (HPEV) zijn belangrijke veroorzakers van virale infecties bij kinderen. Infecties zijn vaak asymptomatisch maar bij symptomatische infecties kunnen de klinische symptomen variëren van non-specifieke koorts tot meningitis.^{1,2} Beide genera behoren tot de familie van de picornavirussen en zijn dus kleine RNA-virussen zonder een enveloppe. De humane enterovirussen (genus Enterovirus) werden vroeger ingedeeld op basis van pathogeni-

Auteurs: E. Duizer, K. Benschop, G. Uslu, E. Jusic, S. van der Sanden, H. van der Avoort, M. Koopmans: Centrum voor Infectieziekteonderzoek, Diagnostiek en Screening (IDS, voorheen LIS), Clb, RIVM. M. Schalk: Centrum voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (Z&O, voorheen LZO), Clb, RIVM. G. Koen, H. van Eijk, K. de Haan, K. Wolthers: Laboratorium voor Klinische Virologie, AMC. Correspondentieadres: E. Duizer Erwin.Duizer@rivm.nl, tel: 030 2744142.

citeit in mensen, proefdieren of celkweek in de species poliovirussen (PV), Coxsackie A (CVA) en Coxsackie B-virussen (CVB) en ECHO-virussen. Tegenwoordig wordt echter een classificatie gehanteerd op basis van sequenties en genetische verwantschap, waarbij de PV, CVA en B en ECHO-virussen zijn onderverdeeld in vier species: enterovirus A-D. Nieuwe typen worden doorgenummerd als EV68, EV69, tot inmiddels EV119 (*tabel 1*, zie ook www.picornaviridae.com). Sequentieanalyse toonde aan dat de ECHO-virussen 22 en 23 niet tot het genus *Enterovirus* behoren maar tot het nieuwe genus *Parechovirus*. Deze virussen zijn dan ook hernoemd tot HPeV1 en 2, respectievelijk. Momenteel zijn er 16 HPeV-typen beschreven (www.picornaviridae.com/). De laatste jaren is er een aantal ontwikkelingen geweest in de mogelijkheden en methoden voor EV- en HPeV-diagnostiek, -typering en -surveillance. Zo is het voor het RIVM niet meer mogelijk de veelgebruikte tertiaire apenniercellen (TAN-cellen) aan te bieden voor diagnostiek en wordt inmiddels de meeste EV- en HPeV-diagnostiek verricht met moleculaire technieken. In dit artikel geven we de essentie van deze veranderingen weer.

Kweek en neutralisatie: vroeger en post-TAN

Tot enkele jaren geleden was de standaardmethode voor EV-diagnostiek een viruskweekmethode. Meestal werden suspensies van klinische materialen (zoals feces, keeluitstrijkjes, bloed of liquormonsters) geënt op minimaal drie verschillende celculturen.^{1,3,4,5} Een van de meest gebruikte celculturen was de tertiaire apenniercelcultuur (TAN), waarvoor een grote gevoeligheid voor vele verschillende virussen is beschreven.⁶ Deze cellen werden door het RIVM aan alle laboratoria uit één batch geleverd, waardoor er voor deze cellen binnen Nederland een hoge mate van standaardisatie mogelijk was.

De tertiaire apenniercellen (TAN-cellen) die sinds de jaren zeventig gebruikt zijn voor onder andere de enteroviruskweek in Nederland werden geleverd door het RIVM. Primaire apenniercellen werden geïsoleerd uit cynomolgus macaques en vervolgens 'één passage vermeerderd op

microcarriers. De oogst van deze microcarrierkweek werd na trypsiniseren ingevroren (secundaire apenniercellen). Deze cellen werden opgeslagen en verstuurd; na ontdooien en enten op buizen of celkweekclusters ontstaat er een monolayer van TAN-cellen die standaard in de virale diagnostiek werden gebruikt.⁷ De TAN-cellen kunnen nog zeker 10 passages worden doorgezet maar het is niet bekend of de diagnostische gevoeligheid gehandhaafd blijft.

Andere celculturen die werden gebruikt voor het kweken van enterovirussen waren onder andere de humane embryonale longcellijnen HEL of GaBi, en de Verocellijn (African Green Monkey, nier) (*tabel 2*). Deze cellijnen konden per laboratorium verschillen, hetgeen kon leiden tot verschillende gevoeligheden in de detectie van verschillende EV's. Meestal was het cytopathologische effect (CPE) dat EV's veroorzaken niet voldoende typisch om op grond daarvan te typeren maar het isolaat kon worden gekarakteriseerd met behulp van neutralisatie met specifieke EV-antilichaam-pools.⁸ De gewone diagnose van een virale encefalitis op basis van kweek kon op die manier zeker vijf tot zeven dagen duren en tweemaal zo lang als er moest worden getypeerd.

Mede vanwege de veel kortere tijd-tot-resultaat zijn de laatste jaren de meeste laboratoria overgegaan op moleculair-biologische methoden voor de detectie van vele virussen, waaronder de EV's en HPeV's. Hierdoor is de noodzaak voor de infrastructuur en financieel belastende kweekfaciliteiten voor virologische laboratoria enorm afgenomen en is er sinds 2005 een sterke daling in het aantal laboratoria dat nog EV-kweek verricht (*figuur 1*). Vanwege de afgenomen noodzaak voor kweek is ook de behoefte aan secundaire apenniercellen verminderd en daarmee ook reden om nog apen te offeren voor dit doel. Na enkele vooraankondigingen op voor- en najaarsvergaderingen van de Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie (NWKV) is het RIVM per januari 2011 gestopt met de uitgave van de secundaire apenniercellen. Om een goede inschatting te kunnen maken of de laboratoria die nog wel kweken, ook zonder de TAN-cellen een goede

Tabel 1. Indeling van enterovirusserotypen in de genetisch bepaalde Enterovirus-A- tot D-species (aangepast van Van der Sanden).¹⁹

	Species A	Species B	Species C	Species D
Polioviruses			1-3	
Coxsackie-A-virussen	2-8, 10, 12, 14, 16	9	1, 11, 13, 15, 17-22, 24	
Coxsackie-B-virussen		1-6		
ECHO-viruses		1-9, 11-21, 24-27, 29-34		
Enteroviruses	71, 76, 89-92, 114, 119	69, 73-75, 77-88, 93, 97-98, 101, 106-107	95-96, 99, 102, 104-105, 109, 113, 116-118	68, 70, 94, 111

Tabel 2. Percentage positieve EV- en HPeV-kweken per celcultuur van suspensies van klinische materialen (2009-2011, voornamelijk feces).

Enterovirus		Apenier		Humaan long			Humaan mix			Muis+
species	Serotype	TAN	Vero	HEL	GaBi	A549	RD	HEp-2	HT29	L2oB
A	CVA	24,0	30,8	28,6	33,3*	7,7	88,9	23,1	12,5	0*
	EV71	94,1	-	100*	90,0*	-	93,8	0*	16,7*	0*
B	CVA9	90,9	100*	75,0*	80,0*	100*	0*	0*	100*	0*
	CVB	96,4	100*	60,0	31,0	100*	62,8	64,3	100	0*
	ECHO	83,2	41,7	97,5	81,5	84,0	77,9	10,5	93,8	0
C	CVA	50,0*	-	-	66,6*	-	-	-	100*	0*
	PV [‡]	>95%	>95%	>95%	>95%	>95%	>95%	>95%	>95%	>95%
D	EV68 [#]	9,5	-	-	-	-	66,6*	-	-	-
HPeV	HPeV1,2,4-6	38,7	68,8	17,6	0*	38,5	50,0	0*	96,8	0*
	HPeV3	66,7*	33,3*	0*	-	33,3*	100*	-	0*	-

Detectiepercentages > 60% zijn donkergrijs gekleurd, Detectiepercentages van 40-60% zijn lichtgrijs gekleurd; *: minder dan 10 kweken ingezet; -: niet getest; ‡: niet gebaseerd op diagnostiekmonsters maar experimenteel bepaald; #: EV68 positieve kweken voor kweek op 33°C, bij 37°C is 33,3% positief in kweek op RD-cellen.

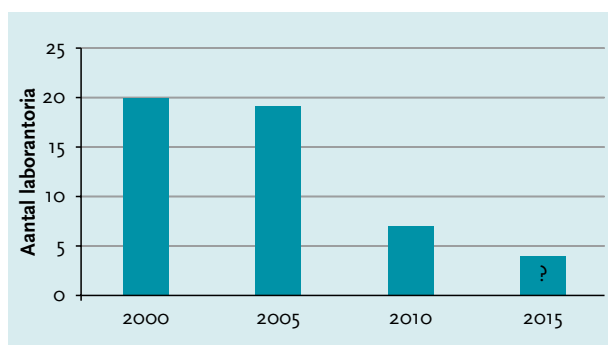
gevoeligheid kunnen bereiken, zijn de kweekgegevens van de EV/HPeV-diagnostieaanvragen van het RIVM en het AMC van 2009 tot 2011 geanalyseerd (tabel 2). Het RIVM inoculeerde voor diagnostiek in principe 100 µl van een 20% fecessuspensie na chloroformextractie⁹ op drie tot zeven dagen oude cellen in rollerbuizen in een totaal volume van 1 ml. De viruskweek werd verricht bij 37°C, roterend bij 3 rpm en de cellen werden op CPE beoordeeld gedurende 7 tot 14 dagen. Het AMC bereidde fecessuspensie in 2% bouillon en inoculeerde 150 µl gefilterde suspensie op de cellen in 24-well kweekclusters. Na indraaien (3500 g, 15 min, kamertemperatuur) werd gekweekt bij 37°C, 5% CO₂ tot een maximum van 21 dagen.¹⁰

Een analyse van verschillende EV's en HPeV's gekweekt op een panel van cellijnen toont aan dat EV-detectie met behulp van kweek type-species afhankelijk is. ECHO-virussen (EV-B) zijn goed te kweken op zes van de negen geteste cellijnen (tabel 2). De A549 (humane longcarcinoomcellijn), HT29 (humaan colorectaal adeno-

carcinoomcellijn) en TAN-celculturen zijn ook zeer geschikt voor andere leden van species B; CVB en CVA9. Ook in een eerder onderzoek waarbij verschillende typen met behulp van celkweekgeïsoleerde EV's en HPeV's werden gekweekt op verschillende cellijnen bleek de HT29 in staat om de meeste typen te detecteren.¹¹ Ondanks dat deze qua origine vergelijkbaar is met de TAN-celcultuur, blijkt de Verocellijn minder geschikt voor het kweken van ECHO-virussen. De RD-cellijn (humaan rhabdomyosarcoom) is minder geschikt voor CVB en CVA9 en de HEL- en GaBi-cellijnen zijn minder geschikt voor CVB. Voor de CVA's van species A blijkt de RD-cellijn de meest geschikte te zijn. EV71, van dezelfde groep, is ook goed op te kweken op de HEL-, TAN- en GaBi-cellijnen.

HPeV's geven een vergelijkbaar CPE als EV's op apenniercellen, waardoor ze eerst geclassificeerd werden als ECHO-virussen. Hoewel HPeV's gekweekt konden worden op deze cellijnen, zijn deze drie cellijnen niet optimaal om een hoge detectiegraad te verkrijgen voor HPeV's. Zoals eerder beschreven door Benschop et al.¹² en Schalk et al.¹¹ is HT29 ook een geschikte cellijn voor HPeV's. Dit wordt voornamelijk bepaald door de hoge detectie van HPeV1 in onze materialen. HPeV2, 3, 4 en 6 werden ook gekweekt, maar te kleine aantallen (max. drie isolaten per type) om een geschikte cellijn aan te wijzen voor deze typen. Benschop et al.¹² beschreven dat HPeV2, 4 tot 6 ook goed op te kweken waren op de HT29-cellijn, maar HPeV3 was alleen goed te kweken op apennieren zoals Vero, met weliswaar trage productie van CPE.¹³ Dit geldt ook voor HPeV6 op de HT29-cellijn. De verzamelde kweekresultaten laten ook zien dat met een celpanel bestaande uit de RD- en HT29-cellijn een zeer brede virusisolatie mogelijk is van zowel EV als HPeV, waarmee een goed alternatief voor TAN voorhanden is.

Figuur 1. Aantal Nederlandse laboratoria met kweekfaciliteiten voor enterovirusdiagnostiek.



Heden: moleculaire detectie en typering

Detectie

Tegenwoordig gebruiken steeds meer laboratoria (real-time) Reverse Transcriptase (RT)-PCR voor de detectie van EV en HPeV uit klinische materialen, met name uit liquor waar snelheid geboden is en de virale concentratie vrij laag.^{1,2,14} Voor moleculaire detectie kan het RNA uit de klinische materialen worden geëxtraheerd. Dit kan manueel (Boom-methode of de QIAamp viral RNA minikit (Qiagen)) of geautomatiseerd (MagnaPure LC (Roche) of easyMAG (bioMérieux)).^{15,16} Een belangrijk aspect in moleculaire diagnostiek is de co-extractie van componenten die de RT- en PCR-enzymen kunnen inhiberen, wat kan leiden tot fout-negatieve resultaten. Het is daarom nodig om interne controles mee te nemen in de extractie waarmee de gehele moleculaire procedure kan worden gecontroleerd.^{10,17} De huidige PCR's voor EV- en HPeV-diagnostiek zijn gericht op de geconserveerde 5'UTR.^{17,18,19,20} Omdat de 5'UTR van EV's verschillend zijn van de 5'UTR van HPeV's zijn wel aparte PCR's vereist.^{21,22} Hiervoor zijn er specifiek EV- en HPeV-primers en -probes ontwikkeld en is er snel onderscheid te maken tussen beide virussen, wat niet kan met behulp van kweek. Het grote voordeel van de moleculaire detectie van EV en HPeV met behulp van realtime-RT-PCR is de hoge gevoeligheid van PCR en veel grotere snelheid; op veel laboratoria is nu binnen acht uur een uitslag mogelijk. Met een gevoeligheid van 100 RNA-kopieën in PCR, kunnen EV's en HPeV's in klinische materialen snel en efficiënt worden gedetecteerd, vooral in liquor waar de virale load zeer laag is. Detectie door end-point PCR's en gelelektroforese zijn ook beschreven, maar zijn arbeidsintensief en duren langer voor een resultaat kan worden gegeven.

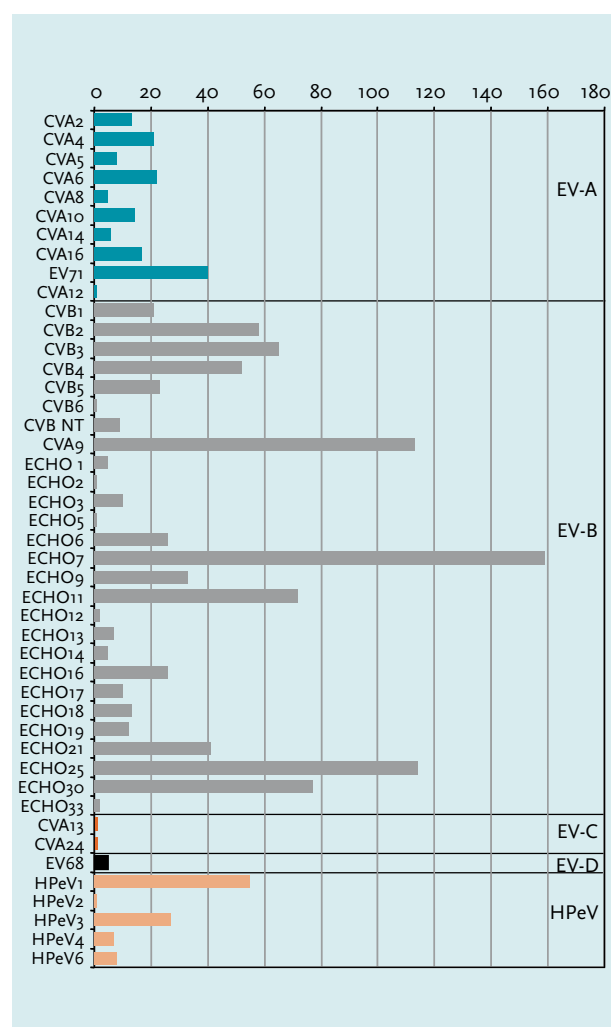
Ondanks dat de celkweekmethode niet standaard meer wordt gebruikt, is het van belang dat materialen worden behandeld en opgeslagen zodat deze nog bruikbaar zijn voor eventuele virusisolatie in de toekomst. Benschop et al.¹ beschreef een succespercentage van 43% voor het opkweken van de PCR-positieve materialen op verschillende cellijnen. Het kunnen opkweken van PCR-positieve materialen hangt voor een groot deel af van het type virus, de omstandigheden waaronder de klinische materialen zijn bewaard en van de hoeveelheid virus, uitgedrukt in de Ct-waarde. In het algemeen zijn virussen uit verse of diepgevroren materialen met een Ct beneden de 32 cycli vrij goed te kweken. Bij een Ct-waarde groter dan 32 wordt de kans op het kweken van het virus steeds minder en bij een Ct van 37 zal vrijwel nauwelijks virus te kweken zijn.¹

Surveillance en typering van EV en HPeV

In Nederland wordt de surveillance van enterovirussen verricht in een samenwerkingsverband tussen het RIVM

en 22 virologische laboratoria, vertegenwoordigd in de NWKV. Deze surveillance dient twee doelen: in de eerste plaats het uitsluiten van een poliovirusinfectie en in de tweede plaats het typeren van de gevonden EV's. Na de detectie van HPeV's onder ontypeerbare EV's en hun bewezen klinische relevantie^{4,21}, zijn HPeV's toegevoegd aan de enterovirus-surveillance. In de huidige situatie vindt in verschillende laboratoria de moleculaire detectie van EV plaats waarna positieve monsters naar het RIVM worden gestuurd voor typering. Enterovirus-typering wordt gedaan op basis van sequentie-bepaling van een deel van het VP1-capside-gen (327 nucleotide).²⁰ De typering kan direct uit klinisch materiaal worden uitgevoerd,¹² waardoor snel een resultaat kan worden verkregen. De verkregen sequentie wordt vergeleken in de Enterovirus Genotyping Tool²³ (www.rivm.nl/mpf/enterovirus/typingtool) om op basis van hoogste homologie de gevonden sequentie te typeren. De resultaten verkregen via genotypering is voor de jaren 2010 en 2011 weergegeven in *figuur 2*.

Figuur 2. EV-typeringen van 2010 en 2011 (RIVM). Op de horizontale-as staat het aantal getypeerde stammen in deze 2 jaren; op de verticale as de geclusterde serotypen.



Deze figuur laat de grote variatie in gevonden stammen goed zien.¹⁹

Toekomst: datasharing en TypeNed

Omdat op dit moment steeds meer laboratoria de mogelijkheid en capaciteit ontwikkelen om ook zelf de moleculaire EV- en HPeV-typering uit te voeren, dreigt een hiaat te ontstaan in de nationale enterovirus-surveillance. Om dit te ondervangen is het EV TypeNed-initiatief gestart.²⁵ TypeNed is een initiatief van een aantal Nederlandse medisch-microbiologische laboratoria samen met het RIVM, om te komen tot afstemming van typeringsmethoden, afspraken over de functies van een referentielaboratorium en het uitwisselen van data, om zowel vraagstellingen op ziekenhuis- of patiëntniveau als (inter)nationale vraagstellingen beter te kunnen beantwoorden.²⁵ Via TypeNed zijn ook gestandaardiseerde protocollen voor de moleculaire diagnostiek en typering verkrijgbaar (www.TypeNed.nl).

Voor het uitwisselen en analyseren van data wordt gebruik gemaakt van de ICT-infrastructuur die is ontwikkeld op het RIVM, het moleculair platform. Binnen deze software zijn voorzieningen gemaakt voor toegangsbeheer, worden de sequenties automatisch getypeerd door de typingtool en zijn enkele modules ontwikkeld voor de analyse en visualisatie daarvan. Aangezien alle laboratoria in grote lijnen hetzelfde protocol gebruiken, zijn de enterovirustyperingsdata goed vergelijkbaar. Een klein aantal klinische en epidemiologische data wordt toegevoegd, zoals de leeftijdsgroep waartoe de patiënt behoort en de aan- of afwezigheid van enterale en neurologische symptomen. Naast EV-sequenties worden ook HPeV-sequenties uitgewisseld.

Conclusies

Door de hogere gevoeligheid en grotere snelheid die wordt behaald voor de diagnostiek van voor enterovirus of parechovirus verdachte monsters door middel van moleculaire technieken ten opzichte van diagnostiek via klassieke kweekmethoden, is het aantal laboratoria dat kweekmethoden gebruikt voor EV- en HPeV-diagnostiek afgenomen. Daarbij is een oude gouden standaard voor de kweek, de TAN-cellen, niet meer beschikbaar voor deze vorm van diagnostiek. De gecombineerde data van het RIVM en AMC laten echter zien dat met een combinatie van RD- met HT29-cellen een vergelijkbare of zelfs betere diagnostische opbrengst (hoger aantal kweekpositieven) voor de EV- en HPeV-inzendingen kan worden behaald dan met de combinatie TAN en RD.

Voor de technische detectie en typering van deze virussen zijn de huidige moleculaire testen echter superieur en met het TypeNed-initiatief kan een nog hoger niveau van EV- en HPeV-surveillance worden bereikt.

Referenties

1. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis.* 1995;20:971-81.
2. Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, et al. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis.* 2008;47:358-63.
3. Terletskaia-Ladwig E, Meier S, Hahn R, Leinmuller M, Schneider F, Enders M. A convenient rapid culture assay for the detection of enteroviruses in clinical samples: comparison with conventional cell culture and RT-PCR. *J Med Microbiol.* 2008;57:1000-6.
4. van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M, van der Avoort H. Prevalence of human parechovirus in the Netherlands in 2000 to 2007. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2884-9.
5. van Doornum GJ, Schutten M, Voermans J, Guldemeester GJ, Niesters HG. Development and implementation of real-time nucleic acid amplification for the detection of enterovirus infections in comparison to rapid culture of various clinical specimens. *J Med Virol.* 2007;79:1868-76.
6. van Loon AM, Cleator GC, Ras A. External quality assessment of enterovirus detection and typing. European Union Concerted Action on Virus Meningitis and Encephalitis. *Bull World Health Organ.* 1999;77:217-23.
7. van Wezel AL, van Steenis G, van der Marel P, Osterhaus AD. Inactivated poliovirus vaccine: current production methods and new developments. *Rev Infect Dis.* 1984;6 Suppl 2:S335-40.
8. van Olphen M, Kapsenberg JG, van de Baan E, Kroon WA. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol.* 1984;47:927-32.
9. Kapsenberg JG, Ras A, Korte J. Improvement of enterovirus neutralization by treatment with sodium deoxycholate or chloroform. *Intervirology.* 1979;12:329-34.
10. Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J Clin Virol.* 2008;41:69-74.
11. Schalk JAC, Rutjes SA, Docters van Leeuwen AE, de Roda Husman AM 2009. Detectie van infectieuze enterovirussen met celkweek-PCR voor de in Nederland wettelijk vereiste infectierisicoschatting voor drinkwater. RIVM rapport 330204003.
12. Benschop K, Minnaar R, Koen G, van Eijk H, Dijkman K, Westerhuis B, et al. Detection of human enterovirus and human parechovirus (HPeV) genotypes from clinical stool samples: polymerase chain reaction and direct molecular typing, culture characteristics, and serotyping. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;68:166-73.
13. Westerhuis BM, Koen G, Wildenbeest JG, Pajkrt D, de Jong MD, Benschop KS, et al. Specific cell tropism and neutralization of human parechovirus types 1 and 3: implications for pathogenesis and therapy development. *J Gen Virol.* 2012;93:2363-70.
14. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:165-256.
15. Shulman LM, Hindiyeh M, Muhsen K, Cohen D, Mendelson E, Sofer D. Evaluation of four different systems for extraction of RNA from stool suspensions using MS-2 coliphage as an exogenous control for RT-PCR inhibition. *PLoS One* 2012;7:e39455.
16. Svraka S, van der Veer B, Duizer E, Dekkers J, Koopmans M, Vennema H. Novel approach for detection of enteric viruses to enable syndrome surveillance of acute viral gastroenteritis. *J Clin Microbiol.* 2009;47:1674-9.
17. Noordhoek GT, Weel JF, Poelstra E, Hooghiemstra M, Brandenburg AH. Clinical validation of a new real-time PCR assay for detection of enteroviruses and parechoviruses, and implications for diagnostic procedures. *J Clin Virol.* 2008;41:75-80.
18. Benschop KS, Williams CH, Wolthers KC, Stanway G, Simmonds P. Widespread recombination within human parechoviruses: analysis of temporal dynamics and constraints. *J Gen Virol.* 2008;89:1030-5.

19. Harvala H, Robertson I, McWilliam Leitch EC, Benschop K, Wolthers KC, Templeton K, et al. Epidemiology and clinical associations of human parechovirus respiratory infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3446-53.
20. Nix WA, Maher K, Johansson ES, Niklasson B, Lindberg AM, Pallansch MA, et al. Detection of all known parechoviruses by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2519-24.
21. Benschop KS, Schinkel J, Minnaar RP, Pajkrt D, Spanjerberg L, Kraakman HC, et al. Human parechovirus infections in Dutch children and the association between serotype and disease severity. *Clin Infect Dis.* 2006;42:204-10.
22. Hyypia T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, Auvinen P, et al. A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:8847-51.
23. Kroneman A, Vennema H, Deforche K, v d Avoort H, Penaranda S, Oberste MS, et al. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses. *J Clin Virol.* 2011;51:121-5.
24. van der Sanden S. Prevalence and genetic diversity of human enteroviruses in the context of poliovirus eradication. PhD thesis Erasmus University Rotterdam. 2011. ISBN:978-90-6464-511-2.
25. Niesters H, Rossen J, van der Avoort H, Baas D, Benschop K, Claas E, et al. Laboratory-based surveillance in the molecular era: the TYPENED model, a joint data-sharing platform for clinical and public health laboratories. *Euro Surveill.* 2013;24 pii: 20387.

Infectieuze complicaties en antibiotische profylaxe bij transrectale echogeleide prostaatbiopsie

Een retrospectief onderzoek en literatuuroverzicht

A.L.M. Vlek, A.E.C. Ruiter, P.L.M. Vijverberg, J.A. Kaan

Samenvatting

Doel: transrectale echogeleide prostaatbiopsie (TRUS-PB) vindt doorgaans plaats onder ciprofloxacineprofylaxe. In de westerse wereld wordt een stijging gezien in het gebruik van ciprofloxacine en de resistentie van gramnegatieve verwekkers. Wij onderzochten of er een toename aantoonbaar is in de incidentie van infectieuze complicaties na TRUS-PB, en of er literatuur beschikbaar is die aanpassing van het huidige profylactische regime ondersteunt.

Methoden: retrospectieve analyse van klinische en microbiologische gegevens rond TRUS-PB in het St. Antonius Ziekenhuis en literatuuronderzoek naar profylactische regimes.

Resultaten: analyse van 2736 ingrepen toonde een stijging in de incidentie van koorts na TRUS-PB van 0,4% in 2008 tot 3,0% in 2011, ondanks gebruik van ciprofloxacineprofylaxe. Ook de incidentie van urineweginfecties en sepsis nam toe, net als de incidentie van ciprofloxacine-resistentie onder verwekkers van deze infecties. Er is geen literatuur beschikbaar die de overstap naar een ander profylactisch regime ondersteunt.

Conclusie: bij patiënten met infecties na TRUS-PB is een nauwkeurig beleid essentieel. Een urinekweek dient altijd te worden verricht voorafgaand aan antibiotische behandeling. Bij empirische antibioticumkeuze moet rekening gehouden worden met de kans op ciprofloxacine-resistentie. Als profylaxe verdient een eenmalige dosering ciprofloxacine de voorkeur. Gezien de verwachte verdere stijging in ciprofloxacine-resistentie is meer onderzoek naar alternatieve profylactische regimes noodzakelijk.

Trefwoorden

Prostaatbiopsie, antibiotische profylaxe, ciprofloxacine, resistentie

Abstract

Objective: transrectal ultrasound guided prostate biopsy (TRUS-PB) is regularly performed in conjunction with ciprofloxacin prophylaxis. In the western world both cipro-

floxacin use and resistance among Gram-negative bacteria are rising. We investigated whether the incidence of infections following TRUS-PB is increasing, and whether evidence is available to support adjustment of the current prophylactic regimen.

Methods: retrospective analysis of clinical and microbiological data of 2736 procedures conducted in the St. Antonius Hospital from 2008 to 2011, and review of literature on prophylactic regimens.

Results: there has been an increase in the incidence of fever after TRUS-PB from 0.4 percent in 2008 to 3.0 percent in 2011, despite prophylactic ciprofloxacin use. Also the incidence of urinary tract infections and sepsis after TRUS-PB have increased, as well as ciprofloxacin resistance among causative pathogens. No evidence is currently available to support alternative prophylactic regimens.

Conclusions: in patients with infections after TRUS-PB, accurate management is crucial. Urinary cultures are always indicated preceding antibiotic treatment. The high risk of ciprofloxacin resistance should be taken into account when starting empiric antibiotic treatment. A single dose of ciprofloxacin is the prophylactic agent of first choice. Given the expected further rise in ciprofloxacin resistance, more research on alternative prophylactic regimens is needed.

Keywords

Prostate biopsy, antibiotic prophylaxis, ciprofloxacin, resistance

Auteurs: dr. A.L.M. Vlek, AIOS Medische Microbiologie, UMC Utrecht, Utrecht; drs. Annebeth E.C. Ruiter, Semi-arts Urologie, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein, thans ANIOS Urologie, VU Medisch Centrum, Amsterdam; Dr. Peter L.M. Vijverberg, Uroloog, St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein; Drs. Jan A. Kaan, Arts-microbioloog, St. Antonius Ziekenhuis, Utrecht. Correspondentieadres: dr. A.L.M. Vlek, AIOS Medische Microbiologie, UMC Utrecht, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht, e-mail: a.vlek@umcutrecht.nl.

Introductie

Prostaatacarcinoom is de meest voorkomende maligniteit bij mannen, met een incidentie van 95 per 100.000 per jaar. In Nederland wordt jaarlijks bij 8000 mannen prostaatacarcinoom gediagnosticeerd (<http://www.oncoline.nl/prostaatacarcinoom>). Het nemen van prostaatbipten wordt beschouwd als de beste manier om prostaatacarcinoom te diagnosticeren. Ook bij het vervolgen van prostaatacarcinoom vervullen prostaatbipten een prominente rol.¹ Oorspronkelijk werd transperineaal gebiopteerd, maar de transrectale biopsie onder geleide van een echosonde (transrectal ultrasound prostate biopsy, TRUS-PB) heeft deze manier van bipteren wegens technische voordelen grotendeels vervangen. Wel is de kans op introductie van darmbacteriën in het prostaatweefsel bij TRUS-PB groter dan bij de transperineale route.

De meeste urologen in de westerse wereld maken gebruik van antibiotische profylaxe voorafgaand aan TRUS-PB, zoals wordt geadviseerd in internationale richtlijnen.^{2,3} Het effect van toepassen van antibiotische profylaxe bij TRUS-PB werd voor het eerst in een gerandomiseerd onderzoek aangetoond in 1997.⁴ In dit onderzoek onder 537 patiënten werden significant minder patiënten met bacteriurie gezien in de groep die profylactisch ciprofloxacine oraal (eenmalig 500mg) had gekregen in vergelijking met de placebogroep. Deze resultaten werden bevestigd in twee latere onderzoeken waarin het gebruik van ciprofloxacineprofylaxe werd onderzocht.^{5,6}

Het gebruik van ciprofloxacine is gedurende het afgelopen decennium sterk toegenomen.⁷ Ook het aantal stammen dat resistentie vertoont tegen fluorochinolonen is gestegen en bedroeg in 2011 13% van de klinische *Escherichia coli*-stammen. Bij *E. coli*-stammen van patiënten van urologische afdelingen is de resistentie tegen ciprofloxacine zelfs gestegen van 7% in 1998 tot 25% in 2010.⁷

Mede door deze toegenomen resistentie tegen fluorochinolonen rijst de vraag of antibiotische profylaxe met een antibioticum uit deze groep bij TRUS-PB nog wel een goede keus is.

Om deze reden onderzochten wij of er een toename zichtbaar is in de incidentie van infectieuze complicaties na TRUS-PB en of de incidentie van ciprofloxacine-resistentie onder verwekkers van infectieuze complicaties na TRUS-PB stijgt. Daarnaast keken wij of er literatuur beschikbaar is die toepassing van een ander profylactisch regime of aanpassing van het huidige regime, ondersteunt.

Methoden

Een retrospectieve analyse van klinische en microbiologische gegevens werd uitgevoerd in het St. Antonius Ziekenhuis te Nieuwegein. Alle patiënten die in de periode van januari 2008 tot en met december 2011 een of meerdere malen een TRUS-PB ondergingen, werden geïncludeerd. Van al deze patiënten werd in de medische

status nagegaan of er sprake was geweest van koorts na TRUS-PB. Primair eindpunt van het onderzoek was het ontstaan van koorts binnen één week na TRUS-PB. Secundaire eindpunten waren het optreden van urineweginfecties en sepsis binnen één week. Koorts werd gedefinieerd als een gemeten lichaamstemperatuur boven de 38,5 graden. Urineweginfectie werd gedefinieerd als koorts in combinatie met een positieve urinekweek (groei van 1 soort $\geq 10^3$ /ml of groei van 2 soorten $\geq 10^4$ /ml). Sepsis werd gedefinieerd als koorts in combinatie met een positieve bloedkweek. Identificatie van gramnegatieve pathogenen uit urinekweken werd verricht door middel van een bètaglucuronidasetest; indien negatief vond identificatie plaats door middel van het VITEK-II-systeem (bioMérieux, Frankrijk), dat ook werd gebruikt voor gevoeligheidsbepalingen. Identificatie en gevoeligheidsbepaling van gramnegatieve pathogenen uit bloedkweken gebeurde tevens met het VITEK-II-systeem. Een Chi-kwadraat-test werd gebruikt om te bepalen of er een significante trend in het optreden van infectieuze complicaties aantoonbaar was. Van alle patiënten met een infectieuze complicatie na TRUS-PB werden uitslagen van verrichte bloed- en urinekweken beoordeeld om het percentage ciprofloxacine-resistentie ($MIC > 1$ ml/l) van verwekkers van deze infecties vast te stellen.

In het St. Antonius Ziekenhuis werd bij TRUS-PB gedurende de gehele onderzoeksperiode een profylactisch antibioticumregime toegepast bestaand uit drie tabletten ciprofloxacine van 500 mg, in te nemen op de avond en ochtend voor het nemen van de bipten en op de avond na de ingreep. Bij bekende contra-indicaties of eerdere ciprofloxacine-resistente micro-organismen in een urine- of bloedkweek werd een andere profylaxe gekozen (keuze door behandelend uroloog).

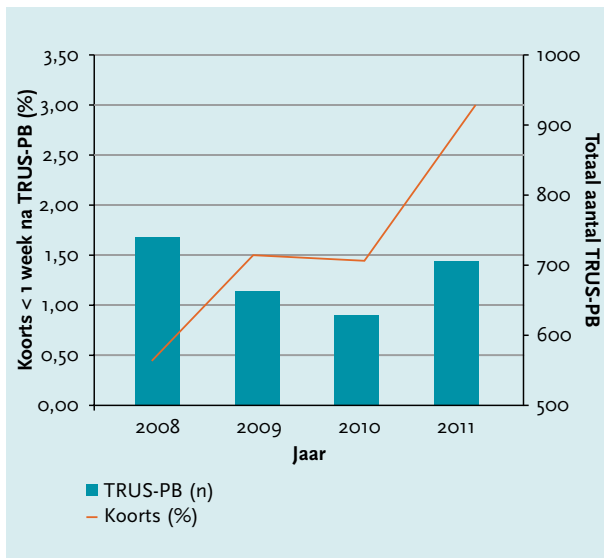
Literatuur over de toepassing van verschillende profylactische regimes bij TRUS-PB werd gezocht op Pubmed met verschillende combinaties van de zoektermen 'prostate biopsy', 'prophylaxis', 'ciprofloxacin' en 'antibiotic'.

Resultaten

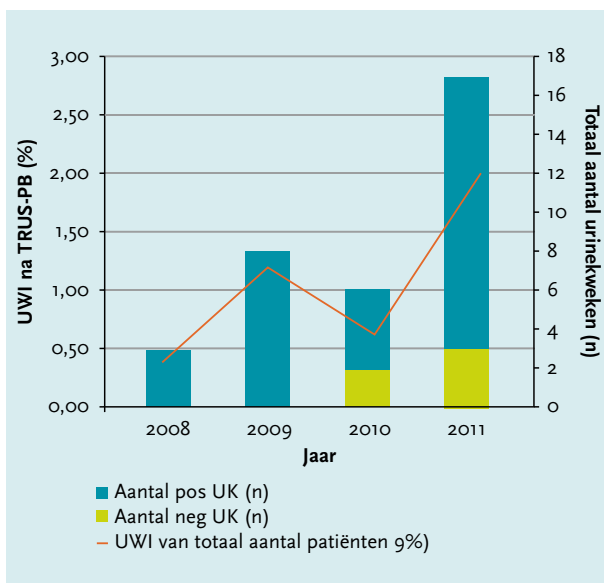
In de periode van 2008 tot en met 2011 ondergingen 2736 patiënten een TRUS-PB (figuur 1). In totaal ontwikkelden 43 patiënten koorts na TRUS-PB (tabel 1, figuur 1). De incidentie van koorts betrof 0,4% (3/738) in 2008, 1,5% (10/662) in 2009, 1,4% (9/630) in 2010 en 3,0% (21/706) in 2011 (p voor trend $< 0,01$). Van negen patiënten was bekend dat zij zich meldden bij de huisarts en niet in het ziekenhuis (2 in 2009, 3 in 2010 en 5 in 2011). Gegevens over eventueel verrichte laboratoriumonderzoeken (urine- en/of bloedkweken) ontbraken bij deze negen patiënten. Bij de overige 34 patiënten met koorts na TRUS-PB werden urinekweken verricht (tabel 1, figuur 2).

In 2008 werd bij drie patiënten bacteriurie aangetoond, in 2009 bij 8, in 2010 bij 4 en in 2011 bij 14 patiënten

Figuur 1. Incidentie van koorts < 1 week na transrectale echogeleide prostaatbiopsie (TRUS-PB).



Figuur 2. Incidentie van urineweginfecties < 1 week na transrectale echogeleide prostaatbiopsie (TRUS-PB).



UWI: urineweginfectie; UK: urinekweek

(tabel 1). Gedurende de onderzoeksperiode was bij vijf patiënten sprake van koorts met negatieve urinekweken. Het percentage TRUS-PB dat werd gecompliceerd door een urineweginfectie steeg van 0,4% in 2008 tot 2,0% in 2011 (p voor trend 0,02). Uit 28 van de 29 positieve urinekweken werd *E. coli* geïsoleerd. In één urinekweek werd *Streptococcus milleri* aangetoond.

In totaal werden bij 25 van de 43 patiënten met koorts bloedkweken afgenomen (0 in 2008, 6 in 2009, 6 in 2010 en 13 in 2011) (tabel 1, figuur 3). Het percentage sepsis

Tabel 1. Aantallen patiënten met koorts, bacteriurie en bacteriëmie na TRUS-PB per jaar.

Jaar	Aantal TRUS-PB	Aantal koorts < 1 week (%; 95% BI) ¹	Aantal positieve UK ² (%; 95% BI) ¹	Aantal positieve BK ³ (%; 95% BI) ¹
2008	738	3 (0,4; 0,1-1,2)	3 (0,4; 0,1-1,2)	0
2009	662	10 (1,5; 0,8-2,8)	8 (1,2; 0,6-2,4)	3 (0,5; 0,2-1,3)
2010	630	9 (1,4; 0,8-2,7)	4 (0,6; 0,2-1,6)	3 (0,5; 0,2-1,4)
2011	706	21 (3,0; 2,0-4,5)	14 (2,0; 1,2-3,3)	7 (1,0; 0,5-2,0)
Totaal	2736	43 (1,6; 1,2-2,1)	29 (1,1; 0,7-1,5)	13 (0,5; 0,3-0,8)

¹95% betrouwbaarheidsinterval; ²urinekweek; ³bloedkweek.

volgens op TRUS-PB steeg van 0% in 2008 tot 1,0% in 2011 (p voor trend 0,06). Uit alle positieve bloedkweken (13 in totaal) werd *E. coli* gekweekt. Bij 11 van deze 13 patiënten met een positieve bloedkweek werd hetzelfde micro-organisme uit de urinekweek gekweekt, bij twee patiënten was de urinekweek negatief.

Omdat in 2008 geen bloedkweken werden verricht en er geen gegevens over ciprofloxacinegevoeligheid beschikbaar waren van positieve urinekweken, ontbreken resistentiegegevens voor dit jaar. In 2009 was 60% (5/8) van de isolaten uit urinekweken resistent tegen ciprofloxacine. Dit percentage steeg tot 90% (13/14) in 2011 (p 0,12). Bij isolaten uit bloedkweken wordt een stijging gezien van 30% (1/3) in 2009 tot 90% (6/7) in 2011 (p 0,18) (figuur 4). In totaal werden gedurende de studieperiode 19 patiënten in het ziekenhuis opgenomen vanwege een infectie na TRUS-PB (1 in 2008, 4 in 2009, 3 in 2010 en 11 in 2011).

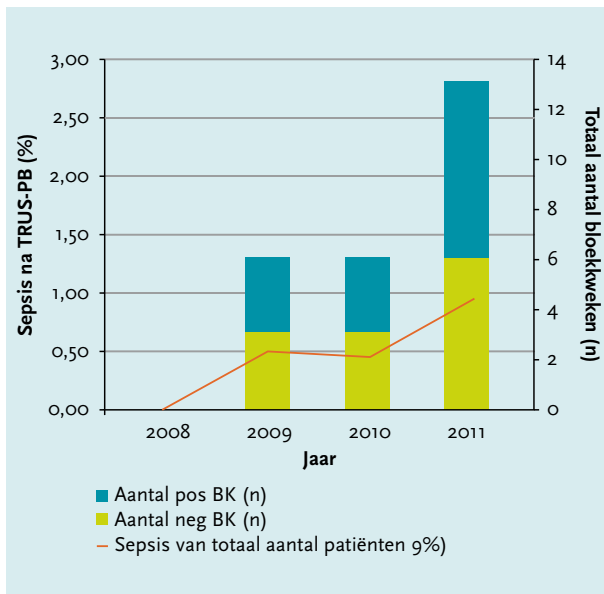
Discussie

In de periode 2008 tot en met 2011 was er een stijging in de incidentie van koorts, urineweginfecties en sepsis na TRUS-PB. Tevens werd een toename aangetoond in ciprofloxacine-resistentie onder verwekkers uit zowel urine- als bloedkweken, in lijn met de landelijke gegevens over resistentie tegen fluorchinolonen.⁷

Tekortkomingen

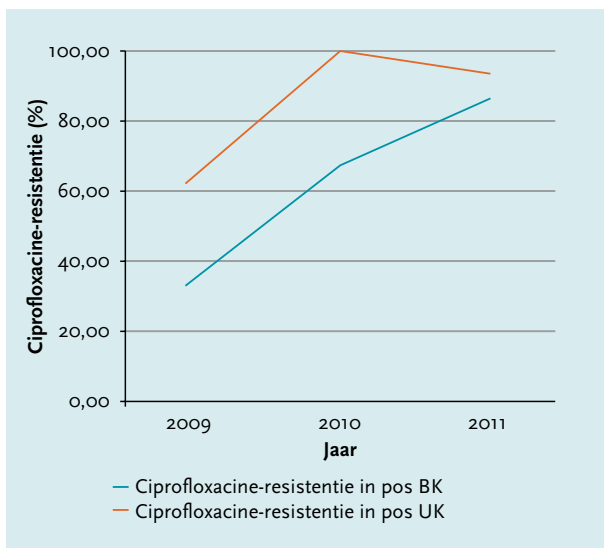
Enkele tekortkomingen van dit onderzoek dienen genoemd te worden. Door de nog altijd lage incidentie is het aantal geregistreerde infectieuze complicaties relatief laag ondanks de lange studieperiode van vier jaar. Door de retrospectieve opzet bestaat de kans op onderschatting van het werkelijke percentage patiënten met infectieuze complicaties. Het is niet uit te sluiten dat meer patiënten zich met complicaties gemeld hebben bij een huisarts of

Figuur 3. Incidentie van sepsis < 1 week na transrectale echogeleide prostaatbiopsie (TRUS-PB).



BK: bloekweek.

Figuur 4. Incidentie van ciprofloxacine-resistentie in de positieve urine- en bloekweken per jaar.



ander ziekenhuis, waardoor gegevens ontbreken. Ook zijn niet bij alle patiënten die zich meldden met koorts urine- en bloekweken afgenomen, waardoor monsters mogelijk niet geheel aselekt zijn verkregen.

Incidentie van infectieuze complicaties

De incidentie van infectieuze complicaties na TRUS-PB varieert aanzienlijk tussen verschillende onderzoeken. Recente onderzoeken rapporteren infectieuze complicaties (urine- en bloekweken, prostatitis of koorts) bij 0,5 tot 4,0%

van de patiënten.⁸⁻¹² Sepsis wordt beschreven bij minder dan 2% van de patiënten.^{11,13} Vergelijking van deze cijfers is echter moeilijk door wisselende definities voor bacteriurie en urine- en bloekwekeninfecties en uiteenlopende resistentiecijfers en profylactische regimes. De retrospectieve opzet van de meeste onderzoeken kan daarnaast leiden tot een onderschatting van het aantal infecties. In een recent Belgisch onderzoek was een toename in de incidentie van sepsis na TRUS-PB aantoonbaar, van 0,5% in 2003 tot meer dan 1,5% in 2009.¹¹ Deze stijging leek gelijk op te gaan met de stijging in het percentage ciprofloxacine-resistentie onder *E. coli*-stammen geïsoleerd uit urine- en bloekweken. Bij 236 patiënten bij wie voorafgaand aan TRUS-PB (onder ciprofloxacineprofylaxe) een rectumkweek werd afgenomen werd groei van ciprofloxacine-resistente stammen gezien bij 25%. Infectieuze complicaties werden vervolgens alleen gezien bij patiënten met ciprofloxacine-resistente stammen en niet bij patiënten met ciprofloxacinegevoelige stammen in de rectumkweek.¹¹ In een groot Canadees populatieonderzoek werd een toename gezien in het aantal ziekenhuisopnames binnen 30 dagen na TRUS-PB van 1,0 tot 4,1% over de periode 1996 tot 2005. De incidentie van infectiegerelateerde ziekenhuisopnames steeg van 0,6% in 1996 naar 3,6% in 2005.¹⁴ Deze cijfers komen overeen met een recent Amerikaans populatieonderzoek.¹⁵

Wij vonden een percentage ciprofloxacine-resistentie dat veel hoger is (92,9% bij *E. coli* uit urine- en bloekweken, 85,7% bij *E. coli* uit bloekweken) dan de recente landelijke urologische resistentiedata (25% bij *E. coli*).⁷ Dit is te verklaren doordat patiënten met een infectie na TRUS-PB ook ciprofloxacineprofylaxe hebben gehad, waardoor een selectie van resistente stammen heeft kunnen plaatsvinden.

Mogelijke profylactische regimes

Gerandomiseerd placebocontroleerd onderzoek naar het effect van antibiotische profylaxe voorafgaand aan TRUS-PB is alleen uitgevoerd met fluorochinolonen.⁴⁵ Daarnaast zijn diverse andere profylactische regimes onderzocht, vaak in vergelijking met fluorochinolonen. Het effect van ciprofloxacineprofylaxe is vergeleken met respectievelijk ceftriaxon, piperacilline/tazobactam, gentamicine, amoxicilline-clavulaanzuur en amoxicilline-clavulaanzuur plus gentamicine. Het percentage patiënten met bacteriurie na TRUS-PB was niet significant verschillend tussen ciprofloxacine en ceftriaxon en ciprofloxacine en piperacilline/tazobactam.^{16,17} Gentamicine en amoxicilline-clavulaanzuur, zowel afzonderlijk als in combinatie, waren inferieur aan ciprofloxacine in het voorkomen van bacteriëmie en infectieuze complicaties.¹⁸⁻²⁰ Alleen de combinatie van ciprofloxacine en gentamicine leidde tot een lager infectiepercentage vergeleken met ciprofloxacine alleen.²¹ In een vergelijkend onderzoek tussen ofloxacin en cotrimoxazol was het

percentage patiënten met bacteriurie niet verschillend tussen beide groepen.²²

Duur van antibiotische profylaxe

De duur van antibiotische profylaxe in verschillende onderzoeken varieert van een eenmalige gift antibiotica tot een profylactische behandeling van zeven dagen. Er blijken geen significante verschillen aantoonbaar in het optreden van sepsis, koorts, prostatitis, urineweginfecties of bacteriurie wanneer een eenmalige gift ciprofloxacine wordt vergeleken met ciprofloxacine gedurende drie dagen.^{5,23-27} Slechts in één onderzoek werd een significant lager percentage infecties gevonden bij langdurig (zeven dagen) continueren van ciprofloxacine in vergelijking met een eenmalige gift.²⁸

Conclusies en aanbevelingen

Verscheidende onderzoeken hebben aangetoond dat het aantal infectieuze complicaties na TRUS-PB afneemt bij profylactisch gebruik van ciprofloxacine. De laatste jaren neemt zowel het gebruik van ciprofloxacine als het percentage resistente gramnegatieve staven sterk toe, en de verwachting is dat dit percentage verder zal stijgen. In dit onderzoek werd een stijging in het percentage infectieuze complicaties na TRUS-PB aangetoond, voornamelijk veroorzaakt door ciprofloxacine-resistente bacteriën. Dit vraagt om een nauwkeuriger beleid bij patiënten met infecties na TRUS-PB, zowel in de eerstelijns- als tweedelijnszorg. Bij alle patiënten dient een urinekweek verricht te worden voorafgaand aan antibiotische behandeling. Aangezien de verwekkers van deze infecties van rectale oorspong zijn verdient het de voorkeur naast een urinekweek ook een rectumkweek af te nemen. Bij empirische antibioticumkeuze in afwachting van het kweekresultaat moet rekening gehouden worden met de zeer grote kans op ciprofloxacine-resistentie. Er zijn voornamelijk geen onderzoeken beschikbaar die een overstap naar het gebruik van andere profylactische antibiotica dan ciprofloxacine ondersteunen. Wel is er voldoende bewijs beschikbaar dat een eenmalige dosis van 500 mg ciprofloxacine per os even effectief is in het voorkomen van infecties als een regime van drie dagen of meer. Ter uitsluiting van kolonisatie met ciprofloxacine-resistente pathogenen wordt tevens geadviseerd voorafgaand aan toediening van profylaxe een urine- en rectumkweek af te nemen. Gezien de stijgende incidentie van infectieuze complicaties na TRUS-PB en de verwachte verdere stijging in ciprofloxacine-resistentie is meer onderzoek naar alternatieve profylactische regimes noodzakelijk.

Dankbetuiging

Prof. dr. T.A. Boon, emeritus hoogleraar Urologie UMC Utrecht, leverde aanvullingen op dit artikel.

Referenties

1. Bosch J, Prins A. Urologie. 2e herziene druk. Houten: Bohn Stafleu van Loghum; 2010. p. 161-169.
2. European Association of Urology. Guideline on Prostate Cancer 2012. p. 18.
3. American Urological Association. Best Practice Policy Statement on Urologic Surgery Antimicrobial Prophylaxis 2011. p. 19.
4. Kapoor DA, Klimberg IW, Malek GH, Wegenke JD, Cox CE, Patterson AL, et al. Single-dose oral ciprofloxacin versus placebo for prophylaxis during transrectal prostate biopsy. *Urology*. 1998;52:552-8.
5. Aron M, Rajeev TP, Gupta NP. Antibiotic prophylaxis for transrectal needle biopsy of the prostate: a randomized controlled study. *BJU Int*. 2000;85:682-5.
6. Puig J, Darnell A, Bermúdez P, Malet A, Serrate G, Baré M, et al. Transrectal ultrasound-guided prostate biopsy: is antibiotic prophylaxis necessary? *Eur Radiol*. 2006;16:939-43.
7. NethMap Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands 2012. p. 30-50.
8. Shigemura K, Matsumoto M, Tanaka K, Yamashita M, Arakawa S, Fujisawa M. Efficacy of combination use of Beta-lactamase inhibitor with penicillin and fluoroquinolones for antibiotic prophylaxis in transrectal prostate biopsy. *Korean J Urol*. 2011;52:289-92.
9. Hedelin H, Claesson BEB, Wilpart A. Febrile reactions after transrectal ultrasound-guided prostatic biopsy: a retrospective study. *Scand J Urol Nephrol*. 2011;45:393-6.
10. Zaytoon OM, Vargo EH, Rajan R, Berglund R, Gordon S, Jones JS. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* as cause of postprostate biopsy infection: implications for prophylaxis and treatment. *Urology*. 2011;77:1035-41.
11. Steensels D, Slabbaert K, Wever L de, Vermeersch P, Poppel H van, Verhaegen J. Fluoroquinolone-resistant *E. coli* in intestinal flora of patients undergoing transrectal ultrasound-guided prostate biopsy-should we reassess our practices for antibiotic prophylaxis? *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:575-81.
12. Minamida S, Satoh T, Tabata K, Kimura M, Tsumura H, Kurasaka S, et al. Prevalence of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* before and incidence of acute bacterial prostatitis after prostate biopsy. *Urology*. 2011;78:1235-9.
13. Lange D, Zappavigna C, Hamidzadeh R, Goldenberg SL, Paterson RF, Chew BH. Bacterial sepsis after prostate biopsy--a new perspective. *Urology*. 2009;74:1200-5.
14. Nam RK, Saskin R, Lee Y, Liu Y, Law C, Klotz LH, et al. Increasing hospital admission rates for urological complications after transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *J Urol*. 2010;183:963-8.
15. Loeb S, Carter HB, Berndt SI, Ricker W, Schaeffer EM. Complications after prostate biopsy: data from SEER-Medicare. *J Urol*. 2011;186:1830-4.
16. Cam K, Kaykici A, Akman Y, Erol A. Prospective assessment of the efficacy of single dose versus traditional 3-day antimicrobial prophylaxis in 12-core transrectal prostate biopsy. *Int J Urol*. 2008;15:997-1001.
17. Cormio L, Berardi B, Callea A, Fiorentino N, Sblendorio D, Zizzi V, et al. Antimicrobial prophylaxis for transrectal prostatic biopsy: a prospective study of ciprofloxacin vs piperacillin/tazobactam. *BJU Int*. 2002;90:700-2.
18. Roach MB, Figueroa TE, McBride D, George WJ, Neal DE. Ciprofloxacin versus gentamicin in prophylaxis against bacteremia in transrectal prostate needle biopsy. *Urology*. 1991;38:84-7.
19. Hori S, Sengupta A, Joannides A, Balogun-Ojuri B, Tilley R, McLoughlin J. Changing antibiotic prophylaxis for transrectal ultrasound-guided prostate biopsies: are we putting our patients at risk? *BJU Int*. 2010;106:1298-302.
20. Madden T, Doble A, Aliyu SH, Neal DE. Infective complications after transrectal ultrasound-guided prostate biopsy following a new protocol for antibiotic prophylaxis aimed at reducing hospital-acquired infections. *BJU Int*. 2011;108:1597-602.
21. Ho HSS, Ng LG, Tan YH, Yeo M, Cheng CWS. Intramuscular gentamicin improves the efficacy of ciprofloxacin as an antibiotic prophylaxis for transrectal prostate biopsy. *Ann Acad Med Singapore*. 2009;38:212-6.

22. Isen K, Küpeli B, Sinik Z, Sözen S, Bozkirli I. Antibiotic prophylaxis for transrectal biopsy of the prostate: a prospective randomized study of the prophylactic use of single dose oral fluoroquinolone versus trimethoprim-sulfamethoxazole. *Int Urol Nephrol.* 1999;31:491-5.
23. Sabbagh R, McCormack M, Péloquin F, Faucher R, Perreault JP, Perrotte P, et al. A prospective randomized trial of 1-day versus 3-day antibiotic prophylaxis for transrectal ultrasound guided prostate biopsy. *Can J Urol.* 2004;11:2216-9.
24. Shigemura K, Tanaka K, Yasuda M, Ishihara S, Muratani T, Deguchi T, et al. Efficacy of 1-day prophylaxis medication with fluoroquinolone for prostate biopsy. *World J Urol.* 2005;23:356-60.
25. Briffaux R, Coloby P, Bruyere F, Ouaki F, Pires C, Doré B, et al. One preoperative dose randomized against 3-day antibiotic prophylaxis for transrectal ultrasonography-guided prostate biopsy. *BJU Int.* 2009;103:1069-73.
26. Schaeffer AJ, Montorsi F, Scattoni V, Perroncel R, Song J, Haverstock DC, et al. Comparison of a 3-day with a 1-day regimen of an extended-release formulation of ciprofloxacin as antimicrobial prophylaxis for patients undergoing transrectal needle biopsy of the prostate. *BJU Int.* 2007;100:51-7.
27. Janoff DM, Skarecky DW, McLaren CE, Ahlering TE. Prostate needle biopsy infection after four or six dose ciprofloxacin. *Can J Urol.* 2000;7:1066-9.
28. Aus G, Ahlgren G, Bergdahl S, Hugosson J. Infection after transrectal core biopsies of the prostate--risk factors and antibiotic prophylaxis. *Br J Urol.* 1996;77:851-5.

Moleculaire detectie van *Helicobacter pylori* en de resistentie voor claritromycine

H.F. Wunderink, A. Russcher, M.J.A.W.M. van Bussel, E.C.J. Claas, K.E. Veldkamp

Samenvatting

De toename in antimicrobiële resistentie van *Helicobacter pylori* is een wereldwijd probleem. Falen van eradicationtherapie is geassocieerd met de aanwezigheid van een resistente stam. Claritromycine-resistentie is de belangrijkste oorzaak van therapiefalen en wordt veroorzaakt door drie verschillende puntmutaties in het 23S-rRNA. Voor het verkrijgen van een antibiogram is een *H. pylori*-kweek van een maag of duodenumbiopsie nodig. Hiervoor is echter invasieve diagnostiek noodzakelijk. Daarnaast vereist het kweken specifieke kweekomstandigheden. De mutaties die claritromycine-resistentie veroorzaken zijn echter te detecteren met moleculaire technieken.

Het doel van dit onderzoek was het ontwikkelen van een real-time PCR voor het aantonen van *H. pylori*-DNA in maagbiopsies om vervolgens met behulp van sequentieanalyse de gevoeligheid voor claritromycine te bepalen. De resultaten verkregen met de real-time PCR werden vergeleken met de resultaten verkregen door middel van kweek.

De real-time PCR werd gevalideerd op 98 maagbiopsies (48 paren en twee enkele maagbiopsies) van 50 patiënten die verdacht werden van een infectie met *H. pylori*. Dertien patiënten (26%) waren kweek en real-time PCR-positief, 32 patiënten (64%) waren kweek en real-time PCR-negatief, en vijf patiënten (10%) waren alleen real-time PCR-positief. Bij 17 real-time PCR-positieve monsters werd er een sequentieanalyse uitgevoerd voor de detectie van claritromycine-resistentie. Bij drie van de 17 (18%) monsters werd claritromycine-resistentie gedetecteerd. Hiervan was één monster kweeknegatief en twee waren kweekpositief. Van de twee kweekpositieve monsters kwam het antibiogram overeen met het resultaat verkregen met behulp van sequentieanalyse.

Concluderend werd een succesvolle moleculaire methode ontwikkeld om *H. pylori*-DNA en claritromycine-resistentie te detecteren in maagbiopsies van patiënten die werden verdacht van een *H. pylori*-infectie. De detectie van *H. pylori* in feces zal de volgende stap zijn in het verbeteren van de diagnostiek, waarmee een non-invasief alternatief wordt geboden voor de huidige gouden standaard, maagbiopsies via endoscopie.

Trefwoorden

Helicobacter pylori, real-time PCR, claritromycine-resistentie

Summary

Increasing antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* is a worldwide problem. Failure of eradication therapy is related to the presence of a resistant strain. Resistance to clarithromycin is the most important cause of treatment failure and can be caused by three different point mutations in the 23S rRNA. Culture of gastric biopsy is needed to obtain an antibiogram but this requires an invasive procedure and is in addition difficult due to the fastidious nature of *H. pylori*. The mutations causing clarithromycin resistance can be easily detected with molecular techniques. The aim of this study was to develop a real-time PCR to detect *H. pylori* DNA in gastric biopsies and to detect clarithromycin resistance by subsequent sequence analysis. The results obtained with real-time PCR were compared with the results obtained with culture. The real-time PCR was validated on 98 gastric biopsies (48 pairs and two single gastric biopsies) from 50 patients suspected of *H. pylori* infection. Thirteen patients (26%) were culture and real-time PCR positive, 32 patients (64%) were culture and real-time PCR negative, and five patients (10%) were positive only with real-time PCR. Seventeen real-time PCR positive samples were sequenced to detect clarithromycin resistance. In three of the 17 samples (18%) clarithromycin resistance was detected. While one sample was culture-negative, the two other samples were culture-positive. The antibiogram obtained from the culture-positive samples corresponded with the sequence result.

H.F. Wunderink, A. Russcher, M.J.A.W.M. van Brussel, E.C.J. Claas, afdeling Medische Microbiologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden, Nederland.
Correspondentieadres: K.E. Veldkamp, afdeling Medische Microbiologie, E-04-064, Leids Universitair Medisch Centrum, Albinusdreef 2, 2333 ZA Leiden, e-mail: K.E.Veldkamp@lumc.nl



In summary, a successful molecular method was developed to detect *H. pylori* DNA and clarithromycin resistance in gastric biopsies of patients suspected of *H. pylori* infection. Detection of *H. pylori* in feces would be the next improvement in diagnostics, because this would represent a non-invasive alternative for gastric biopsies, which are the current golden standard.

Inleiding

Hoewel *H. pylori* verantwoordelijk is voor de meerderheid van maag- en duodenumulcera, heeft de ontdekking van het pathoëen op zich laten wachten tot de jaren tachtig van de vorige eeuw. Robin Warren, patholoog bij het Royal Perth ziekenhuis in West Australië, stuitte op talrijke spiraalvormige *Campylobacter*-achtige bacteriën in het epitheel van een maagbiopt. De bacteriën leken zichtbare schade aan het maagepitheel te veroorzaken en Warren concludeerde dat er sprake moest zijn van een maaginfectie, ondanks het heersende dogma dat in het zure milieu van de maag geen bacteriën konden overleven. Samen met Barry Marshall onderzocht Warren vervolgens een verzameling maagbiopten. Zij kwamen tot de conclusie dat aanwezigheid van de spiraalvormige bacteriën vrijwel altijd samen ging met maagklachten dan wel maag- en/of duodenumulcera. In eerste instantie lukte het niet de bacteriën te kweken, maar toen per abuis de kweekschalen

langer werden geïncubeerd dan gebruikelijk, zagen ze wel groei op de platen. Een causaal verband was ondertussen aannemelijk gemaakt en beiden stuurden in 1983 een letter aan *The Lancet* om hun contributie aan het werk veilig te stellen.¹ In 1985 vervulde Marshall de postulaten van Koch door zichzelf te infecteren met de bacterie en in 2005 ontvingen zij de Nobelprijs voor de geneeskunde voor het aantonen van het verband tussen de bacterie en peptische ulcera.

H. pylori is een gebogen soms wat spiraalvormig, gram negatief, micro-aerofiel staafje dat oxidase-, katalase- en ureasepositief is.² Door de productie van urease en de aanwezigheid van flagellen is *H. pylori* in staat om in het zure milieu van de maag te overleven en een infectie te veroorzaken, variërend van een acute gastritis tot maagulcera en maagcarcinomen.^{3,4} Asymptotisch dragerschap komt ook voor. Besmetting met *H. pylori* vindt met name in de kinderjaren plaats en de prevalentie is vooral hoog in niet-westerse landen, waar deze kan oplopen tot meer dan 70% in de algemene bevolking. In Nederland wordt de prevalentie op basis van sero-epidemiologische studies onder volwassenen geschat tussen de 33-50%; recente cijfers over de prevalentie ontbreken echter.^{5,6} Onder Nederlandse kinderen wordt de seroprevalentie tussen de 1-11% geschat.⁷

Voor het stellen van de diagnose, is endoscopie met het afnemen van maagbiopten de gouden standaard.³ Het nadeel van endoscopie is dat het een invasieve, dure en tijdrovende procedure betreft. Het voordeel is dat eventuele pathologie in de maag direct kan worden vastgesteld en dat door afname van biopten kweek en vervolgens een gevoeligheidsbepaling mogelijk is. Nadeel van de kweek is dat *H. pylori* moeilijk in cultuur te brengen is. Groei van deze bacterie vereist specifieke kweekomstandigheden als een optimaal groeimedium, groeitemperatuur en pH, alsmede een micro-aerofiele atmosfeer. Daarnaast is de kweek tijdrovend.

Andere diagnostische mogelijkheden zijn de ureumademtest, serologie en een fecesantigeentest. De sensitiviteit en specificiteit van de ureumademtest zijn respectievelijk 88-95% en 95-100%.^{3,8} De test heeft een matige negatief-voorspellende waarde en deze neemt verder af bij voorafgaand gebruik van protonpompremmers (PPI) of antibiotica. Serologie heeft als nadeel dat alle mensen die *H. pylori* bij zich dragen IgG-positief zijn, ook bij asymptomatisch dragerschap. Daarnaast blijven alle voor *H. pylori* behandelde patiënten gedurende maanden tot zelfs jaren na eradication IgG-positief.⁸ De beste resultaten met behulp van de fecesantigeentest worden bereikt met de Amplified IDEIA Hp StAR (Femtolab, Dako, Glostrup, Denmark), een enzym immunoassay met een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 96,2% en 95,9%. Het effect van behandeling kan na enkele weken worden geëvalueerd met een sensitiviteit en specificiteit van 100% en 97,5% bij volwassenen.⁹ Bij alle drie de methoden kan *H. pylori* niet gekweekt worden, waardoor geen antibiogram verkregen wordt.

Het Nederlands beleid volgens de NHG-Standaard maagklachten (M36) bij een verdenking op *H. pylori*-infectie is een test-and-treat-beleid. Als serologie, fecesantigeentest of de ureumademtest positief zijn, wordt er gestart met de standaardbehandeling van eerste keuze: tripletherapie met een PPI plus amoxicilline en claritromycine gedurende zeven dagen. Bij aanhoudende klachten wordt gecontroleerd op effectiviteit van eradication met behulp van de ureumademtest of serologie met als voorwaarde dat de titer voor start van behandeling ook is bepaald. Als een persisterende *H. pylori*-infectie wordt aangetoond, wordt gestart met quadruple-therapie: PPI met bismutsubcitraat, tetracycline en metronidazol gedurende zeven dagen. Bij persisteren van klachten volgt verwijzing naar het ziekenhuis voor endoscopie met als doel kweek en gevoeligheidsbepaling.

Het is de vraag hoe lang deze werkwijze nog te verdedigen valt, aangezien falen van de standaard eradicationbehandeling de kans op eradication in de toekomst ernstig

verkleint. Daarnaast neemt de antimicrobiële resistentie van *H. pylori* wereldwijd toe en is bepaling van de antimicrobiële gevoeligheid voor start van de behandeling kosten besparend gebleken.^{3,4,10-20} Claritromycine-resistentie is de belangrijkste oorzaak van het falen van de standaard eradicationbehandeling. Bij aanwezige claritromycine-resistentie daalt de kans op succesvolle eradication van 80% naar 10-30%.^{3,4,15}. Bij een succesvolle eradication is de kans op een recidief bij een volwassene echter laag: minder dan 1% per jaar.⁴ Claritromycine-resistentie in *H. pylori* wordt in meer dan 99% van de gevallen veroorzaakt door een puntmutatie in het 23S rRNA. Drie bekende puntmutaties zijn A2142C, A2142G en A2143G. Deze kunnen met behulp van moleculaire technieken worden gedetecteerd.²¹⁻²⁵ De werking van claritromycine is gebaseerd op remming van de eiwitsynthese door binding aan de peptidyltransferaseregio van het 23S rRNA. De puntmutaties die zich bevinden in de 23S rRNA peptidyltransferaseregio, zorgen ervoor dat claritromycine niet meer kan binden, waardoor de eiwitsynthese niet wordt geremd.²⁶

Concluderend zou men in de meest ideale situatie de diagnose *H. pylori*-infectie willen stellen zonder invasieve diagnostiek en zonder kweek, en zou men de gevoeligheid voor claritromycine willen bepalen voor starten van eradicationtherapie. Het doel van dit onderzoek was om allereerst een real-time PCR te ontwikkelen voor het aantonen van *H. pylori*-DNA in maagbiopten en vervolgens met behulp van sequentieanalyse de gevoeligheid voor claritromycine te bepalen. De detectie van *H. pylori* in feces zal de volgende stap zijn, waarmee een non-invasief alternatief wordt geboden voor de huidige gouden standaard, maagbiopten via endoscopie.

Methode

Ontwikkeling PCR

Twee primersets, met beide als target het *UreA* gen, werden geselecteerd voor detectie van *H. pylori*-DNA. De eerste primerset was eerder gepubliceerd^{27,28} en de tweede primerset werd ontwikkeld met behulp van Beacon-Designer v7 (Premier Biosoft, Palo Alto, USA). Daarnaast werd een primerset geselecteerd om claritromycine-resistentie te bepalen.²¹ De primers werden getest op een klinisch *H. pylori*-isolaat uit het laboratorium van het LUMC. DNA werd geïsoleerd met behulp van de Qiamp mini blood kit (Qiagen Benelux B.V., Venlo, Nederland). De PCR met beide primersets werd geoptimaliseerd voor wat betreft magnesiumchlorideconcentratie, annealingstemperatuur en primer- en probeconcentraties. Als interne controle werd phocine herpesvirus (PhHV) gebruikt om de nucleïnezuurextractie en de aanwezigheid van remmende stoffen te analyseren. Real-time PCR werd uitgevoerd op een CFX-96 (BioRad Laboratories B.V., Venendaal, Nederland). Voor detectie van claritro-

Tabel 1. Primersequenties

Ontwerp	Target	Sequentie	Positie
<i>Detectie H. pylori:</i>			
(28)	UreA gen	s:5'-GGGTATTGAAGCGATGTTTCCT-3'	
		as:5'-GCTTTTTTGCCTTCGTTGATAGT-3'	
New Design	UreA gen	s: 5'-AGGAAACATCGCTTCAATACC-3'	
		as: 5'-GCTTTGATTAGTGCCCATATTATG-3'	
<i>Detectie claritromycine-resistentie:</i>			
(21)	23SrRNA	s: 5'-GGAGCTGTCTCAACCAGAGATTC-3'	2071-2093
		as: 5'-CGCATGATATCCCRRTTAGCAG-3'	2181-2201

mycine-resistentie werd de nucleotide sequentie van het PCR-product geanalyseerd.

Het specificiteitspanel bestond uit in feces voorkomende bacteriën en andere *Helicobacter*-species, onder meer *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca* en *pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *coli* en *lari*, en *Helicobacter cinaedi*, *fenellii* en *pullorum*. De PCR-reacties met DNA van bovenstaande micro-organismen bleken alle negatief.

Maagbiopten

De PCR werd gevalideerd op zowel *H. pylori*-kweekpositieve als kweeknegatieve maagbiopten van patiënten in het LUMC. De kweek werd routinematig uitgevoerd in het LUMC, waarbij maagbiopten binnen enkele uren na aankomst op het laboratorium werden ingezet op een niet selectieve Columbia-agar met 5% schapebloed en selectieve Pylori agar (bioMérieux Benelux B.V., Boxtel, Nederland). De platen werden micro-aerofiel geïncubeerd met een groeicontrôle en beoordeeld op dag 3 tot 5 en dag 7. Bij groei vond verdere determinatie plaats door middel van een Gram-preparaat en de oxidase-, katalase- en ureumtest. Voor de PCR werden de biopten overnacht gedigesteerd door proteïnase K, waarna DNA werd geïsoleerd met behulp van de Qiamp mini blood kit (Qiagen Benelux B.V., Venlo, Nederland). PCR werd uitgevoerd in 45 cycli met een annealingstemperatuur van 55° C op een CFX-96.

Sequentieanalyse

Voor de gevoeligheidsbepaling van claritromycine werd DNA geamplificeerd met behulp van de 23S rRNA primers (tabel 1). Het gevormde PCR-product werd opgezuiverd met Exo-SAP-IT (Isogen Life Science, Veldzigt, Nederland) en vervolgens werd een cyclusequentiereactie uitgevoerd op een MyCycler (BioRad Laboratories B.V., Veenendaal, Nederland). De fragmenten werden opgezuiverd met behulp van DyeEx (Qiagen Benelux B.V., Venlo,

Nederland) en geanalyseerd op een ABI3130 sequencer (AppliedBioSystems, Californië, USA). De verkregen sequenties werden handmatig geanalyseerd met behulp van FinchTV (Geospiza, Inc, Seattle, USA) en VectorNTI AlignX software (Life Technologies, Bleiswijk, Nederland).

Resultaten

Van de twee geselecteerde primersets gaf de in-house ontwikkelde primerset het beste resultaat op verdunningen van geïsoleerd *H. pylori*-DNA. Voor deze primerset werd de probe FAM-TTGCCACGCCATCCATCACATCATC-BHQ1 besteld waarna de PCR verder werd geoptimaliseerd. Real-time PCR werd uitgevoerd met Hotstar mastermix (Qiagen, Hilden, Duitsland), met 0,3 µ M primers en 0,3 µ M probe, en 2,5 mM extra MgCl₂ bij een annealingstemperatuur van 55 °C (data worden niet getoond). Verdunningen tot 0,3 CFU werden met de PCR gedetecteerd.

Vervolgens werd de PCR uitgevoerd op DNA geëxtraheerd uit 48 bioptparen en twee enkele maagbiopten van 50 patiënten. Van elke patiënt worden normaal gesproken tijdens endoscopie twee maagbiopten afgenomen; één van het corpus en één van het antrum. Van twee patiënten bleek één van de biopten te ontbreken. Het panel bestond uit 13 kweekpositieve en 37 kweeknegatieve patiënten. Met de in-house real-time PCR werden 18 patiënten positief bevonden inclusief de 13 kweekpositieve biopten (tabel 2). In alle gevallen waren beide biopten van een paar zowel kweek- als PCR-positief. Van de vijf patiënten die positief werden met PCR maar negatief bleven in de kweek, werden de klinische gegevens nagegaan. Bij vier

Tabel 2. Resultaten PCR op maagbiopten vs. kweek

Patiënten	Kweekpositief	Kweeknegatief
PCR-positief	13	5
PCR-negatief	0	32

Tabel 3. Gegevens patiënten met positieve PCR bij negatieve kweek

	Klinische gegevens /indicatie endoscopie	Bevindingen pathologie	Ct-waarde PCR <i>H. pylori</i> corpus/antrum-biopt
Patiënt 1	Misselijk, braken	micro-organismen verdacht	26,2
		voor <i>H. pylori</i>	25,1
Patiënt 2	Buikkrampen	aspecifieke	28,9
		ontsteking	28,9
Patiënt 3	Rectaal bloedverlies	aspecifieke	39,5
		ontsteking	39,1
Patiënt 4	Bovenbuikpijn,	aspecifieke	38,6
	verminderde eetlust	ontsteking	32,6
Patiënt 5	NASH-cirrose	aspecifieke	30,7
		ontsteking	28,3

van de vijf leek het te gaan om een reële infectie (tabel 3), omdat de Ct-waarden van de PCR laag waren, er een eerdere infectie met *H. pylori* was vastgesteld of omdat er histopathologische aanwijzingen waren voor een infectie met *H. pylori*. Bij één patiënt (patiënt 3, tabel 3) was een infectie met *H. pylori* minder waarschijnlijk op basis van de hoge Ct-waarde in beide biopten in combinatie met de beschikbare klinische gegevens en bevindingen bij gastroduodenoscopie.

Bij 17 van de 18 PCR-positieve patiënten lukte het de sequentie te bepalen. Bij drie van de 17 patiënten werd een mutatie, coderend voor claritromycine-resistentie, aangetoond. In twee gevallen kwam dit overeen met het resistentiepatroon gevonden in de kweek; in het derde geval betrof het een patiënt waarvan de kweek negatief was. Dit bleek een patiënt te zijn die recent was behandeld, maar bij wie niet kon worden achterhaald of er nog steeds klachten bestonden.

Discussie

Ondanks het kleine aantal patiënten ($n = 50$) in deze studie, bleek dat de sensitiviteit van de real-time PCR op maagbiopten minstens zo goed was als die van de kweek. Alle kweekpositieve biopten werden gedetecteerd en de PCR detecteerde daarnaast nog eens vijf kweeknegatieve biopten (10%). Bij nadere analyse van klinische en pathologische gegevens zouden dit reële bevindingen kunnen zijn, wat suggereert dat de PCR gevoeliger is dan de kweek. Het feit dat *H. pylori* moeilijk te kweken is en alleen gedijt onder specifieke omstandigheden maakt het daarnaast ook aannemelijk dat een PCR sensitiever is dan kweek.

In deze studie blijkt dat claritromycine-resistentie met behulp van sequentieanalyse betrouwbaar te detecteren is. Dit zou betekenen dat laboratoria niet langer afhankelijk

hoeven te zijn van de kweek om *H. pylori* te diagnosticeren en daarnaast toch informatie over claritromycinegevoeligheid te verkrijgen. Ook in laboratoria waar de kweek nog routinematig wordt uitgevoerd, kan sequentieanalyse van DNA geëxtraheerd uit een maagbiopt of DNA van een gekweekt *H. pylori*-isolaat, uitkomst bieden wanneer ondanks een positieve kweek het antibiogram niet bepaald kan worden.

Het aantonen van *H. pylori*-DNA in feces zal een volgende stap in de verbetering van de diagnostiek zijn, aangezien daarmee mogelijk de noodzaak van een invasieve endoscopie komt te vervallen. Er zijn reeds enkele studies gepubliceerd waarbij een *H. pylori*-PCR op feces werd geëvalueerd. De resultaten van deze studies wisselen. Zo rapporteerden Schabereiter-Gurtner et al. een sensitiviteit en specificiteit van 98%,³⁰ terwijl Lottspeich et al. een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 63% en 100% beschrijven.²⁹ De toekomst zal moeten uitwijzen of detectie van *H. pylori*-DNA en het bepalen van de claritromycinegevoeligheid in feces een reële mogelijkheid is.

Conclusie

In deze studie met een klein aantal patiënten ($n = 50$) blijkt de ontwikkelde real-time PCR een sensitievere methode dan de kweek voor het aantonen van *H. pylori* in maagbiopten. Daarnaast kan sequentieanalyse van het real-time PCR-product verkregen uit een maagbiopt informatie verschaffen over de claritromycinegevoeligheid. Invasieve diagnostiek in de vorm van endoscopie met het afnemen van biopten geldt nog steeds als de gouden standaard voor het diagnosticeren van een *H. pylori*-infectie. Wellicht wordt het in de toekomst mogelijk om *H. pylori* en eventuele resistentie te detecteren met behulp van een non-invasieve test.

Referenties

1. Allen P. What's the story H. pylori? *Lancet*. 2001;357(9257):694.
2. Goodwin CS, Armstrong JA. Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1990;9:11-13.
3. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/Florence Consensus Report. *Gut*. 2012;61:646-64.
4. Megraud F. *Helicobacter pylori* and antibiotic resistance. *Gut*. 2007;56:1502.
5. Bohmer CJ, Klinkenberg-Knol EC, Kuipers EJ, Niezen-de Boer MC, Schreuder H, Schuckink-Kool F, et al. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection among inhabitants and healthy employees of institutes for the intellectually disabled. *Am J Gastroenterol*. 1997;92:1000-4.
6. Schlemper RJ, van der Werf SD, Vandenbroucke JP, Biemond I, Lamers CB. Risk factors of peptic ulcer disease: different impact of *Helicobacter pylori* in Dutch and Japanese populations? *J Gastroenterol Hepatol* 1996 Sep;11(9):825-31.
7. Mourad-Baars PE, Verspaget HW, Mertens BJ, Mearin ML. Low prevalence of *Helicobacter pylori* infection in young children in the Netherlands. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19:213-6.
8. Gatta L, Ricci C, Tampieri A, Osborn J, Perna F, Bernabucci V, et al. Accuracy of breath tests using low doses of ¹³C-urea to diagnose *Helicobacter pylori* infection: a randomised controlled trial. *Gut*. 2006;55:457-62.
9. Veijola L, Myllyluoma E, Korpela R, Rautelin H. Stool antigen tests in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection before and after eradication therapy. *World J Gastroenterol*. 2005;14:11:7340-4.
10. De F, V, Giorgio F, Hassan C, Manes G, Vannella L, Panella C, et al. Worldwide H. pylori antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2010;19:409-14.
11. De F, V, Zullo A, Ierardi E, Giorgio F, Perna F, Hassan C, et al. Phenotypic and genotypic *Helicobacter pylori* clarithromycin resistance and therapeutic outcome: benefits and limits. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65:327-32.
12. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for *Helicobacter pylori*. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;1:26:343-57.
13. Glupczynski Y, Megraud F, Lopez-Brea M, Andersen LP. European multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20:820-3.
14. Graham DY, Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut*. 2010;59:1143-53.
15. Houben MH, van de Beek D, Hensen EF, de Craen AJ, Rauws EA, Tytgat GN. A systematic review of *Helicobacter pylori* eradication therapy--the impact of antimicrobial resistance on eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther*. 1999;13:1047-55.
16. Koletzko S, Richy F, Bontems P, Crone J, Kalach N, Monteiro ML, et al. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. *Gut*. 2006;55:1711-6.
17. Megraud F, Coenen S, Versporten A, Kist M, Lopez-Brea M, Hirschl AM, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. *Gut*. 2012 May 12.
18. Romano M, Marmo R, Cuomo A, De ST, Mucherino C, Iovene MR, et al. Pretreatment antimicrobial susceptibility testing is cost saving in the eradication of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2003;1:273-8.
19. Romano M, Iovene MR, Russo MI, Rocco A, Salerno R, Cozzolino D, et al. Failure of first-line eradication treatment significantly increases prevalence of antimicrobial-resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J Clin Pathol*. 2008;61:1112-5.
20. Wenzhen Y, Yumin L, Quanlin G, Kehu Y, Lei J, Donghai W, et al. Is antimicrobial susceptibility testing necessary before first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection? Meta-analysis of randomized controlled trials. *Intern Med*. 2010;49:1103-9.
21. Lascols C, Lamarque D, Costa JM, Copie-Bergman C, Le Glaunec JM, Deforges L, et al. Fast and accurate quantitative detection of *Helicobacter pylori* and identification of clarithromycin resistance mutations in H. pylori isolates from gastric biopsy specimens by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2003;41:4573-7.
22. Oleastro M, Menard A, Santos A, Lamouliatte H, Monteiro L, Barthelemy P, et al. Real-time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:397-402.
23. Rimbara E, Noguchi N, Yamaguchi T, Narui K, Kawai T, Sasatsu M. Development of a highly sensitive method for detection of clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* from human feces. *Curr Microbiol*. 2005;51:1-5.
24. Vecsei A, Innerhofer A, Binder C, Gizci H, Hammer K, Bruckdorfer A, et al. Stool polymerase chain reaction for *Helicobacter pylori* detection and clarithromycin susceptibility testing in children. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8:309-12.
25. Vecsei A, Innerhofer A, Graf U, Binder C, Gizci H, Hammer K, et al. *Helicobacter pylori* eradication rates in children upon susceptibility testing based on noninvasive stool polymerase chain reaction versus gastric tissue culture. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2011;53:65-70.
26. Taylor DE, Ge Z, Purych D, Lo T, Hiratsuka K. Cloning and sequence analysis of two copies of a 23S rRNA gene from *Helicobacter pylori* and association of clarithromycin resistance with 23S rRNA mutations. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:2621-8.
27. Linke S, Lenz J, Gemein S, Exner M, Gebel J. Detection of *Helicobacter pylori* in biofilms by real-time PCR. *Int J Hyg Environ Health*. 2010;213:176-82.
28. McDaniels AE, Wymer L, Rankin C, Haugland R. Evaluation of quantitative real time PCR for the measurement of *Helicobacter pylori* at low concentrations in drinking water. *Water Res*. 2005;39:4808-16.
29. Lottspeich C, Schwarzer A, Panthel K, Koletzko S, Russmann H. Evaluation of the novel *Helicobacter pylori* ClariRes real-time PCR assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of H. pylori in stool specimens from symptomatic children. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1718-22.
30. Schabereiter-Gurtner C, Hirschl AM, Dragosics B, Hufnagl P, Puz S, Kovach Z, et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4512-8.

COMBACTE

M.J.M. Bonten

Tijdens het ECCMID 2013 in Berlijn presenteerde een Griekse collega de epidemiologie van carbapenemase-producerende *Klebsiella pneumoniae* op de intensivere-afdeling van zijn universitair ziekenhuis, een havenstad in de provincie. Van de patiënten die minimaal drie dagen op de afdeling verbleven was 85% drager van een dergelijke bacterie en bij ruim een derde van hen was de bacterie tevens resistent voor colistine. Gemiddeld kregen deze patiënten dagelijks drie verschillende antibiotica en de endemie bestond uit twee genotypen, ten bewijze van falende hygiëne. Infecties met deze bacteriën waren sterk geassocieerd met sterfte. De volgende dag vertelde een Griekse intensivist op de Duitse televisie dat zijn ziekenhuis, in een andere stad, geen geld meer had voor de meest basale medische hulpmiddelen en dat men de familie van patiënten vroeg om handschoenen voor verpleging en artsen te kopen. Daarmee lijkt de postantibiotische regio Europa binnengedrongen en lijken de mogelijkheden voor omkering van de situatie uiterst beperkt.



Prof. dr. M.J.M. Bonten

Nieuwe antibiotica

Met onze infectiepreventie kunnen we de storm in Nederlandse ziekenhuizen nog wel een tijdje weerstaan, maar wereldwijd wordt de noodzaak van nieuwe antibiotica voor deze bacteriën steeds groter. Heel veel kandidaten hebben zich echter nog niet aangediend en de laatste fases van antibioticaontwikkeling, waarin effectiviteit en veiligheid in grote patiëntengroepen moet worden vastgesteld, duurt vaak jaren. En ook dan kan het nog misgaan, zoals recent met ceftobripole gebeurde. Hoewel het fase-III-onderzoek positieve resultaten opleverde, twijfelden de FDA en EMA aan de integriteit van de data en weigerden ze registratie.

Om ontwikkeling van nieuwe antibiotica te stimuleren en de klinische evaluatie beter en sneller te laten plaatsvinden hebben de Innovative Medicine Initiative (IMI) van de Europese Gemeenschap en de European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA) in 2012 het New Drugs 4 Bad Bugs (ND4BB)-programma gelanceerd, een privaatsamenwerking van farmaceutische industrieën en academische partners.

ND4BB

Op dit moment bestaat het ND4BB-programma uit drie onderdelen. Onderdeel drie richt zich op het identificeren van nieuwe antibiotica voor gramnegatieve bacteriën. Consortia van academische partners konden in maart 2013 een *Expression of Interest* indienen en later dit jaar zal duidelijk zijn wie het winnende consortium is. Onderdelen een en twee zijn al eerder gestart en hadden in januari 2013 hun gezamenlijke startbijeenkomst. Onderdeel twee heet *Translocation* en richt zich op nieuwe methodes om antibiotica in bacteriën te krijgen.

Correspondentieadres: prof. dr. M.J.M. Bonten, UMC Utrecht, Medische Microbiologie, HP G04.614, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht, e-mail: mbonten@umcutrecht.nl.

COMBACTE

Onderdeel een van het programma heet COMBACTE (COMBatting AntibiotiC resistance in Europe) en het UMC Utrecht is namens de 16 academische partners de penvoerder. Het doel van COMBACTE is om een kwalitatief hoogwaardig klinisch onderzoeksnetwerk in Europa op te zetten, waarin nieuwe antimicrobiële middelen snel en goed kunnen worden bestudeerd. Het netwerk bestaat uit een klinisch (CLIN-Net), microbiologisch (LAB-Net) en methodologisch deel (STAT-Net). Het eerste antibioticum dat onderzocht zal worden is een middel van GSK voor de behandeling van grampositieve infecties van de huid en longen. Voor een periode van zeven jaar heeft IMI 87 miljoen euro beschikbaar gesteld en de EFPIA-partners (vooral GSK) matchen dat bedrag met ruim 100 miljoen euro. Later dit jaar zal binnen COMBACTE ook een programma worden gestart waarin onderzoeken worden voorbereid en uitgevoerd met een antilichaam gericht tegen het alfa-toxine van *Staphylococcus aureus*. Van dit nieuwe middel zal het beschermend effect op het krijgen van postoperatieve infecties en beademingsgeassocieerde pneumonie worden bestudeerd.

COMBACTE is een fantastische mogelijkheid om het klinisch onderzoek met nieuwe antibiotica in geheel Europa op een hoger niveau te brengen. Het is met name de bedoeling om het netwerk ook in Zuid- en Oost-Europese landen operationeel te maken. Onderzoekers ter plekke zullen worden voorbereid op het verrichten van registratieonderzoeken door Julius Clinical, een academische CRO, gelieerd aan het UMC Utrecht. LAB-Net zal de ziekenhuizen voorbereiden op de noodzakelijke microbiologische ondersteuning bij dergelijk onderzoek en tevens surveillanceonderzoek van infecties en antibioticaresistentie uitvoeren. STAT-Net zal in samenwerking met de EFPIA-partners nieuwe onderwerpen van onderzoek en analysemethoden opstellen, die in de toekomstige trials kunnen worden gebruikt. Het ultieme doel is om COMBACTE in zeven jaar tijd te ontwikkelen tot een klinisch onderzoeksinstituut voor antimicrobiële middelen, zoals het EORTC dat al jaren is voor oncologisch onderzoek.



Innovative Medicines Initiative



De Innovative Medicine Initiative (IMI) van de Europese Gemeenschap en de European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA) hebben in 2012 het New Drugs 4 Bad Bugs (ND4BB)-programma gelanceerd, een privaatsamenwerking van farmaceutische industrieën en academische partners. Zie ook www.combacte.eu en www.imi.europa.eu.

Nieuw onderzoek naar diagnostiek van STEC en HUSEC: STEC-ID-net

A.M.D. Kooistra-Smid, R.F. de Boer, P.D. Croughs, I.H.M. Friesema, D.W. Notermans, B. Wolters, M. Petrigani, T.P. Zomer, C.H.F.M. Waegemaekers, A. Ott, J.W.A. Rossen, A.W. Friedrich

Trefwoorden

Escherichia coli, STEC, HUS, screeningsalgoritme

Shigatoxine-producerende *Escherichia coli*-stammen (STEC) kunnen bij de mens acute gastro-enteritis veroorzaken, waarbij als complicaties hemorragische colitis en het hemolytisch-uremisch syndroom (HUS) kunnen optreden. STEC's worden gekarakteriseerd door de aanwezigheid van ten minste één van de twee genen die coderen voor de Shiga toxinen Stx1 en Stx2. Deze genen komen ook voor in bacteriofagen. Door middel van 'gene-transfer' kunnen via deze weg *stx*-genen worden uitgewisseld tussen bacteriën, zoals *E. coli*.

De pathogeniciteit van STEC wordt gekarakteriseerd door de mate waarin bepaalde subtypen shigatoxinen (de *stx2*- en de *stx2c*-variant zijn sterk geassocieerd met ernstig beloop) en andere virulentiefactoren geproduceerd worden. Voorbeelden van virulentiefactoren zijn *escV* en *aggR/aat*. *EscV* bevindt zich op een virulentie-eiland dat codeert voor adhesie aan de darmwand en karakteristieke (A/E) laesies. *AggR/aat* zijn virulentiefactoren die zich bevinden op een plasmide dat verantwoordelijk is voor een karakteristiek adhesiepatroon aan de darmwand. STEC-serotypen die geassocieerd zijn met deze ernstige ziektebeelden worden enterohemorragische (EHEC) of HUS-geassocieerde *E. coli* (HUSEC) genoemd. STEC-stammen behorend tot serotypes O157, O26, O111, O145, O103, O91, O104 en O121 zijn het meest frequent geassocieerd met uitbraken en HUS.

Introductie

Mede naar aanleiding van de landelijke studie van Van Duinhoven *et al.*¹ is in 2007 de moleculaire diagnostiek (PCR) voor STEC in Nederland geïntroduceerd. De medisch-microbiologische laboratoria (MML's) in Nederland zijn naast de conventionele kweek gericht op serotype O157, ook moleculaire detectietechnieken (zoals PCR) gaan gebruiken om tevens non-O157-serotypes te kunnen aantonen. Bij inventarisatie in 2011 maakte een derde van de MML's gebruik van de PCR (*stx1/stx2*) voor de detectie van STEC en twee derde van de Sorbitol

MacConkey (SMAC)-agar waarmee alleen detectie van STEC O157 mogelijk is. Gekweekte isolaten worden naar het RIVM gestuurd voor verdere typering ten behoeve van landelijke surveillance.²

Infecties met STEC behoren tot de meldingsplichtige infectieziekten zoals in de Wet Publieke Gezondheid zijn beschreven.³ Na de invoering van de STEC-PCR is het aantal meldingen aan GGD'en sterk toegenomen: het aantal landelijke STEC-meldingen is verachtvoudigd in de periode 2007-2012 (881 gevallen in 2012). Het merendeel van de stijging betreft non-O157-stammen of PCR-positieve patiënten bij wie geen isolaat werd verkregen in de kweek en dus geen typering mogelijk was.^{2,4} De belangrijkste taak van de GGD is om eventuele clusters tijdig op te merken. Door snelle bronopsporing kan mogelijk een grote epidemie worden voorkomen.

De hypothese is dat veel STEC-PCR-positieve bevindingen geen tot weinig risico voor de volksgezondheid hebben omdat deze STEC mogelijk minder virulent zijn. Bron- en contactonderzoek bij een positieve STEC-PCR-melding is alleen zinvol in die gevallen waarbij de volksgezondheid

R.F. de Boer, afdeling Research & Development, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; P.D. Croughs, afdeling Medische Microbiologie, STAR-mdc, Rotterdam; I.H.M. Friesema, D.W. Notermans, M. Petrigani, C.H.F.M. Waegemaekers, Centrum Infectieziektebestrijding (Cib), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven; B. Wolters, afdeling Infectieziektenbestrijding, GGD Groningen, Groningen; T.P. Zomer, afdeling Infectieziektebestrijding, GGD Rotterdam-Rijnmond, Rotterdam, afdeling Maatschappelijke Gezondheidszorg, Erasmus MC, Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Rotterdam; A. Ott, afdeling Medische Microbiologie, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; J.W.A. Rossen, A.W. Friedrich, afdeling Medische Microbiologie, RUG, Universitair Medisch Centrum Groningen, Groningen.
Correspondentieadres: A.M.D. Kooistra-Smid, afdeling Medische Microbiologie, afdeling Research & Development, Laboratorium voor Infectieziekten, Groningen; afdeling Medische Microbiologie, RUG, Universitair Medisch Centrum Groningen, e-mail: m.kooistra@infectielab.nl.

mogelijk in het geding is. Met het STEC-ID-net onderzoek worden deze in kaart gebracht.

De variabiliteit in de diagnostische methodes door MML's en de wisselende respons op STEC-meldingen door verschillende GGD'en vragen om een optimalisatie van de STEC-diagnostiek en surveillance.⁵ De Duitse STEC-O104-uitbraak in 2011 heeft geïllustreerd dat diagnostiek die alleen is gericht op type O157 onvoldoende is, terwijl de huidige PCR's (gericht op alle STEC-serotypen) onvoldoende specifiek zijn voor klinische en openbare gezondheidszorg (OGZ). De afgelopen twee jaar is een initiatief opgestart om de STEC-diagnostiek te optimaliseren.⁶ Tijdens de NVMM Voorjaarsvergadering in 2012 werd een voorstel gepresenteerd voor een gefaseerde diagnostische benadering voor de detectie van STEC en HUSEC gebaseerd op Friedrich *et al.*^{7,8} Volgens dit algoritme zullen alle MML's zich richten op de detectie van *stx*-genen in het directe patiëntenmateriaal en/of na verrijking in een ophopingsmedium. Een regionaal MML zal vervolgens isolatie van de stam en detectie van het *stx1*- en/of *stx2*-gen verrichten. Naast een moleculaire genoserotypering zal getest worden op de aanwezigheid van virulentiegenen om een mogelijke EHEC, HUSEC of andere enteropathogene *E. coli* aan te kunnen tonen. Gespecialiseerde laboratoria met expertise op het gebied van STEC/HUSEC zullen zich richten op de fenotypering en moleculaire subtypering van het isolaat ten behoeve van risico-inschatting, epidemiologische studies en surveil-

lance. Deze stapsgewijze benadering voor de detectie van STEC en HUSEC is weergegeven in *tabel 1*.

Pilotfase

Ter voorbereiding op deze benadering werd op het Laboratorium voor Infectieziekten (LVI, Groningen) in 2012 een single-center pilotstudie verricht waarin prospectief fecesmonsters van ruim 5000 patiënten met een verdenking op infectieuze gastro-enteritis zijn verwerkt volgens een STEC-diagnostisch screeningsalgoritme. Na moleculaire detectie van *stx*-genen in het oorspronkelijke materiaal en na verrijking in een aankweekmedium (BRILA bouillon) werden aanvullende PCR-testen ingezet voor detectie van de meest voorkomende virulente serotypen en relevante virulentiegenen. Na moleculaire detectie van *stx*-genen werd een kweek ingezet op SMAC-agar (specifieke detectie STEC O157) en CHROMagar STEC (specifieke detectie STEC O157 en STEC non-O157) vanuit het oorspronkelijke materiaal én vanuit het aankweekmedium. Verdachte isolaten werden naar het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en het Universitair Medisch Centrum Groningen (UMCG) gestuurd voor verdere karakterisering met behulp van sero- en genotypering en DNA-microarray-analyse. De resultaten uit deze studie tonen het discriminerend vermogen en de snelheid van het diagnostisch algoritme aan: virulente STEC-stammen die waren gerelateerd aan uitbraken en HUS werden snel (< 48 uur) onderscheiden

Tabel 1. Markergenen ten behoeve van gefaseerde STEC-diagnostiek; gebaseerd op figuur uit Friedrich *et al.*⁷

Nr.	MML			Regionaal MML	Gespecialiseerde laboratoria			Voorlopig resultaat
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>escV</i>	O-serogroepspecifieke markers (bijvoorbeeld <i>rfb</i> 0157, 026, 0111, 0145, 0103, 091, 0104, 0121)	<i>sfpA</i>	<i>bfpA</i>	EAEC-specifiek gen (bijv. <i>aggR/aat</i>)	
1	+/-	+/-	+					EHEC-verdenking
2	+/-	+/-	-					Non-0157-STEC-verdenking
3	-	+	-					Non-0157-STEC- of EHEC 0104:H4-verdenking
4	-	-	+					EPEC-verdenking
5	+/-	+	+	+				EHEC 0157 of andere EHEC-serotype (bijv. 026, 091, 0103, 0104, 0111, 0145)
6	-	+	+	+(0157)	+	-	-	EHEC 0157:HNM
7	+/-	+	+	+(0157)	-	-	-	EHEC 0157:H7
8	+/-	+/-	+	+(anders dan 0157)	-	-	-	Klassieke non-0157 EHEC
9	-	+	-	+(104)	-	-	+	EHEC 0104:H4
10	-	-	+	-	-	-	-	Atypische EPEC (aEPEC)
11	-	-	+	-	-	+	-	Typische EPEC
12	-	-	-	-	-	-	+	EAEC
13	-	-	+	+	-	-	-	EPEC 0157
14	-	-	-	+	-	-	-	<i>E. coli</i> 0157 non-STEC

van minder virulente STEC-stammen. Hierbij werd gebruikgemaakt van de seropathotype-classificatie volgens Karmali *et al.*⁹ Karmali classificeerde STEC in vijf seropathotype (SPT) -groepen (A tot en met E), waarbij groep A een hoog en groep D en E een laag OGZ-risico vormen. Daarnaast werd de *stx*-subtypering volgens Friedrich *et al.*¹⁰ verricht waarmee subtypes *stx* 1c, 1d, *stx* 2c, 2d, 2e, en 2f met PCR werden gedetecteerd.

Het algoritme omvat ook de groei van *stx*-genen bevattende bacteriën en confirmatie van het PCR-resultaat op het oorspronkelijke materiaal. De CHROMagar-STECC maakt identificatie van STEC non-O157 goed mogelijk.¹¹

Vervolgonderzoek

De resultaten uit de pilotstudie dienen als basis voor een vervolgstudie waarin zal worden onderzocht of het mogelijk is om bij een aangetoonde STEC-besmetting met aanvullende conventionele en moleculaire testen een betere risico-inschatting te maken voor de patiënt en de openbare gezondheidszorg. Het onderzoek is begin april 2013 van start gegaan onder de naam STEC-ID-net en zal ongeveer een jaar in beslag nemen. De verwachting is dat naar schatting 25.000 patiënten zullen worden geïncludeerd.

In deze prospectieve cohortstudie wordt de expertise van het Lvl, het UMCG, het STAR-mdc (Rotterdam), het RIVM en de GGD Drenthe, GGD Groningen en GGD Rotterdam-Rijnmond gebundeld in een interregionale samenwerking. Op het Lvl en het STAR-mdc wordt het diagnostisch algoritme op fecesmonsters van patiënten met verdenking op infectieuze gastro-enteritis toegepast. Na moleculaire detectie van *stx*1, *stx*2 en/of *escV* en na verrijking in BRILA-

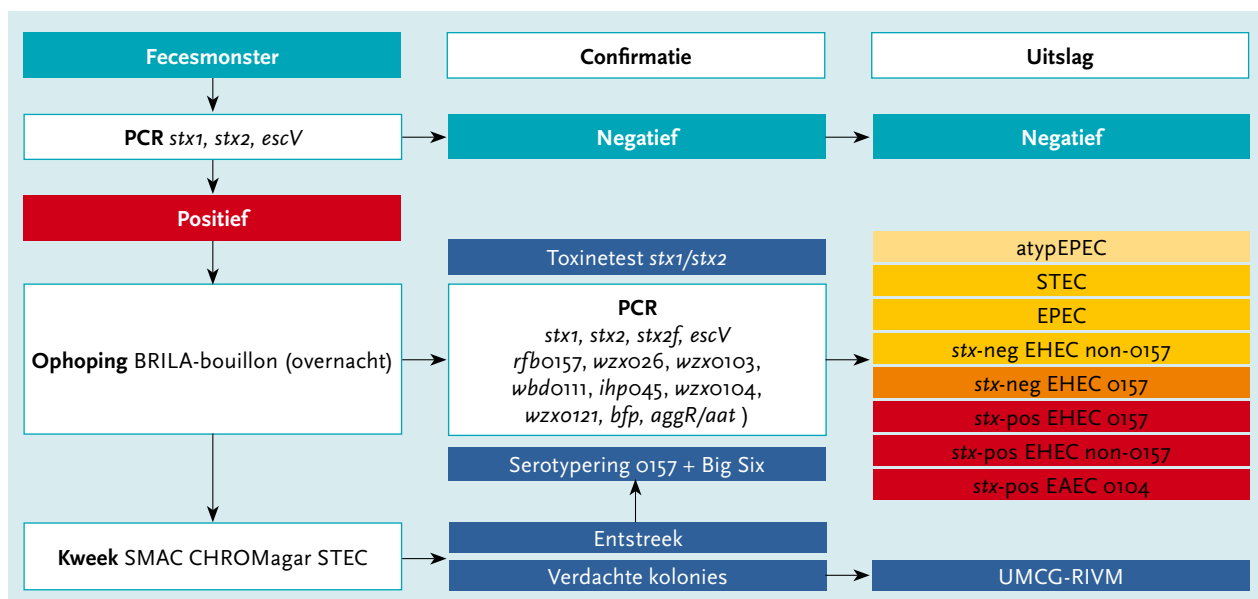
bouillon zal de moleculaire genoserotypering op serotypen rfbO157, wzxO26, wzxO103, wbdO111, ihpO145, wzxO104, wzxO121 en detectie van relevante virulentiegenen (*bfpA*, *aggR/aat*) worden verricht, gebruikmakend van de PCR (tabel 1). Ten slotte zal er bij groei op het SMAC-agar en/of CHROMagar-STECC-medium van verdachte kolonies een serotypering van *E. coli* O157 en de zogeheten Big Six serotypes worden ingezet. In het geval van *stx*-positieve monsters wordt tevens een toxinetest (immunoassay) uitgevoerd (figuur 1).

Op het UMCG vindt verificatie van het resultaat van het diagnostisch algoritme plaats van alle monsters die op het Lvl positief zijn voor *stx*1, *stx*2 en/of *escV* (circa 10% van de monsters) en 20% van de negatieve monsters. Direct na ontvangst op het UMCG zullen de monsters gedurende zes uur worden verrijkt in LB-bouillon. Na afenting op een McConkey-agar en overnachtingincubatie zal de cultuur worden getest met de PCR *stx*1, *stx*2 en *escV* (figuur 2).

Verdere moleculaire karakterisering waaronder een moleculaire subtypering van de *stx*-genen wordt verricht op alle STEC-isolaten. Met de *stx*-subtypering is het mogelijk om onafhankelijk van serotypering de virulentie van de stam vast te stellen. De Duitse STEC O104 was bijvoorbeeld tot op dat moment niet geassocieerd met uitbraken maar beschikte wel over het *stx*2-gen. Ten slotte zal worden onderzocht op welke wijze DNA-micro-arraymethoden kunnen worden ingezet voor een snelle detectie van virulentie- en resistentiegenen en O:H-serotypering en *stx*-subtypering.

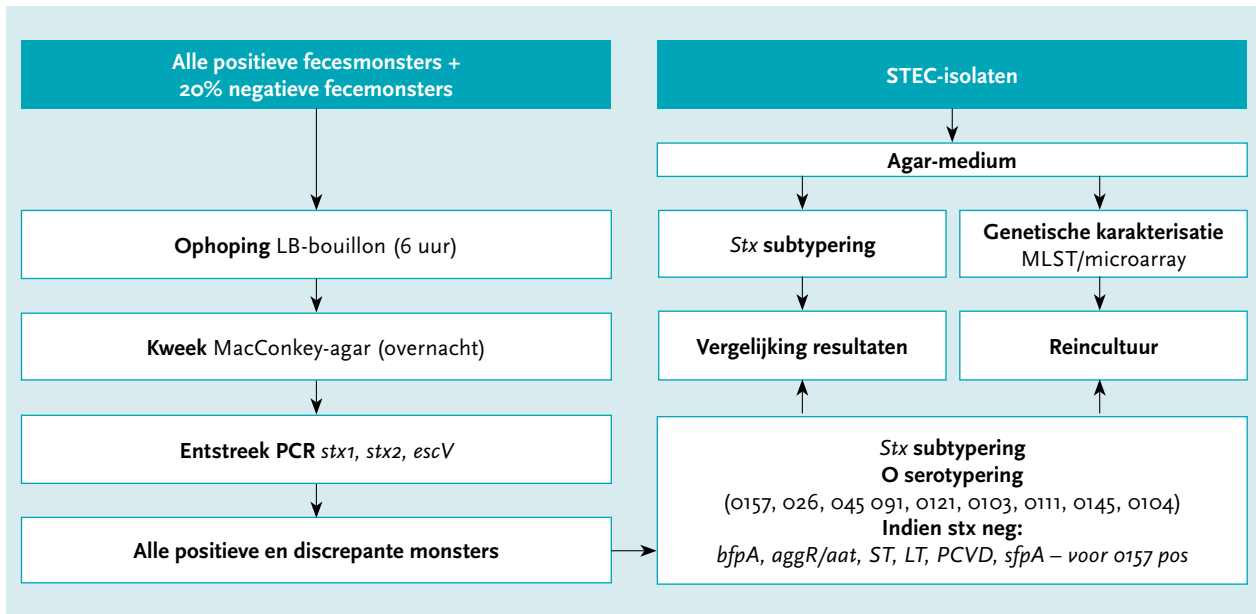
Naast het uitgebreide laboratoriumonderzoek zullen de GGD'en in de betrokken regio's vragenlijsten afnemen bij

Figuur 1. Schema diagnostisch screeningsalgoritme (Lvl en STAR-mdc)



Figuur afgeleid van Friedrich *et al.* JCM. 2004;42:4697-701.

Figuur 2. Schema verificatie diagnostisch algoritme en subtypering *stx*-genen (UMCG)



alle patiënten van wie de feces *stx*-genen bevat en bij een deel van de patiënten van wie de feces *escV* bevat (maar geen *stx*). Klinische gegevens en mogelijke risicofactoren zullen worden verzameld. Op het RIVM zal een serogentypering worden verricht op alle STEC-isolaten, zoals ook voor de landelijke surveillance gebeurt. Het studieprotocol STEC-ID-net is tijdens de NVMM Voorjaarsvergadering 2013 gepresenteerd.^{1,2}

Openbare gezondheid

Na analyse van de resultaten van de STEC-ID-net studie zullen aanbevelingen worden geformuleerd voor diagnostiek, meldingsplicht en surveillance van STEC en EHEC. Door de bundeling van expertise, het gebruiken van epidemiologische gegevens en het inzetten van zowel kweek als moleculaire laboratoriumtechnieken in deze studie, zullen de uitkomsten naar verwachting leiden tot een betere risico-inschatting en prognose van het ziekteverloop en daarnaast ondersteuning bieden bij het nemen van adequate maatregelen om het risico voor de openbare gezondheidszorg zo veel mogelijk te beperken.

Vragen en opmerkingen

Bij vragen of opmerkingen over deze studie of over STEC kunt u contact opnemen met één van de onderzoekers van de deelnemende instellingen. Informatie over deze studie kan ook verkregen worden via stec-info@rug.nl.

Naar verwachting zullen er workshops en nascholingen worden verzorgd voor verschillende doelgroepen zoals artsen-microbioloog, MMM'ers, GGD-artsen en huisartsen. Deze studie wordt gefinancierd door de deelnemende instellingen en EurSafety Health-net.

Referenties

- van Duynhoven YT, Friesema IH, Schuurman T, Roovers A, van Zwet AA, Sabbe LJ, et al. Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:437-45.
- Friesema IH, van der Zwaluw WK, Biesta-Peters EG, Kuiling S, van Pelt W. Surveillance van STEC in Nederland, 2011. *Infect Bull.* 2013;24(3):79-83.
- www.rivm.nl/Bibliotheek/Professioneel_Praktisch/Richtlijnen/Infectieziekten/LCI_richtlijnen/LCI_richtlijn_Shigatoxineproducerende_E_coli_STEC_infectie.
- de Boer RF, Ott A, Kesztyüs B, Kooistra-Smid AM. Improved detection of five major gastrointestinal pathogens by use of a molecular screening approach. *J Clin Microbiol.* 2010;48:4140-6.
- Lede IO, Kraaij-Dirkzwager MM, van den Kerkhof JHTC, Notermans DW. Namens de Werkgroep STEC meldplicht, diagnostiek en surveillance. Gebrek aan uniformiteit bij meldingen van Shigatoxineproducerende *Escherichia coli* en *Shigella* aan en door GGD-en. *Infect Bull.* 2012;23(4):116-8.
- From STEC to HUSEC – EHEC yesterday and today. Friedrich AW. *NTMM* 2012;20:S17.
- Friedrich AW, Nierhoff KV, Bielaszewska M, Mellmann A, Karch H. Phylogeny, clinical associations, and diagnostic utility of the pilin subunit gene (*sfpA*) of sorbitol-fermenting, enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol.* 2004;42:4697-701.
- Müthing J, Schweppe CH, Karch H, Friedrich AW. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thromb Haemost.* Review. 2009;101:252-64.
- Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, et al. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4930-40.
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczus T, Ammon A, et al. *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 2002;185:74-84.
- de Boer RF, A. Ott, Scheper HR, Wisselink GJ, Rossen JWA, Heck ME, et al. A diagnostic screening algorithm to assess the public health risk of STEC. Poster session presented at Scientific Spring Meeting KNVM & NVMM; 2013 Arnhem, The Netherlands.
- Kooistra-Smid AMD, de Boer RF, Rossen JWA, Ott A, Friedrich AW. STEC-ID-net. A feasibility study for a new STEC diagnostic strategy. Oral presentation at Scientific Spring Meeting KNVM & NVMM; 2013 Arnhem, The Netherlands.

Nieuwe behandelopties voor tuberculose

A. Vollaard, B. Voordouw

De mondiale ziektelast van tuberculose (TB) is groot. In 2011 waren er 8,7 miljoen TB-patiënten, van wie er 1,4 miljoen overleden. Van deze TB-patiënten heeft 13% een co-infectie met hiv. Dit beïnvloedt de diagnostiek, thoraxfoto's zijn minder uitgesproken en sputum-ZN is vaker negatief. Geneesmiddelinteracties compliceren de behandeling; multidrugresistentie (MDR-TB, resistentie tegen isoniazide en rifampicine) komt vaker voor en mortaliteit is hoger. MDR-TB is wereldwijd toenemend prevalent, ook in een aantal Oost-Europese landen.

De schatting is dat mondiaal 3,7% van de nieuwe TB-patiënten MDR-TB heeft en 20% van eerder (onvolledig) behandelde patiënten.¹ Hiervan heeft 9% een XDR-TB (tevens resistent tegen fluorochinolonen en een van de injecteerbare medicijnen). In 2011 waren in Nederland 1007 nieuwe TB-patiënten, van wie 15 met MDR-TB.

De behandelresultaten van MDR-TB liggen met < 50% veel lager dan die voor gevoelige TB (\pm 95%). Het behandelingschema voor MDR-TB is complex met combinaties van initieel injecteerbare antibiotica en meerdere orale antibiotica, die gedurende minimaal 12 tot 18 maanden moeten worden ingenomen. Desondanks zijn de uitkomsten matig en is er dus grote behoefte aan nieuwe behandelmodaliteiten.

Nieuwe ontwikkelingen

Na 40 jaar zijn er nu twee nieuwe ontwikkelingen in een nieuwe klasse, bedaquiline en delamanid. Bedaquiline is recent door de FDA geregistreerd voor de behandeling van MDR-TB. De Europese registratieautoriteiten hebben beide middelen nog in behandeling voor de indicatie MDR-TB. Bedaquiline (Sutiro) behoort tot een nieuwe klasse van diarylquinolines, die de protonpomp van mycobacterieel ATP-synthese selectief inhiberen. Menselijk mitochondriaal ATP-synthese wordt duizenden malen minder geremd. Omdat ook niet-replicerende mycobacteriën voor hun energie afhankelijk zijn van ATP-synthese, worden deze ook geremd. Bedaquiline is een CYP3A4-substraat, dus interacties met hiv-medicatie kunnen optreden. Verder heeft het invloed op de QT-tijd. Tijdens twee fase-II-studies met in totaal 440 patiënten waarin bedaquiline werd toegevoegd aan het standaardregime, was in deze groep de gemiddelde duur tot sputumconversie 85 dagen, terwijl

dit 125 dagen was in de controlegroep. Een fase-III-studie moet deze resultaten bevestigen en de relevantie van onder meer verlenging van de QT-tijd beter in kaart brengen.

Delamanid is een nitro-imidazolderivaat zoals metronidazol, en verhindert de mycolzuursynthese voor de mycobacteriële celwand. Delamanid is in twee doseringen in een fase-II-studie onderzocht bij MDR-TB, waarbij na twee maanden bij 45% sputumconversie optrad versus 30% in de controlegroep.²

Een tweede nitro-imidazolpreparaat, PA-824, wordt ook op dit moment klinisch onderzocht, maar ook bij gevoelige TB. In een recente studie bleek de combinatie PA-824-moxifloxacin-pyrazinamide sneller bactericide dan de standaardbehandeling.³

Hoewel er duidelijk verder klinisch onderzoek nodig is om werkzaamheid, veiligheid en plaats van deze middelen in de therapie van (MDR-)TB vast te stellen, vooral over de langere termijn, is het goede nieuws dat er eindelijk nieuwe perspectieven zijn voor de behandeling van tuberculose. Deze nieuwe middelen en nieuwe mogelijke combinaties, waarvan sommige weinig interacties zullen hebben met hiv-medicatie, biedt ook belangrijke nieuwe behandelopties voor MDR-TB en XDR-TB. Met nog andere middelen in de pijplijn – zoals sutezolid, een minder toxisch oxazolidinon dan linezolid – valt in de toekomst nog meer therapeutische verandering te verwachten.

Het uiteindelijke succes van behandeling hangt echter af van meer factoren, waaronder behandeluur, bijwerkingenprofiel en toegankelijkheid van therapie.

Referenties

1. WHO, Global Tuberculosis Report 2012.
2. Gler MT. Delamanid for Multidrug-Resistant Pulmonary Tuberculosis. *NEJM*. 2012;33:2151-60.
3. Diacon et al. 14-day bactericidal activity of PA-824, bedaquiline, pyrazinamide, and moxifloxacin combinations: a randomised trial. *Lancet*. 2012;9846:986-93.

A. Vollaard, klinisch beoordelaar anti-infectiva, FT4, CBG.
Correspondentieadres: B. Voordouw, klinisch senior speerpunt-beoordelaar, anti-infectiva, farmacotherapeutische groep. IV, CBG; AIOS medische microbiologie LUMC, e-mailadres: ac.voordouw@cbg-meb.nl.

'Biofilms on the move: foreign material-related infections'

Verslag 20^e NVAMM-symposium

E. de Jong, I. Lede, M. McCall, I. Overdevest, L. Reubsaet

Op 28 februari jl. vond het vierde lustrumsymposium plaats van de Nederlandse Vereniging van Arts-assistenten Medische Microbiologie (NVAMM). Het symposium werd gehouden in het Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen (KNAW)-gebouw in Amsterdam.

Als thema was gekozen voor 'kunstmateriaalgerelateerde infecties'. Deze infecties, die een significant deel van de consulten van microbiologen in beslag nemen, zijn notoir moeilijk te diagnosticeren en behandelen. Gezien het groeiende gebruik van kunstmaterialen in de geneeskunde door enerzijds technische ontwikkelingen en anderzijds vergrijzing, zal het probleem van kunstmateriaalinfecties de komende jaren alleen maar toenemen. Dit lustrumsymposium genoot de eer om een aantal (wereld-)gerenomeerde sprekers te mogen verwelkomen, niet alleen uit Nederland maar ook uit andere Europese landen.

Nucleaire beeldvorming van geïnfecteerde protheses

Als eerste sprak drs. A. Scholtens (UMC Utrecht) over '(Nuclear) imaging in prosthetic infection: not a simple task', met nadruk op de diagnostiek van chronische en sluimerende infecties. Als eerste techniek bij verdenking op geïnfecteerde kunstgewrichten noemde hij botsintigrafie, vanwege de hoge sensitiviteit en negatief-voorspellende waarde, het gebruiksgemak en de brede beschikbaarheid; grootste nadeel is de matige specificiteit, in het bijzonder bij aseptische loslating. Als alternatief biedt leukocyt(-antilichaam)scintigrafie een verbeterde specificiteit, maar kan inboeten op sensitiviteit bij leukopenie of antibioticumgebruik. Een combinatie van bovenstaande technieken wordt veelal geadviseerd, bij voorkeur als 3D-beeldvorming (SPECT/CT). De laatste jaren wordt er steeds meer gewerkt met (FDG-)PET, vanwege de kortere protocollen en hogere resolutie (in combinatie met CT). Ook van deze techniek blijft de verminderde specificiteit bij aseptische ontsteking het grootste nadeel, naast de benodigde gespecialiseerde faciliteiten voor het genereren van de radioactieve tracer. Bij

het diagnosticeren van geïnfecteerde vaatprothesen geniet PET(-CT) of leukocytsintigrafie de voorkeur, waarbij focale, heterogene of extreem hoge activiteit pathognomonisch is voor infectie (in tegenstelling tot diffuse activiteit bij non-septische ontsteking). De mogelijkheid om door middel van een voorbereidingsprotocol de achtergrondopname van FDG in het hart te reduceren, faciliteert de diagnostiek van kunstklependocarditis aanzienlijk. Er werd echter benadrukt dat grote studies naar de (meer)waarde van PET bij kunstmateriaalinfecties voorsnog ontbreken in de wetenschappelijke literatuur. Tot slot noemde



Drs. A. Scholtens (UMC Utrecht)

NVAMM Wetenschapscommissie 2013: E. de Jong, Radboud Universiteit Nijmegen, I. Lede, Academisch Medisch Centrum Amsterdam, M. McCall, Erasmus Medisch Centrum Rotterdam, I. Overdevest, St. Elisabeth Ziekenhuis Tilburg, L. Reubsaet, Universitair Medisch Centrum Utrecht. Contactpersoon: M. McCall, e-mail: m.mccall@erasmusmc.nl.

de spreker als overkoepelend voordeel van nucleaire technieken de mogelijkheid van total body-beeldvorming.

Geïmplanteerde biomaterialen

De tweede spreker was prof. dr. H. van der Mei (UMC Groningen) met haar voordracht 'The changing paradigm on the ideal biomaterial surface for biofilm control of totally internal permanent implants'. Daarin gaf zij aan dat patiënten, overwegend in de orthopedie en cardiovasculaire chirurgie, steeds meer behoefte hebben aan biomaterialen. Dit vanwege de steeds ouder wordende mens en het daarmee gepaard gaande verlies van functionaliteit.

Geïmplanteerde biomaterialen lopen het risico geïnfecteerd te raken. Biofilmformatie op deze kunstmaterialen maakt therapie lastig en niet zelden is men genoodzaakt de kunstmaterialen te verwijderen. Biofilmformatie beschermt de ingebedde micro-organismen tegen het immuunsysteem van de gastheer en antibiotica. Er zijn verscheidene strategieën ondernomen om biofilmformatie tegen te gaan: biomaterialen gecoat met antimicrobiële middelen of fysisch-chemische modificatie van de biomaterialen, bijvoorbeeld hydrofobe-, positief geladen-, of 'polymer-brush' coatings. In vitro hecht *Staphylococcus epidermidis* aan een polymer-brush coating een factor 10 minder goed, wordt biofilmformatie uitgesteld en wordt antibioticaresistentie duidelijk verminderd. Ook maken bacteriën op een polymer-brush in vitro minder mucus. Hoewel dit een stap in de goede richting is, zijn deze eigenschappen toch niet voldoende om infectie van biomaterialen te voorkomen.

Vervolgens presenteerde prof. Van der Mei resultaten van de effecten van een bifunctionele coating. Bij deze coating worden polymeren geconjugeerd met een antimicrobieel middel. In de optimale concentratie bereikt de bifunctionele coating ten opzichte van de monofunctionele coatings een significante sterfte van *Bacillus subtilis* na 20 uur groei. Naast antimicrobiële middelen kunnen ook functionele groepen worden toegevoegd om cellen de overhand te geven bij het hechten aan de biomaterialen, in plaats van bacteriën. Deze multifunctionele coatings zouden in de toekomst een plaats kunnen hebben bij vasculaire grafts, tandimplantaten en gewrichtsprothesen.

Classificatie en de behandeling van prothese-infecties

Als laatste spreker voor de middagpauze mochten wij prof. dr. W. Zimmerli (Medizinische Universitätsklinik, Liestal) verwelkomen. Aan de hand van een casus leidde hij het publiek door de klinische presentatie en classificatie en de behandeling van prothese-infecties. De klassieke classificatie maakt onderscheid tussen een vroege infectie (minder dan drie maanden na de operatie), vertraagde infectie (3 tot 24 maanden na de operatie) en een late infectie (meer dan 24 maanden na de operatie). Prof. Zimmerli stelde echter een nieuwe indeling voor: acuut hematogeen (minder dan drie weken na de operatie), vroeg postoperatief (binnen 1

maand) en chronisch (meer dan 1 maand na de operatie), omdat elke vorm is geassocieerd met een eigen spectrum van frequente verwekkers. Verder besprak hij dat kunstmateriaal slechts een lage bacteriële load nodig heeft om geïnfecteerd te raken. Men moet derhalve waakzaam zijn bij bacteriëmieën bij patiënten met een prothese. De kans op een prothese-infectie na een *S. aureus*-bacteriëmie ligt tussen de 30 en 40%. Er hoeft echter geen profylaxe te worden gegeven voor tandheelkundige ingrepen, de number-needed-to-treat is daarbij ten minste 1250. Bij het bespreken van de behandeling van prothese-infecties was er veel aandacht voor de noodzaak van gecombineerde therapie met rifampicine bij stafylokokken. Prof. Zimmerli bekende ook bij streptokokkeninfecties rifampicine toe te voegen aan de behandeling, hoewel daar (nog) geen bewijs voor is. De presentatie werd afgesloten door een quiz waaruit bleek dat het publiek met aandacht had toegehoord.

Diagnostiek van gewrichtsprothese-infecties

Na de lunch was de vloer aan dr. A. Trampuz (Charité-Universitätsmedizin, Berlin), die zich in zijn presentatie met name op de diagnostiek van gewrichtsprothese-infecties richtte. Het aantal geplaatste gewrichtsprothesen neemt sterk toe met het vergrijzen van de samenleving. In Nederland werden in 2008 ruim 200 heupprothesen per 100.000 inwoners en bijna 120 knieprothesen per 100.000 inwoners geplaatst. Met een infectierisico van 1 tot 3% geeft dit een forse ziektelast. Om deze infecties op adequate wijze vast te stellen is samenwerking tussen de verschillende specialisten cruciaal. Verschillende methoden om tot een diagnose te komen werden besproken, waaronder microbiologische, klinisch-chemische, pathologische en klinische criteria. In het kader van microbiologische diagnostiek werd het sonicatieprincipe behandeld, dat een toename geeft van infecties.



Dr. A. Trampuz (Charite-Universitätsmedizin, Berlin)



Prof. dr. E. Bouza (Universidad Complutense, Madrid)

Diagnostiek en behandeling van (intravasculaire) kathetergerelateerde infecties

Vervolgens presenteerde prof. dr. E. Bouza (Universidad Complutense, Madrid) een overzicht van het onderzoek dat zijn groep heeft verricht naar de diagnostiek en behandeling van (intravasculaire) kathetergerelateerde infecties (CRI's) en zijn daarop gebaseerde onderbouwing van richtlijnen en advies. Dat prof. Bouza en medewerkers op dit gebied een aardige staat van dienst hebben opgebouwd, bleek maar weer eens bij de vier slides van zijn presentatie, waarop het antwoord stond van maar liefst 12 klinisch-relevante vraagstellingen! Zo stelde hij dat de diagnose CRI niet op louter klinische gronden kan worden gesteld: een ontstoken insteekopening maakt de diagnose zeer waarschijnlijk, maar een rustige insteek sluit het zeker niet uit. Verder dienen alleen kathetertips van patiënten klinisch verdacht van een CRI voor kweek te worden ingezonden, om foutpositieve uitslagen en de daarmee gepaard gaande onrust te vermijden – temeer daar de klinische relevantie van een gekoloniseerde katheter bij een patiënt zonder bacteriëmie ter discussie staat en het melden van zulke uitslagen aan de kliniek leidt tot misbruik van antibiotica. Indien in de koelkast bewaard, kan bij het later positief worden van één of meer bloedkweken, de kathetertip alsnog worden gekweekt worden zonder noemenswaardig verlies aan opbrengst. Het afnemen van surveillancekweken van de insteekopening, hoewel arbeidsintensief, helpt daarentegen wel voorspellen welke patiënten at-risk zijn voor een CRI. In combinatie met differential time-to-positivity van bloedkweken en differentiële kwantificatiekweken kan hiermee zelfs de diagnose kolonisatie worden gesteld zonder dat de katheter zelf verwijderd is; dit algoritme gaat overigens niet op voor candida-infecties. Over de microbiologische technieken toonde zijn team onder meer aan dat een snelle acridine-oranje en grampreparaat van de kathetertip bij

binnenkomst op het laboratorium een zeer hoge negatief-voorspellende waarde heeft voor zowel kolonisatie als CRI. Verder blijft de plaat-rol-techniek de beste om kathetertips te kweken en dienen van complexe devices zoals Port-A-Caths niet alleen de tip, maar ook andere onderdelen (zoals het reservoir) te worden gekweekt. Ten slotte adviseerde hij bij empirische behandeling van CRI's breed antibioticisch te starten, inclusief gramnegatieve dekking en meldde hij dat de boeken nog niet gesloten zijn over het gebruik van antibiotica als 'lock'.

Kunstklependocarditis

Als afsluitende spreker gaf prof. dr. J. van der Meer (AMC) klinische les over kunstklependocarditis. Hij begon met de ontwikkeling te beschrijven van de kunstmatige hartkleppen door Starr en Edwards. Niet lang na de eerste succesvolle implantatie deed de entiteit kunstklependocarditis haar intrede. Hoewel het een serieuze infectie is, treedt deze infrequent op. De incidentie per patiëntjaar is 0,3 tot 1%. Het hoogste risico is gedurende de eerste 12 maanden, maar blijft aanwezig zolang de kunstklep *in situ* is. Ook is besproken dat wanneer kunstklependocarditis optreedt, er geen verschil is in mortaliteit vergeleken met natieve klependocarditis. De meest voorkomende verwekkers zijn stafylokokken (*S. aureus*, coagulase-negatieve stafylokokken). De Dukecriteria zijn specifiek om endocarditis aan te tonen, maar niet sensitief en derhalve geen vervanging voor een klinisch oordeel. Een continue bacteriëmie kan in tot 10% van de gevallen afwezig zijn. Er is geen verschil in behandeling van kunstklependocarditis en natieve klependocarditis, behoudens endocarditis veroorzaakt door stafylokokken. Stafylokokkenendocarditis wordt behandeld met drievoudige therapie. De drievoudige therapie is gebaseerd op *in vitro*-, dierproef- en sporadische humane data.

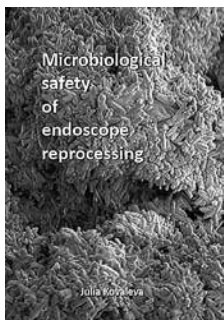
Mede waarschijnlijk door het gekozen onderwerp en de gelauwerde sprekers op het programma, was de opkomst op dit vierde lustrumsymposium bijzonder hoog, met een recordaantal van zo'n 160 inschrijvingen. Naast microbiologen (i.o.) waren er ook internist-infectiologen afgekomen op dit klinische thema.

De dag werd door de deelnemers als bijzonder leerzaam en leuk beoordeeld, waarbij vooral de internationale sprekers werden genoemd. Volgend jaar zal de wetenschapscommissie proberen om een net zo'n leerzaam programma neer te zetten. Het thema daarvoor is nog niet gekozen. Suggesties zijn welkom bij de wetenschapscommissie (voor het e-mailadres, zie kader). Ook de locatie voor volgend jaar staat nog open. Het zal in ieder geval niet het KNAW-gebouw zijn, aangezien dat dan wegens verbouwing gesloten is.

De wetenschapscommissie hoopt u volgend jaar (nogmaals) welkom te heten.

Microbiological safety in endoscope reprocessing

J. Kovaleva



Op 27 maart 2013 promoveerde Julia Kovaleva op het proefschrift getiteld 'Microbiological safety in endoscope reprocessing', in het Academiegebouw van de Rijksuniversiteit Groningen. Zij heeft haar promotieonderzoek uitgevoerd onder begeleiding van prof. dr. J.E. Degener, afdeling Medische Microbiologie en

Infectiepreventie RUG/UMCG en prof. dr. H.C. van der Mei, afdeling Biomaterialen RUG/UMCG. Hierna volgt een samenvatting van haar proefschrift.

Als een endoscoop niet goed schoongemaakt wordt, bestaat de kans dat micro-organismen worden overgedragen van patiënt op patiënt en dat infecties optreden. Besmetting en infectie kunnen samenhangen met het niet effectief kunnen verwijderen van bacteriën in een biofilm in de endoscoop. Het doel van dit proefschrift was het presenteren van endoscopiegerelateerde infecties en kruisbesmettingen en de rol van biofilmvorming in het ontstaan van deze infecties. Verder werd bestudeerd hoe flexibele endoscopen beter kunnen worden gedesinfecteerd en werd het belang van microbiologische monitoring bij hergebruik van flexibele endoscopen beschreven.

De micro-organismen, verantwoordelijk voor de infectieoverdracht tijdens endoscopische procedures, zijn gramnegatieve bacteriën (*Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* en *Salmonella* species), mycobacteriën en gisten. Tijdens de diagnostiek en gedurende de behandeling kunnen deze micro-organismen via endoscopen en accessoires van patiënt naar patiënt worden overgebracht. In dit proefschrift wordt een uitbraak bestudeerd van een multiresistente *P. aeruginosa* die een sepsis veroorzaakte bij drie patiënten nadat zij een endoscopische retrograde cholangiopancreatografie (ERCP) hadden ondergaan. Uit epidemiologisch onderzoek van de uitbraak aangevuld met moleculaire typering bleek dat één van de meerdere in gebruik zijnde sigmoïdoscopen de bron van infectie was met deze *P. aeruginosa*. Hoewel het microbiologische monitoringssysteem de infecties in de drie patiënten niet kon voorkomen, is dit protocol met routinekweken van flexibele endoscopen behulpzaam gebleken bij het

opsporen van de bron van de besmetting en waarschijnlijk belangrijk geweest in het voorkomen van verdere kruisbesmetting bij andere patiënten, waardoor de uitbraak beperkt bleef.

Endoscoopgerelateerde nosocomiale kruisbesmettingen en infecties worden veroorzaakt door het niet effectief kunnen verwijderen van micro-organismen, veelal in een biofilm, in een endoscoop. Een in vitro-model werd ontwikkeld om biofilmvorming in endoscoopkanalen na te bootsen en vervolgens de effecten van desinfectie- en droogprocedures die worden toegepast in het endoscopiecentrum van het Universitair Medisch Centrum Groningen, te bestuderen. De effecten van perazijnzuur en het drogen met verwarmde lucht werden onderzocht op biofilmvorming door micro-organismen geïsoleerd uit besmette flexibele endoscopen. Het betroffen invasieve stammen van *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* en *Methylobacterium extorquens*. De resultaten lieten zien dat perazijnzuur effectief is, direct na behandeling, tegen bacteriën en gisten in planktonische fase en in biofilmgroei. Indien de daaropvolgende droogprocedure echter werd overgeslagen, werd alsnog biofilm gevormd. De conclusie luidde dat desinfectie met uitsluitend perazijnzuur geen biofilmvorming kan voorkomen. Desinfectie gevolgd door een droogprocedure voorkwam wel (meetbare) biofilmvorming in endoscoopkanalen tijdens de periode waarin het instrument niet werd gebruikt.

Indien interne kanalen van een endoscoop beschadigd zijn, kan op die plaatsen toch een biofilm ontstaan. Dit kan leiden tot het falen van desinfectie en tot het ontstaan van besmetting en infecties bij patiënten die worden behandeld met deze gecontamineerde flexibele endoscopen. Microbiologische monitoring van flexibele endoscopen die worden hergebruikt, is van belang om deze besmettingen op te sporen en infecties te voorkomen of te beperken bij patiënten die een endoscopische procedure hebben ondergaan.

J. Kovaleva, arts-microbioloog in opleiding, afdeling Medische Microbiologie, UMC Groningen, Postbus 30.001, 9700 RB Groningen, e-mail: j.kovaleva@umcg.nl.

PROMOTIES

17 januari 2013

J.M.A. van den Brand

Experimental SARS and influenza: similar disease, different pathways

Promotores: prof. dr. T. Kuiken, prof. dr. A.D.M.E. Osterhaus
Copromotor: dr. B.L. Haagmans
Erasmus MC Rotterdam, afdeling Viroscience

8 februari 2013

R.D. de Vries

Novel insights into measles pathogenesis and immune suppression

Promotores: prof. dr. A.D.M.E. Osterhaus
Copromotores: dr. R.L. de Swart, dr. W.P. Duprex
Erasmus MC Rotterdam, afdeling Viroscience

11 februari 2013

L. Krishnappa

Proteolysis of extracytoplasmic proteins in *Bacillus subtilis*

Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Copromotor: dr. A. Dreisbach
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

27 februari 2013

V.F. Andisi

Cations and oxidative stress response in *Streptococcus pneumoniae*

Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Copromotor: dr. J.J.E. Bijlsma
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

28 februari 2013

M.L. Grijsen

Treatment of Primary HIV Infection

Promotor: prof. dr. J.M. Prins
Copromotor: dr. F.W.N.M. Wit
Universiteit van Amsterdam (UvA), afdeling Interne Geneeskunde

1 maart 2013

M. van Gent

Molecular studies into the causes of the resurgence of *Bordetella pertussis* in the face of vaccination

Promotores: prof. dr. F.R. Mooi, prof. dr. P.W.M. Hermans
UMCN Nijmegen, afdeling Medische Microbiologie,
RIVM, Centrum Infectieziektebestrijding

12 maart 2013

S.F.L. van Lelyveld

New insights into complications and treatment of HIV-1 infection

Promotor: prof. dr. A.I.M. Hoepelman
Copromotores: dr. A.M.J. Wensing en dr. N.A. Tesselar
UMC Utrecht, Divisie Interne Geneeskunde en Dermatologie, afdeling Immunologie

13 maart 2013

M. Shafique

Development of a mucosal vaccine against respiratory syncytial virus infection

Promotor: prof. dr. J.C. Wilschut
Copromotor: dr. A. de Haan
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

14 maart 2013

S.M. de Boer

Rift Valley fever virus Glycoproteins, Key to Entry and Control

Promotor: prof. dr. R.J.M. Moormann
Copromotores: dr. ir. B.J. Bosch en dr. J. Kortekaas
Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Department Infectieziekten en Immunologie, afdeling Virologie

15 maart 2013

L.M. Kampschreur

Chronic Q fever in the Netherlands

Promotor: prof. dr. A.I.M. Hoepelman
Copromotoren: dr. J.J. Oosterheert, dr. P.C. Wever
UMC Utrecht, Divisie Interne Geneeskunde en Dermatologie, afdeling Immunologie

21 maart 2013

A.T. Urbanus

Hepatitis C virus infection: spread and impact in the Netherlands

Promotor: prof. dr. R.A. Coutinho
Copromotor: prof. dr. M. Prins
Universiteit van Amsterdam, afdeling Inwendige Geneeskunde, RIVM, Centrum Infectieziektebestrijding

22 maart 2013

E.J.M. Stoop

Mycobacterial factors involved in granuloma formation
Promotores: prof. dr. W. Bitter, prof. dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls
Copromotor: dr. A.M. van der Sar
VUmc Amsterdam, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten

25 maart 2013

M.T. Khan

Novel physiological and metabolic insights into the beneficial gut microbe *Faecalibacterium prausnitzii*
Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Copromotor: dr. H.J.M. Harmsen
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

27 maart 2013

V. Hira

Challenges in the prevention of coagulase-negative staphylococcal sepsis in neonates
Promotores: prof. dr. R. de Groot, prof. dr. P.W.M. Hermans
Copromotores: dr. R.F. Kornelisse
UMCN Nijmegen, afdeling Kindergeneeskunde

27 maart 2013

J.S. Kovaleva

Microbiological safety in endoscope reprocessing
Promotores: prof. dr. J.E. Degener en prof. dr. H.C. van der Mei
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

28 maart 2013

G.G.C. van Rijckevorsel

Surveillance studies on infectious diseases: evidence for action
Promotor: prof. dr. R.A. Coutinho
Copromotores: dr. J.A.R. van den Hoek en dr. G.J.B. Sonder
Universiteit van Amsterdam (UvA), afdeling Inwendige Geneeskunde
RIVM, Centrum Infectieziektebestrijding

4 april 2013

M. Heiligenberg

Epidemiological studies of STI in heterosexuals and MSM
Promotores: prof. dr. R.A. Coutinho en prof. dr. J.M. Prins
Copromotor: dr. M.F. Schim van der Loeff
Universiteit van Amsterdam (UvA), afdeling Inwendige Geneeskunde
RIVM, Centrum Infectieziektebestrijding

17 april 2013

T.A. Westra

Health-Economic modelling of human papillomavirus
Promotores: prof. dr. M.J. Postma, prof. dr. J.C. Wilschut, prof. dr. C.A.H.H. Daemen, prof. dr. H.W. Nijman
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

24 april 2013

M. van der Kooi-Pol

In vivo and in vitro profiling of global interactions between *Staphylococcus aureus* and its human host
Promotor: prof. dr. J.M. van Dijk
Copromotor: dr. G. Buist
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

24 april 2013

J.M.W. Donker

Modern outcomes in vascular surgery, various clinical studies
Promotores: prof. dr. H.J.M. Verhagen, prof. dr. J.A.J.W. Kluytmans
Copromotor: dr. L. van der Laan
Erasmus MC Rotterdam, afdeling Heelkunde, VUmc Amsterdam, afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie

25 april 2013

C.D.J. den Heijer

Prevalence and resistance of the commensal flora in non-hospitalized patients
Promotores: prof. dr. C.A. Bruggeman, prof. dr. F.G. Schellevis
Copromotores: dr. E.E. Stobberingh, dr. W.J. Paget
UMCM Maastricht, afdeling Medische Microbiologie

7 mei 2013

M.F. Engel

Improving appropriateness of antibiotic prescribing for lower respiratory tract infections The physician's decision
Promotor: prof. dr. A.I.M. Hoepelman
Copromotor: dr. J.J. Oosterheert
UMC Utrecht, Divisie Interne Geneeskunde en Dermatologie, afdeling Immunologie

15 mei 2013

J.M. da Silva Voorham

Immature dengue virus: functional properties and potential contribution to disease
Promotores: prof. dr. J.M. Smit, prof. dr. J.C. Wilschut
UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

AFSCHEIDSREDE

24 mei 2013

S.M.E. Vrouwenraets

Non-infectious comorbidities in HIV-infected patients

Promotor: prof. dr. P. Reiss

Copromotor: dr. F.W.N.M. Wit

Universiteit van Amsterdam (UvA), afdeling Inwendige Geneeskunde

29 mei 2013

N. van Burgel

Host-pathogen interactions in Lyme disease and their application in diagnostics

Promotor: prof. dr. A.C.M. Kroes

Copromotor: dr. A.P. van Dam

LUMC Leiden, afdeling Medische Microbiologie

31 mei 2013

H.H.F. Remmelts

Immunomodulation in community-acquired pneumonia

Promotores: prof. dr. ir. D.H. Biesma, prof. dr. G.T. Rijkers

Copromotores: prof. dr. J.J. Oosterheert, prof. dr. W.J.W. Bos

St Antonius ziekenhuis, Interne Geneeskunde,

Nieuwegein, University College of Roosevelt, Middelburg

5 juni 2013

C.F.M. van der Donk

Prevalence and spread of antibiotic resistant micro organisms in a cross-border region

Promotor: prof. dr. C.A. Bruggeman

Copromotor: dr. E.E. Stobberingh

Universiteit Maastricht, afdeling Medische Microbiologie

10 juni 2013

I.H. Ploemen

Development and demise of Plasmodium liver stage parasites; the hunt for a genetically attenuated malaria vaccine

Promotor: prof. dr. R.W. Sauerwein

Copromotor: dr. C. Jansen

UMCN Nijmegen, afdeling Medische Microbiologie

19 juni 2013

M.H. Liu

Improvement of influenza vaccines by using the saponin-derived adjuvant GPI-0100

Promotores: prof. dr. A.L.W. Huckriede, prof. dr. J.C. Wilschut

UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

7 juni 2013

Prof. dr. J.E. Degener en prof. dr. J.C. Wilschut

Ter gelegenheid van hun afscheid houden prof. dr.

J.E. Degener als hoogleraar Medische Microbiologie

en prof. dr. J.C. Wilschut als hoogleraar Moleculaire

Virologie hun afscheidscollege getiteld: 'One health, Two Farewells'

UMCG Groningen, afdeling Medische Microbiologie

AGENDA

24 augustus 2013

27th International Congress of Pediatrics 2013 (ICP)
Melbourne, Australia
www.ipa-world.org/IPAcongress

10-13 september 2013

53rd ICAAC 2013
Denver, Colorado
<http://www.asm.org/index.php/asm-events/icaac2013>

11-14 september 2013

5th European Congress of Virology
Lyon
www.eurovirology2013.eu

22-25 september 2013

ESCMID-SHEA training Course in Hospital Epidemiology
Brussel

23 september 2013

Werkgroep Algemene Medische Microbiologie
Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur
Informatie: Saskia Nijssen, squaskia@gmail.com,
Rolf Vreede, Vreede@rdgg.nl

2-4 oktober 2013

8th European Meeting on Molecular Diagnostics
Kurhaus, Scheveningen
www.molecularmeeting.com

8 oktober 2013

Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie (NWKV)
VUMC, Amsterdam
Informatie: Annelies Riezebos-Brilman (secretaris),
tel. 050-3616161, <http://www.nvmm.nl/nwkv>

11-14 oktober 2013

6th Trends in Medical Mycology
Kopenhagen
<http://www.TIMM2013.org>

19-22 november 2013

8th World Congress on Pediatric Infectious Diseases
Kaapstad, Zuid-Afrika
<http://w3.kenes-group.com/mailshot/congress/wspid2013/ms3.htm?ref3=db1>

20 november 2013

Nationaal Preventie Debat – Infectieziekten 2013 Let's talk about protection & prevention!
Kasteel de Vanenburg, Putten
<http://www.preventiedebat.nl>
Informatie: BlomBerg Instituut, tel. 073-684 25 25, e-mail: devries@blomberginstituut.nl

2014

20-24 januari 2014

Cursus Infectiepreventie voor AIOS Medische Microbiologie en artsen-microbioloog
Landgoed de Rosep, Oisterwijk
Informatie: e-mail: marjoleinkluytmans@gmail.com

21 januari 2014

Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie (NWKV)
Reineir de Graaf Gasthuis, Delft
Informatie: Annelies Riezebos-Brilman (secretaris),
tel. 050-3616161, <http://www.nvmm.nl/nwkv>

2-5 april 2014

16th ICID
Kaapstad, Zuid-Afrika
<http://www.isid.org/icid/>

10-13 mei 2014

24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)
Barcelona
<http://www.congrex.ch/eccmid2014/>

17-20 mei 2014

ASM 2014, 114th General Meeting
Boston, Massachusetts
<http://gm.asm.org/>

6-9 september 2014

54th ICAAC 2014
Washington, DC, USA
[www.http://www.asm.org/index.php/asm-events/icaac2013](http://www.asm.org/index.php/asm-events/icaac2013)

29 oktober - 1 november 2014

16th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies
Praag
<http://w3.kenes-group.com/mailshot/congress/esid2014/ms2.html?ref2=db1>

RICHTLIJNEN VOOR AUTEURS

Het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* is het officiële orgaan van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie. Het doel van het tijdschrift is de lezers te informeren over ontwikkelingen betreffende het vakgebied.

In het tijdschrift worden zowel fundamentele als klinische aspecten van de medische microbiologie belicht. Daarnaast biedt het plaats aan aankondigingen van promoties e.d., evenementen en aan mededelingen uit de vereniging.

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

Door het inzenden van kopij verklaart de auteur:

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

Het manuscript is als volgt ingedeeld:

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

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

Oorspronkelijk onderzoeks- en overzichtsartikel

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

Casuïstiek

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

Van de voorzitter

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

Ingezonden

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

Samenvatting proefschrift

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

Literatuur

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

Voorbeeld:

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

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

Medicamenten of farmaca

Medicamenten of farmaca worden alleen met generische naam vermeld.

Nomenclatuur

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

Illustraties

Geïllustreerde manuscripten vergroten de leesbaarheid. Foto's, tabellen en/of figuren dienen digitaal in de vorm van een .jpg-, .jpeg-, .tif- of .bmp-bestand van een hoge resolutie te worden aangeleverd. Figuren dienen vakkundig te zijn vervaardigd. De afbeeldingen moeten zo veel mogelijk contrasterend zijn. Lever bij de figuren en foto's gaarne de onderschriften aan het eind van het document. Op foto's van microscopische preparaten moet een lijnstuk met schaalverdeling zijn aangebracht waaruit de vergrotingsfactor kan worden afgelezen. Pijlen, letters en dergelijke moeten helder (in zwart of wit) tegen de achtergrond afsteken.

Inzenden manuscript

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

Redactiesecretariaat

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