

Visie

Bloedtransfusiegeneskunde: opnieuw een rol voor artsen-microbioloog?

J.H. Marcelis

Ingezonden

Artikelen

Virale hepatitis, een spectrum van verwekkers

A.C.M. Kroes

Hepatitis A; een 'Public Health'-probleem?

J.A.R. van den Hoek S.M. Bruisten

Hepatitis E: nieuwe ontwikkelingen

H.L. Zaaijer

Biologie van hechting van bacteriën aan biomaterialen

A. FLeer

Visie

(Kleine) dilemma's in de geneeskunde

A.I.M. Hoepelman

Artikelen

Melding infectieziekten door artsen-microbioloog

J.H.T.C. van den Kerkhof, J.K. van Wijngaarden, W.L.M. Ruijs

Moleculaire diagnostiek: (on)begrensde mogelijkheden...

M.C.A. Blans, F. Bosma, B. Maraha, I.J.B. Spijkerman, K. Waar, M. van Westreenen, K.C. Wolthers

Oratie

Moleculaire microbiologie in het Rijk van de Rode Koningin

F.R. Mooi

Rubrieken

Werkgoepen en verenigingen

Personalia

Promoties

Agenda

3

Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie

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

NVMM-secretariaat

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

Redactie

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

Eindredactie

Mw. I.R. van Tol
Van Zuiden Communications B.V.
Postbus 2122, 2400 CC Alphen a/d Rijn
Telefoon (0172) 47 61 91, fax (0172) 47 18 82
E-mail ivantol@zuidencomm.nl

Redactie-adviesraad

Dr. J.R.J. Bänffer/Prof. dr. C.P.A. van Boven/Dr. P.J. van den Broek/Prof. dr. R.A. Coutinho/Mw. Dr. M.S.M. Daniëls-Bosman/Prof. dr. J. Dankert/
Dr. J.E. Degener/Mw. Dr. W.C. van Dijk/Mw. Prof. dr. J.A.A. Hoogkamp-Korstanje/Dr. A.J. van Houte/
Prof. dr. D.M. MacLaren/Prof. dr. J. van der Noordaa/
Dr. A.M. Polderman/Dr. G.J.H.M. Ruijs/Prof. dr. W.J.M. Spaan/Dr. M.J.W. Sprenger/Mw. Dr. C.M.J.E. Vandenbroucke-Grauls/Prof. dr. J. Verhoef

Oplage

800 exemplaren, 4 x per jaar

Abonnementen

f 75,- per jaar voor niet-leden van de NVMM,
Europa f 90,- per jaar, losse nummers f 22,50.
Opgave abonnementen: telefoon (0172) 47 61 91

Advertentie-exploitatie



Van Zuiden Communications B.V.
Telefoon (0172) 47 61 91

Auteursrecht en aansprakelijkheid

Van Zuiden Communications B.V., 2001
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. Uitgever en auteurs verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en auteurs op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en auteurs aanvaarden dan ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt met nadruk aangeraden deze informatie niet geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun professionele kennis en ervaring en de te gebruiken informatie te controleren.

Algemene voorwaarden

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

ISSN 0929-0176

Visie

Bloedtransfusiegeneeskunde: opnieuw een rol voor artsen-microbioloog? 58

Dr. J.H. Marcelis

Ingezonden

59

Artikelen

Virale hepatitis, een spectrum van verwekkers 60

A.C.M. Kroes

Hepatitis A; een 'Public Health'-probleem? 63

J.A.R. van den Hoek S.M. Bruisten

Hepatitis E: nieuwe ontwikkelingen 68

H.L. Zaaijer

Biologie van hechting van bacteriën aan biomaterialen 70

A. Fleer

Visie

(Kleine) dilemma's in de geneeskunde 76

A.I.M. Hoepelman

Artikelen

Melding infectieziekten door artsen-microbioloog 78

J.H.T.C. van den Kerkhof, J.K. van Wijngaarden, W.L.M. Ruijs

Moleculaire diagnostiek: (on)begrensde mogelijkheden... 82

M.C.A. Blans, F. Bosma, B. Maraha, I.J.B. Spijkerman, K. Waar, M. van Westreenen, K.C. Wolthers

Oratie

Moleculaire microbiologie in het Rijk van de Rode Koningin 86

F.R. Mooi

Rubrieken

Werkgroepen en verenigingen 92

Personalia 93

Promoties 93

Agenda 95

Bloedtransfusiegeneskunde: opnieuw een rol voor artsen-microbioloog?

In het meinumnummer van dit tijdschrift verscheen een artikel over de veiligheid van bloedtransfusies¹. De kans dat een bloedproduct in ons land nog leidt tot een bloeioverdraagbare aandoening (BOA) met name van virussen is uitzonderlijk klein. Volgens de risicoschaal van Paling is de kans om in de VS te overlijden aan een moordaanslag 1 op 10⁴ en om HIV te krijgen door een transfusie van één unit bloed ca. 1 op 7 maal 10⁵.² In Europa is die kans zelfs kleiner dan 1 op 2 maal 10⁶, wat onder andere te verklaren is uit het feit dat de EU alleen onbetaalde donoren kent. Van alle maatregelen levert deze nog altijd de grootste veiligheidswinst op.⁴

Vooral de laatste jaren lijkt de veiligheid van bloed steeds meer een politiek item te worden, getuige de reacties op bijvoorbeeld de ziekte "New Variant Creutzfeldt-Jakob". Er is nog steeds geen enkel bewijs voor overdracht van het agens via bloed bij de mens. Toch sluiten de VS binnenkort alle donoren uit die meer dan een half jaar in Engeland of vijf jaar in Europa verbleven. Ook is overhaast totale leukodepletie geïmplementeerd in vele landen, waaronder Nederland (kosten 20 miljoen gulden), terwijl er bij ons nog een onderzoek gaande is over het nut ervan (TACTICS). De toenemende betrokkenheid van de overheid met de bloedtransfusie is overigens niet alleen het gevolg van de angst voor BOA's maar past tevens in het streven naar Good Manufacturing Practice. De voedings- en farmaceutische industrieën gingen de bloedbanken hierin reeds voor.

De discussie over de "window-fase" heeft geleid tot de implementatie van HCV-NAT (sinds 1999) en HIV-NAT (sinds eind 2000) uit pools van 48 donaties met behoud van de serologische tests uit elke afzonderlijke donatie. In de afgelopen twee jaar heeft HCV-NAT echter geen enkele risicodonatie extra voorkomen. De jaarlijkse kosten voor HCV-NAT (exclusief afschrijving en implementatie) bedraagt ca. 7 miljoen gulden. Bovendien leidde de invoering ervan tot een vertraging van de vrijgifte van kort houdbare producten, zodat bij spoedgevallen de arts een bewustzijnsverklaring moet tekenen om alvast te kunnen transfunderen. Voor HIV zullen we waarschijnlijk over twee jaar tot dezelfde conclusies komen.

Betrekkelijk weinig aandacht besteedde Van Rhenen aan bacteriële contaminatie van bloedproducten. In Frankrijk⁵ zijn gedurende de jaren 1994 tot 1996, 43 gevallen van bacteriële sepsis na een bloedtransfusie gedocumenteerd (in de helft van de gevallen na een toediening van een trombocytenconcentraat) waarvan 13 met dodelijke afloop. Amerikaanse onderzoekers schatten de kans op een bacteriële sepsis na toedienen van trombocyten ca. 1 op 5.000.⁶ In Nederland blijkt ca. 0,5 procent van de trombocytenconcentraten gecontamineerd met veelal huidflora van de donor. Op dit moment wordt door Sanquin het kweken van alle trombocyten ingevoerd. Door een quarantaineperiode van 48 uur in acht te nemen zal transfusie van de meeste pathogene bacteriën kunnen worden voorkomen.⁷

De jaaromzet van Sanquin voor kort houdbare bloedproducten bedroeg in 2000 193 miljoen gulden. Mede door alle extra ingevoerde testen zijn sedert 1998 in de regio Midden-Brabant de kosten voor bloedproducten meer dan verdubbeld. Omdat in de ziekenhuizen de kans op morbiditeit en mortaliteit in de transfusieketen veel decaden hoger is dan in de bloedbank, zouden aandacht en financiële middelen nu bijvoorkeur dáár moeten worden ingezet. De hoofdinspecteur heeft hier inmiddels een eerste aanzet toe gegeven evenals de stichting TRIP (Transfusie Reacties in Patiënten), onlangs mede door de NVMM opgericht, die bijwerkingen van transfusies in de ziekenhuizen in kaart wil brengen.

Sinds enkele jaren bestaat in Nederland het (deel)specialisme transfusiegeneskundige, voorlopig alleen bereikbaar via een opleiding tot internist. Juist de laatste jaren blijkt er een toenemende behoefte te bestaan aan kennis van infectieziekten in dit vakgebied. In de nabije toekomst zullen wij hierin een grotere rol moeten gaan vervullen.

Dr. J.H. Marcelis, arts-microbioloog, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, St. Elisabeth Ziekenhuis, Postbus 747, 5000 AS Tilburg, tevens medisch manager Sanquin Bloedbank de Meierij (Eindhoven)

Literatuur

1. Van Rhenen DJ. Microbiële veiligheid van bloedtransfusie: technische mogelijkheden en maatschappelijke keuzes. Ned Tijdschr Med Microbiol 2001;9:36-7.
2. Lee DH, Paling JE, Blajchman MA. A new tool for communication transfusion risk information. Transfusion 1998;38:184-8.
3. Müller-Breitkreutz. Results of viral markers screening of unpaid blood donations and probability of window period donations in 1997. Vox Sang 2000;78:149-57.
4. Aubuchon JP, Birkmeyer JD, et al. Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies. Ann Intern Med 1997;127:904-9.
5. Noel L, Debeir J. The French haemovigilance system. Vox Sang 1998;74(suppl 2):441-5.
6. Szama K. Bacteria in blood for transfusion, a review. Arch Pathol Lab Med 1994;118:350-65.
7. Hing-Wing Liu, Kwok-Yung Yuen, et al. Reduction of platelet transfusion associated sepsis by short-term bacterial culture. Vox Sang 1999;77:1-5.

Oude en nieuwe technologie: ook een zaak voor niet-artsen?

In het eerste nummer van het Tijdschrift voor Medische Microbiologie van 2001 geeft de voorzitter van de Nederlandse Vereniging Medische Microbiologie zijn persoonlijke visie op de diagnostiek in de microbiologische laboratoria. Dankzij de beschikbaarheid van moleculaire technieken is het thans inderdaad mogelijk om de microbiologische diagnostiek ten behoeve van de patiëntenzorg beter en sneller te verrichten. Dit is met name te danken aan de expertise en de inzet van moleculair biologen, die hierdoor, ondanks het vaak ontbreken van een medische achtergrond, een belangrijke plaats hebben verworven in de routinediagnostiek van menig microbiologisch laboratorium.

Naar verwachting zal het gebruik van moleculair-biologische technieken op medisch-microbiologische laboratoria in de nabije toekomst nog meer toenemen. Het is dan ook vrijwel onmogelijk om zonder moleculair microbiologen de kwaliteit van een medisch-microbiologisch laboratorium te waarborgen en de daar uitgevoerde moleculaire testen te interpreteren. Omdat het opleiden en aansturen van analisten een essentieel onderdeel hiervan is, dienen moleculair microbiologen derhalve ook betrokken te zijn bij het management van het laboratorium en dus deel uit te maken van de staf.

Kortom, zij werken naast en samen met de arts-microbioloog op het gebied van diagnostiek, therapiebewaking en epidemiologie. Hen alleen maar taken toedelen als 'ontwikkelaars' van moleculaire diagnostiek is een ontkenning van hun bekwaamheden en van hun centrale functie in elk bij-de-tijds medisch-microbiologisch laboratorium. Het standpunt zoals verwoord in het vermelde editorial doet hen ons inzien in ernstige mate tekort. Moleculair biologen dienen vooral te worden gezien als teamgenoten in het verantwoord aansturen van elk medisch-microbiologisch laboratorium, zowel nu als in de toekomst. Dat zij een 'spilfunctie' moeten bekleden bij de opleiding van iedere arts-microbioloog is, zoals in het editorial ook staat, terecht. Er wordt echter ook gesteld dat artsen-microbioloog vaak moeite hebben met het zich eigen maken van nucleïnezuurtechnologie en dat daardoor de kans bestaat om de controle over de diagnostische microbiologie te verliezen.

Zoals artsen-microbioloog zich kunnen en moeten bekwaamen in de moleculaire microbiologie, zo ook kunnen moleculair microbiologen de benodigde medische kennis verwerven om een goede samenwerking te realiseren. Zij zouden dan ook moeten worden erkend (registratie!) als medisch (moleculair) microbioloog. Als dit in goede samenwerking en in overleg gebeurt met de arts-microbioloog, heeft het vakgebied van de medische microbiologie, maar vooral ook de patiënt, hier alleen maar voordeel bij.

Prof. dr. C.A. Bruggeman, hoogleraar Medische Microbiologie, Voorzitter Beroepsbelangencommissie niet-registerleden van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, Academisch Ziekenhuis Maastricht, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 5800, 6202 AZ Maastricht

Virale hepatitis, een spectrum van verwekkers

A. C. M. KROES

Virale hepatitis wordt op grond van de acute klinische presentatie als een eenheid beschouwd, echter bij nadere beschouwing wordt het ziektebeeld veroorzaakt door een reeks onderling zeer verschillende verwekkers. Dit heeft consequenties voor alle relevante aspecten van het beleid bij deze infecties. Naast de klassieke 'hepatitisvirussen' A tot en met E kunnen ook andere virussen soms ernstige hepatitisbeelden veroorzaken. Er wordt tevens verder gezocht naar aanvullende verwekkers van virale hepatitis doch enige recent gekarakteriseerde potentiële hepatitisvirussen bleken geen consistente associatie met klinische beelden te vertonen.

Trefwoorden: hepatitis, overzichtsartikel, virushepatitis

De geschiedenis van virale hepatitis is een succesverhaal in de medische microbiologie. Het gaat immers om een frequent voorkomend klassiek ziektebeeld, waarachter een betrekkelijk eenvormige klinische presentatie een spectrum aan verwekkers bleek schuil te gaan. Pas toen door een nauwgezette analyse de verschillende virale oorzaken werden ontrafeld, kon grote vooruitgang worden geboekt op het front van preventie en therapie van deze aandoeningen.

Dit is niet snel verlopen: de stand van zaken die in dit themanummer wordt beschreven is pas in de afgelopen dertig jaar bekend geworden. Moleculair-biologische technieken waren nodig om de laatste ontbrekende verwekker te karakteriseren, en het is aannemelijk dat het verhaal nog niet voltooid is op dit punt. Toch kan worden vastgesteld dat de proportie van nu nog niet etiologisch te verklaren vormen van hepatitis, verdacht van een virale oorzaak, erg gering is ten opzichte van de nu wel te herkennen oorzaken.

Het is van belang na te gaan hoe dit succes tot stand is gekomen en wat daaruit voor de toekomstige ontwikkelingen te leren is. In de bijdragen in dit tijdschrift over de verschillende nu stevig gevestigde vormen van virale hepatitis, hepatitis A tot en met E, wordt steeds de ontdekking van de betreffende verwekker toegelicht. Daarbij valt ook een aantal kenmerken van virale hepatitis in het algemeen op.

Ten eerste is het bij alle vormen van virale hepatitis steeds erg moeilijk geweest op de virale verwekker zelf vat te krijgen. Deze virussen waren geen van alle met klassieke methoden kweekbaar en ook eenvoudige diermodellen waren in de beginfase van het onderzoek niet beschikbaar. In de historie van het virale hepatitis-onderzoek hebben humane besmettingen daarom vaak als experiment gefungeerd, meestal als gevolg van incidenten maar zelfs wel eens opzettelijk uitgevoerd. De baanbrekende ontdekkingen van Saul Krugman, die op scherpe wijze hepatitis A en B differentieerde, kwamen voort uit experimentele infecties van bewoners van de Willowbrooke State School for the Mentally Handicapped, hetgeen later tot veel discussie leidde.¹ Ook belangrijk werk aan het latere hepatitis-E-virus is voortgekomen uit experimentele menselijke infectie, zij het in dat geval bij vrijwilligers.² Het medisch handelen in de vorm van het toedienen van bloed en bloedproducten heeft een enorme verspreiding van

hepatitis-C-virus veroorzaakt: materiaal van deze transmissies heeft veel bijgedragen aan het uiteindelijk opsporen van de verwekker. Omdat de verwekker zelf bij de vormen van virale hepatitis zo moeizaam beschikbaar was voor onderzoek, heeft in de historie ook het zorgvuldig bestuderen van de epidemiologie gefungeerd als een eerste poging tot differentiatie. Zo werden eerst onderscheiden *hepatitis infectiosa*, als een in de onmiddellijke omgeving besmettelijke vorm, later hepatitis A genoemd, en *serumhepatitis*, een via serumtherapie over te dragen vorm, later vooral hepatitis B gebleken.

Ten tweede is de sterke overlap van de klinische beelden opvallend. Dat wil niet zeggen dat de klinische beelden volledig met elkaar overeenkomen, maar dat het in sommige gevallen moeilijk kan zijn die van elkaar te onderscheiden. Gemeenschappelijk kenmerk is de ontstekingsreactie in het leverparenchym die leidt tot een specifiek ziektebeeld. Blijkbaar zijn veel virussen in staat om een dergelijke ontstekingsreactie op sterk overeenkomstige wijze te initiëren. Het is van belang dat dit geldt voor méér virussen dan de klassieke verwekkers van virale hepatitis, die nu met de letters A tot en met E worden aangeduid. Dit zal hierna nog verder worden besproken.

Ten derde, tegenover het hiervoor genoemde aspect kan men ook een tegenovergesteld kenmerk vaststellen: naast het globaal overeenkomstige klinische beeld van de acute infectie is ook juist de verscheidenheid van de virale hepatitisvormen opvallend.³ Op vele wezenlijke punten verschilt het klinisch beloop vaak zeer sterk, zoals:

- de manier waarop het virus de lever bereikt: na orale inname, via darm en vena portae (hepatitis A en E), door introductie in de bloedbaan (hepatitis B, C, D), via slijmvliezen of van moeder naar kind (hepatitis B);
- de neiging tot het chronisch worden van de infectie, niet bij hepatitis A en E, wel en in toenemende frequentie bij de vormen hepatitis B, D en C;
- het voorkomen van een fulminant beloop: zeer zelden bij hepatitis C, zeldzaam bij hepatitis E, vaker bij hepatitis A en het meest frequent bij hepatitis B en D;
- de mogelijkheid om de infectie met vaccinatie te voorkomen, nu beschikbaar voor hepatitis A en B (en dus D), maar niet voor hepatitis C en E.

Deze verscheidenheid op de meest essentiële punten die het klinisch beleid bepalen maakt dat een ieder die zich met infectieziekten bezighoudt niet kan volstaan met een globale kennis van virale hepatitis, doch het spectrum van de verwekkers goed moet kennen om enig beleid te kunnen voeren in diagnostiek, therapie en preventie.

Virale hepatitis door andere verwekkers dan hepatitis-A-, -B-, -C-, -D- en -E-virus

Een groot aantal bekende virussen anders dan hepatitis-A-tot en met -E-virus kan aanleiding geven tot een hepatitisbeeld. Soms is dat een onderdeel van een breder klinisch beeld en daardoor relatief vaak minder opvallend (gele koorts, virale hemorrhagische koorts); soms betreft het een complicatie die slechts in een klein deel van de infecties optreedt, zoals bij parvovirus^{4,5}, waar zelfs fulminante hepatitis aan wordt toegeschreven.^{6,7} Vaak is echter de hepatitis wel minder heftig dan het geval kan zijn bij de 'echte' virale hepatitisverwekkers. Daarbij dient te worden bedacht dat bij deze verwekkers ook een sterk wisselend klinisch beeld voorkomt: asymptomatische of zeer beperkt symptomatische beelden komen veelvuldig voor, naast fulminant verloopende infecties. Als regel is een icterisch verloopende virale hepatitis veel vaker het gevolg van een van de typische hepatitisvirussen A tot en met E dan van infectie met een ander virus. Echter, ook bij acute hepatitis C is dit beeld zeldzaam. Bij een zogenaamde 'biochemische hepatitis' is dit verschil minder duidelijk en moeten meer virale oorzaken worden overwogen. Vooral de primaire infecties met Epstein-Barr-virus en cytomegalovirus kunnen zich op deze wijze presenteren. Dit treedt met name op bij de oudere patiënten, die minder vaak een mononucleosis-beeld vertonen bij deze infecties. In de virologische differentiële diagnose van een acute hepatitis hoort ook infectie door EBV en CMV voor te komen.⁸

Virale hepatitis door nieuwe of nog onbekende virussen

Dit is een intrigerende zaak, omdat vooral na het succes van het karakteriseren van hepatitis-C-virus, de verwachtingen hooggespannen waren ten aanzien van de spoedige identificatie van nog meer hepatitisvirussen. De betekenis van hepatitis-C-virus bleek echter zeer groot en met de gevoeliger versies van de screeningstesten bleek al snel dat er niet zo heel veel meer over was aan onverklaarde gevallen van hepatitis, al of niet na transfusie. Casuïstische beschrijvingen van onverklaarde "non-A tot en met -E"-hepatitis zijn er wel, doch een indruk over de epidemiologische betekenis van deze situatie is minder spectaculair. Uit grotere onderzoeken blijkt dat de 'restgroep' bij zorgvuldige analyse feitelijk slechts marginaal van omvang is, zoals in een Amerikaans onderzoek 3 procent.⁹ Onderscheid met andere oorzaken van hepatitis, toxisch en auto-immuun, is overigens soms lastig, en in het geval van hepatitis op toxische basis kan ook clustering voorkomen. Intensief onderzoek naar mogelijke nieuwe verwekkers van dus zeldzamere vormen van virushepatitis heeft recentelijk echter wel resultaten opgeleverd. Er zijn twee humane virussen beschreven die aanvankelijk beide als belangrijke kandidaten werden gezien om als verwekker van virushepatitis te gelden: hepatitis-G-virus en TT-virus. In beide gevallen bleek de situatie echter bepaald niet zo simpel en is de pathogene betekenis van de virussen nog steeds niet duidelijk vastgesteld. Bijzonder leerzaam is echter de overeenkomst tussen deze twee scenario's: beide virussen blijken zeer

wijdverbreid voor te komen en zijn eigenlijk alleen aan het licht gekomen door breed opgezet moleculair spoorwerk. Hun aanwezigheid bij ziektebeelden bewees echter nog niet hun rol bij het ontstaan van die ziektebeelden. Het lijkt een illustratie van het idee dat de humane virussen die tot nu toe bekend zijn geworden hun ontdekking vooral te danken hadden aan het veroorzaken van ziekte. Mogelijk vinden nog wel meer infecties plaats door virussen die hun aanwezigheid niet verraden door het induceren van ziekte of afwijkingen. Iets meer details over beide virussen volgen nu.

Hepatitis-G-virus wordt ook wel aangeduid als *GB-virus-C*, een gevolg van de onafhankelijke ontdekking van het virus door twee groepen.¹⁰⁻¹² Het betreft een flavivirus, verwant aan hepatitis-C-virus maar op genoomniveau vrij sterk verschillend. De gebruikte materiaalbronnen kwamen voort uit een poging om een nieuwe hepatitisverwekker te vinden maar verdere analyse heeft geen betrouwbare associaties opgeleverd.^{13,14} Het is niet uitgesloten dat er incidenteel een samenhang bestaat tussen verder onverklaarde hepatitis en een infectie met dit virus, maar dit is moeilijk te bewijzen bij een virus dat bij enkele procenten van de gezonde bevolking wordt aangetroffen en dat ook niet specifiek in de lever replicateert. Naast dragerschap worden ook, in tientallen procenten van de bevolking, antistoffen aangetroffen tegen het virus. Interessant is dat de aanwezigheid van antistoffen juist niet wijst op viraal dragerschap: blijkbaar persisteert het virus niet bij het ontwikkelen van immuniteit, precies tegengesteld aan de situatie bij hepatitis-C-virus. Ook de antistofprevalentie lijkt geen associatie te vertonen met ziektebeelden. Op grond van deze bevindingen is de belangstelling voor hepatitis-G-virus inmiddels sterk afgenomen. Toch blijft de mogelijkheid bestaan dat het virus in specifieke omstandigheden een causale rol speelt in het ontstaan van ziekteprocessen, misschien zelfs andere dan het veroorzaken van hepatitis.

TT-virus heeft zoals beschreven in sommige opzichten bijna een zelfde weg gevolgd als hepatitis-G-virus. Het virus, genoemd naar de initialen van een eerste patiënt waar het werd aangetroffen, kon ook worden aangeduid als 'transfusie-transmitted' want er bestond direct al gereede verdenking dat transfusie de wijze van overdracht was.¹⁵ Het betreft een enkelstrengs circulair DNA-virus, dat zou kunnen passen in de familie van de *Circoviridae*, die bij de mens nog niet eerder is aangetroffen.¹⁶ Ook hier kon een associatie met ziekte bij latere systematische onderzoeken niet worden bevestigd.^{17,18} Tevens werd de situatie zeer onoverzichtelijk toen er niet zozeer sprake bleek van een duidelijk te karakteriseren virus, maar eerder van een heterogene groep virussen met gemeenschappelijke kenmerken. Alle varianten tezamen beschouwd lijkt het dat die zeer wijdverbreid bij de mens voorkomen, tot in tientallen procenten van de bevolking. Op een dergelijke schaal is een zeldzame ziekte niet eenvoudig te koppelen aan het vaststellen van een virusinfectie.¹⁹ Ook hier is het wel mogelijk dat het virus, of misschien een specifieke variant, in bepaalde omstandigheden een rol speelt in een ziekteproces. Een aanwijzing in die richting is gekomen van een recente zeer grondige analyse, uitgevoerd door een onderzoeksgroep die de krachtige techniek *representational difference analysis* gebruikte om een hepatitis non-A- tot en met -E-ziektegeval te analyseren. Deze analyse leverde een veelbelovend DNA-isolaat op dat bij nadere beschouwing echter nauw verwant bleek te zijn aan het reeds bekende TT-virus. Of het TT-virus kan worden beschreven als een

humaan pathogeen virus, dan wel of het juist de weg zal openen naar nieuwe inzichten in pathogenese van infectieuze ziektebeelden, is dus nog niet duidelijk.

Overigens is recentelijk op vergelijkbare wijze nog een ander mogelijk nieuw hepatitisvirus gevonden, door de onderzoekers *SEN-V* genoemd. De sporadische en nog niet formeel gepubliceerde gegevens die tot nu toe beschikbaar zijn tonen interessante correlaties.²⁰ Bevestiging hiervan moet echter nog worden afgewacht.

Vele mogelijke verwekkers van 'hepatitis non-A tot en met -E' bleken inmiddels niet consistent te associëren met klinische problemen. Al is er nog geen sprake van een 'end of science' voor de ontdekking van hepatitisvirussen, er mag niet teveel worden verwacht van de rol die nieuwe virussen kunnen spelen in het verklaren van onbekende vormen van virushepatitis.

Niet-virale infectieuze hepatitis

Ten slotte is het nuttig te vermelden dat ook door andere dan virale infecties een hepatitis kan ontstaan. Als zodanig is dit, zeker in milde vorm, een weinig specifiek verschijnsel bij vele infecties, zoals septische ziektebeelden door vele bacteriële verwekkers. Meer specifiek kan hepatitis aanwezig zijn bij leptospirose door verschillende *Leptospira interrogans*-serotypen. Ook bij Q-koorts (*Coxiella burnetii*) en lues (primair en secundair) kan een hepatitis opvallend zijn.

Literatuur

- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA* 1967;200:365-73.
- Balayan MS, Andjaparidze AG, Savinskaya SS, et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983;20:23-31.
- Bradley DW. Introduction: the diversity of human hepatitis viruses. *Semin Virol* 1993;4:269-71.
- Hillingso JG, Jensen IP, Tom-Petersen L. Parvovirus B19 and acute hepatitis in adults. *Lancet* 1998; 351: 955-6.
- Sokal EM, Melchior M, Cornu C, et al. Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. *Lancet* 1998;352:1739-41.
- Karetnyi YV, Beck PR, Markin RS, Langnas AN, Naides SJ. Human parvovirus B19 infection in acute fulminant liver failure. *Arch Virol* 1999;144:1713-24.
- Bernuau J, Durand F, Valla D. Parvovirus B19 infection and fulminant hepatitis. *Lancet* 1999;353:754-5.
- Watanabe S, Arima K, Nishioka M, Yoshino S, Hasui H, Fujikawa M. Comparison between sporadic cytomegalovirus hepatitis and Epstein-Barr virus hepatitis in previously healthy adults. *Liver* 1997;17:63-9.
- Alter MJ, Gallagher M, Morris TT, et al. Acute non-A-E hepatitis in the United States and the role of hepatitis G virus infection. Sentinel Counties Viral Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1997;336:741-6.
- Simons JN, Leary TP, Dawson GJ, Pilot-Matias TJ, Muerhoff AS, Schlauder GG, Desai SM, Mushahwar IK. Isolation of novel virus-like sequences associated with human hepatitis. *Nat Med* 1995; 1: 564-9.
- Leary TP, Muerhoff AS, Simons JN, et al. Sequence and genomic organization of GBV-C: a novel member of the flaviviridae associated with human non-A-E hepatitis. *J Med Virol* 1996;48:60-7.
- Linnen J, Wages J Jr, Zhang-Keck ZY, et al. Molecular cloning and disease association of hepatitis G virus: a transfusion-transmissible agent. *Science* 1996; 271: 505-8.
- Muller C. Pathogenicity of GBV-C/HGV infection. *J Viral Hepat* 1999;6 Suppl 1:49-52.
- Romano L, Fabris P, Tanzi E, Tositti G, Mazzotta F, Zanetti AR. GBV-C/hepatitis G virus in acute non-A-E hepatitis and in acute hepatitis of defined aetiology in Italy. *J Med Virol* 2000;61:59-64.
- Nishizawa T, Okamoto H, Konishi K, Yoshizawa H, Miyakawa Y, Mayumi M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:92-7.
- Mushahwar IK, Erker JC, Muerhoff AS, et al. Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:3177-82.
- Cossart Y. TTV a common virus, but pathogenic? *Lancet* 1998;352:164.
- Wang JT, Lee CZ, Kao JH, Sheu JC, Wang TH, Chen DS. Incidence and clinical presentation of posttransfusion TT virus infection in prospectively followed transfusion recipients: emphasis on its relevance to hepatitis. *Transfusion* 2000;40:596-601.
- Leary TP, Erker JC, Chalmers ML, Desai SM, Mushahwar IK. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* 1999;80:2115-20.
- Op de internetsites: <http://www.diasorin.com/news/senv.htm>
http://www.diasorin.com/news/senv_virus_discovery_white_paper.htm
toont de firma DiaSorin enige gegevens over het nieuwe virus SEN-V. Zie ook: Allain JP. Emerging viruses in blood transfusion. *Vox Sang* 2000;78 Suppl 2: 243-8.

Conclusie

Virale hepatitis wordt op grond van de acute klinische presentatie vaak als een eenheid benaderd. Dit is echter niet terecht, omdat bij nadere beschouwing wordt vastgesteld hoe groot de diversiteit is tussen de verwekkers. Deze virussen vormen een heterogene groep, zelfs afkomstig uit geheel verschillende families. Het bevordert het inzicht te denken over virale hepatitis als een probleem dat wordt veroorzaakt door een spectrum van sterk verschillende mogelijke verwekkers.

Summary

Based on its clinical presentation, viral hepatitis is usually considered as an entity while actually the syndrome can be caused by a diversity of human viruses. This is relevant with respect to all aspects of the management of these infections. In addition to the classical "hepatitis viruses", several other viruses are capable of causing hepatitis, which can be serious. Furthermore, a search is still going on for additional viruses causing hepatitis, although some recently characterized candidates failed to show a consistent association with clinical problems.

Dr. A.C.M. Kroes, arts-microbioloog, Leids Universitair Medisch Centrum, Klinisch Microbiologisch Laboratorium, Afdeling Medische Microbiologie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden

Hepatitis A; een 'Public Health'-probleem?

J.A.R. VAN DEN HOEK, S.M. BRUISTEN

Nederland is een land met een lage incidentie van hepatitis A. Epidemiologische gegevens laten zien dat import van hepatitis-A-virus (HAV) vanuit landen waar dit virus endemisch is, een belangrijke rol speelt bij patiënten die de ziekte oplopen in Nederland. Actieve vaccinatie van reizigers en met name van de kinderen van één tot vijf jaar oud die reizen naar landen waar hepatitis A endemisch is (zoals Turkije en Marokko) wordt dan ook aanbevolen. Daarnaast worden incidenteel HAV-infecties gezien bij homoseksuele mannen, vooral onder diegenen die sauna's bezoeken. Ook deze groep wordt vaccinatie aangeraden.

Onderzoek naar de verspreiding van de verschillende subtypes van HAV zal een belangrijke bijdrage leveren aan de kennis over de verspreiding van HAV binnen Nederland, wat gevolgen kan hebben voor de preventie.

Trefwoorden: epidemiologie, hepatitis A, immuniteit

Hepatitis A is een ziekte van de lever, veroorzaakt door het hepatitis-A-virus (HAV). Wereldwijd is acute virale hepatitis, met name hepatitis A, een van de meest voorkomende infectieziekten. De ziekte verspreidt zich door feco-orale transmissie. Het voorkomen van hepatitis A in een land is sterk gerelateerd aan zijn economische ontwikkeling. In minder ontwikkelde landen komt de ziekte voornamelijk voor bij kinderen en is het overgrote deel van de volwassenen immuun. Hoe beter de economische en sociale omstandigheden, des te beter worden de hygiënische condities, waardoor de kans op een hepatitis-A-infectie (de infectiedruk) minder wordt. Dit houdt ook in dat in de meer ontwikkelde landen de gemiddelde leeftijd van degenen die geïnfecteerd worden, hoger is.¹

De morbiditeit van hepatitis A bij kinderen is gering. Volwassenen daarentegen ontwikkelen vaker klinische symptomen. Een dergelijke verschuiving in infectiedruk en dus in leeftijd heeft tot gevolg dat in de meer ontwikkelde landen relatief meer klinische infecties voorkomen.

Transmissie

HAV wordt uitgescheiden in de feces van geïnfecteerde personen. De meest voorkomende manier van overdracht is de feco-orale route (meer dan 95 procent). Daar het virus al aan het einde van de incubatietijd, dus voor het ontwikkelen van eventuele symptomen, aanwezig is in de feces, kan een geïnfecteerde persoon het virus uitscheiden zonder dit te weten. Dit is dan ook de reden waarom de bron van een infectie vaak onbekend blijft. Doordat het virus op de handen terecht kan komen, en daar kan overleven, kan men worden geïnfecteerd. Zo kan de ziekte van de ene op de andere persoon overgaan, wat de belangrijkste transmissieroute is. Ook kan men deze infectie krijgen door het drinken van feacaal verontreinigd water, besmet voedsel, sla en fruit dat is gewassen in besmet water. In de VS is tweemaal een epidemie beschreven die te wijten bleek aan besmette aardbeien; de laatste hing samen met in Mexico onder onhygiënische omstandigheden geplukte aardbeien.^{2,3} Dat de aardbeien langdurig waren ingevroren en verwerkt in een dessert, deed geen afbreuk aan de besmettelijkheid van het aanwezige HAV. Andere bekende voedselbronnen zijn garnalen en

schelpdieren afkomstig uit door riolering gecontamineerd zeewater. Door te zwemmen in met fecaliën besmet zwemwater (en door water in te slikken) zou men ook op directe wijze kunnen worden besmet. Dit is vooral buiten Nederland gerapporteerd, zowel in de VS, Canada en China, als in Europa in meer afgelegen gebieden.^{4,7}

Een andere transmissiemogelijkheid die wordt genoemd, is het ontvangen van besmette bloedproducten. In de jaren negentig werden factor-VIII-concentraten geïdentificeerd die verantwoordelijk waren voor de overdracht van hepatitis A in de VS.⁸ Ook nog in 1999 werd in Duitsland een epidemie van hepatitis A gezien onder hemofiliepatiënten, die te wijten was aan gecontamineerd factor-VIII-preparaat, dat voor virusinactivatie was behandeld met de 'solvent/detergent'-methode.⁹ Het bleek dat deze inactivatiemethode wel in staat was om virussen met een envelop uit te schakelen, maar niet het HAV dat geen envelop heeft.¹⁰ Hepatitis A bij injecterende drugsgebruikers is eerder het gevolg van slechte hygiëne dan van het delen van naalden en spuiten. Mogelijk is ook dat met HAV besmette drugs de oorzaak zouden kunnen zijn van epidemieën van hepatitis A onder drugsgebruikers.¹¹ Seksueel contact als transmissieweg wordt ook genoemd, maar betreft het meest waarschijnlijk de feco-orale route, zoals oro-anale seksuele contacten bij homoseksuele mannen.¹²

Virologie

Het hepatitis-A-virus behoort tot de *Picornaviridae* en heeft zijn eigen unieke genus: het *Hepatovirus*. Er is maar één serotype geïdentificeerd en (bij de mens) vier genotypes.¹³ De genotypering kan worden gebruikt om een transmissieweg op te sporen of te bevestigen.

Het virus is voor zijn replicatie afhankelijk van de lever. Na orale inoculatie wordt het virus, na transmissie door de darmwand, opgenomen in de hepatocyten en replicatie vindt plaats in het cytoplasma van de geïnfecteerde hepatocyt. Vanuit de lever komt het HAV in de gal terecht, en vervolgens in de darmen. HAV-uitscheiding in de feces vindt vooral plaats vanaf een week vóór tot een week na het ontstaan van de symptomen, en is op zijn sterkst tijdens het ontstaan van

de symptomen.¹ HAV-patiënten die asymptomatisch zijn, scheiden echter ook virus uit.

HAV-RNA kan ook in het bloed worden aangetoond in de incubatietijd.¹⁴ In een recent onderzoek werd de viraemie bestudeerd gedurende een lange follow-up-periode. Er werd HAV-RNA aangetoond in serum met reverse-transcriptase-PCR gedurende een periode van gemiddeld 17 dagen voor en 79 dagen na de alanine-aminotransferasepiek.¹⁵ Het HAV is goed bestand tegen allerlei fysische en chemische invloeden. Het is thermostabiel en zuurbestendig. Bij kamertemperatuur, zowel in droge als in vochtige omstandigheden, kan het enkele weken overleven. Invriezen bij -20 °C of -70 °C heeft nauwelijks invloed op de infectiviteit. Door het ontbreken van een envelop is het virus ongevoelig voor organische oplosmiddelen. Desinfectie vindt plaats met formaline, hypochloriet en verhitte. In de thuissituatie kan desinfectie worden uitgevoerd met huishoudchloor.

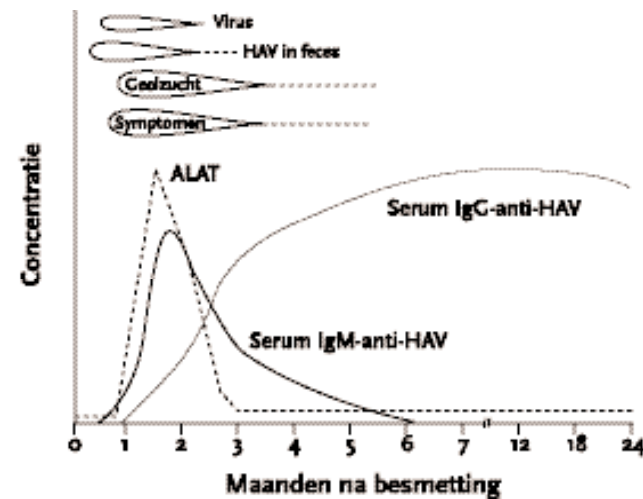
Ziekte

De incubatietijd van hepatitis A is 15 tot 50 dagen, met een gemiddelde van 30 dagen. Het optreden van symptomen en de morbiditeit is sterk geassocieerd met leeftijd: de duur en de ernst van de ziekte nemen in het algemeen toe met de leeftijd. Zo verloopt de infectie bij 90 procent van de kinderen jonger dan vijf jaar zonder noemenswaardige symptomen. Vanaf vijf jaar is het percentage klinische verschijnselen 75 procent of meer. De eerste verschijnselen bestaan uit algemene malaise, koorts, gebrek aan eetlust, misselijkheid en braken. De productie van donkere urine is vaak de reden voor een patiënt om een arts te consulteren. Een paar dagen later ontstaan de stopverfkleurige ontlasting en de gele verkleuring van huid, sclerae en slijmvliezen. Het acute beeld duurt één tot twee weken. De duur van de klachten is meestal vier tot zes weken, maar met name bij volwassenen kan er een langdurige herstelperiode van meerdere maanden tot een jaar zijn, gekenmerkt door moeheid. Een hepatitis-A-infectie wordt nooit chronisch, wel kan bij 10 tot 20 procent van de patiënten weken tot maanden na een ogenschijnlijk herstel plotseling een terugval optreden (met mogelijk weer virusuitscheiding).¹ Alle patiënten met een ongecompliceerde ontsteking genezen zonder restverschijnselen. Soms kan hepatitis A bij volwassenen een zeer ernstig verloop hebben.¹⁶ Een fulminante hepatitis (minder dan 1,5 procent van de in het ziekenhuis opgenomen gevallen van icterische hepatitis) kan leiden tot een acute gele leveratrofie en sterfte. De sterfte aan hepatitis A is afhankelijk van leeftijd. Bij patiënten die in het ziekenhuis waren opgenomen, was de sterfte 1 procent bij patiënten tussen de 15 en 40 jaar en 5,7 procent bij patiënten ouder dan 40 jaar.¹⁷ De immuniteit na een HAV-infectie is levenslang.¹

Diagnostiek

De diagnose 'hepatitis-A-infectie' berust op de detectie van hepatitis-A-specifieke IgM-antistoffen. Vrijwel gelijktijdig tot enkele weken hierna kunnen IgG-antistoffen worden gedetecteerd (volledige seroconversie). In geval van een twijfelachtige serologische diagnostiek of wanneer er twijfel is bij de klinische diagnose kan er (experimenteel) een reverse-transcriptase (RT)-PCR worden uitgevoerd, welke een amplificatie is van een specifiek gedeelte van het HAV-genoom. Het virus wordt twee weken vóór tot ruim twee weken na aanvang van symptomen uitgescheiden in feces (Figuur 1). Echter ook bloed (serum, EDTA-plasma) is mogelijk bruikbaar om met RT-PCR het virus rechtstreeks aan te tonen.

Figuur 1. Schematische weergave van het beloop en de laboratoriumbevindingen bij acute hepatitis A. Bron: Feinstone SM, Gust ID. Hepatitis A virus. In: Principles and practice of infectious diseases. 2000; 5e editie, vol. 2, hoofdstuk 161. Eds: Mandell, Douglas en Bennett.



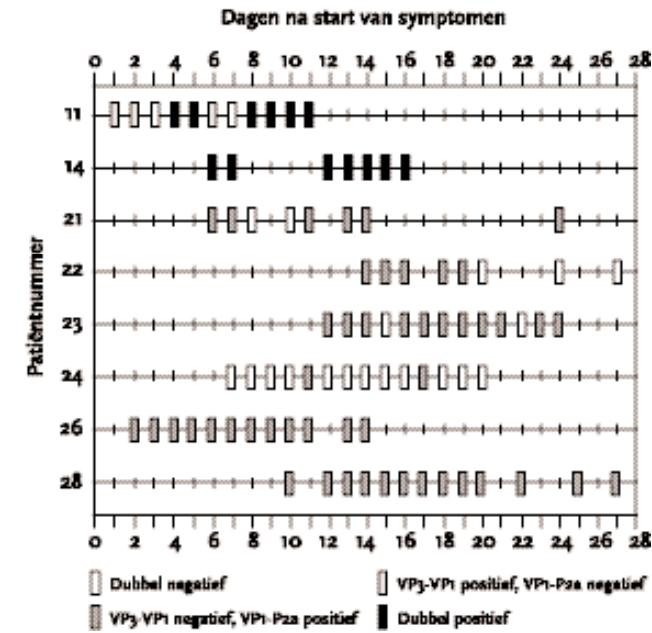
Besmettelijkheid

In de praktijk wordt een besmettelijke periode aangehouden van een week voor tot een week na het begin van de klachten. Gezinsleden of daarmee vergelijkbare personen die in deze periode contact hebben gehad met de patiënt (met name personen die van hetzelfde toilet gebruikmaken) komen in aanmerking voor primaire preventie door middel van passieve immunisatie. Zonder profylaxe zou 20 tot 50 procent van deze contacten symptomatische hepatitis ontwikkelen.¹ HAV-RNA in feces kan weliswaar langer dan twee weken worden aangetoond, maar de epidemiologische betekenis hiervan is onduidelijk.^{18,19} In een recent eigen onderzoek is ook gekeken naar de duur van uitscheiding van HAV in feces.²⁰ In follow-upmateriaal verkregen van acht patiënten tot maximaal een maand na aanvang van de symptomen werd tot 33 dagen later het virus in feces gedetecteerd met RT-PCR. De 'viral load' varieerde daarbij zowel tussen personen als tussen de verschillende fecesmonsters van één persoon, zoals is af te leiden uit het feit dat de RT-PCR variabel positief was voor de geteste regio's in het genoom (Figuur 2).²⁰ In een onderzoek waarbij apen intraveneus werden ingespoten met HAV-positieve feces-suspensies bleek dat alleen de suspensies met een relatief hoge viral load leidden tot infectie van de apen. De fecesmaterialen waarmee deze geïnfecteerde apen waren ingespoten, waren afkomstig van patiënten die tot 24 dagen na aanvang van symptomen nog sterk positief waren voor HAV-antigeen.²¹

Epidemiologie Wereldwijd

Vroeger kwam hepatitis A overal in de wereld op kinderleeftijd voor. Tegenwoordig kunnen wereldwijd drie geografische gebieden worden onderscheiden: gebieden met een hoog endemisch niveau, gebieden met een laag endemisch niveau en gebieden die hier tussenin zitten.^{22,23} Hadler schatte dat er begin jaren negentig wereldwijd 1,4 miljoen klinische gevallen van hepatitis A werden gemeld.²² In landen met een hoog tot zeer hoog endemisch niveau (respectievelijk landen in Azië, Afrika en Oost-Europa en landen in Latijns-Amerika, China en het Amazonegebied in Brazilië) verspreidt HAV zich snel en heeft meer dan 90 procent van de kinderen

Figuur 2. HAV-RT-PCR-amplificatie op follow-up-fecesmaterialen van acht personen. Patiënt 11 is een kind van Turkse afkomst, patiënt 14 een kind van Marokkaanse afkomst, en de zes overige patiënten zijn mannen met homoseksuele contacten. De meeste patiënten hadden feces positief in de RT-PCR, met primers gelegen in de VP1-P2a-regio (lichtste grijze blokken) wat een meer geconserveerde regio in het HAV-genoom is dan de capside VP3-VP1-regio.



op vijfjarige leeftijd antistoffen tegen HAV. Daar hepatitis A in deze landen een kinderziekte is en hepatitis A bij kinderen in het algemeen asymptomatisch verloopt, is het aantal gerapporteerde gevallen van HAV-infectie laag. Epidemieën worden in deze landen zelden gezien. Een intermediair niveau wordt gezien in landen in Zuid- en Oost-Europa en in het Midden-Oosten. Hepatitis A wordt in deze landen het meest gezien bij kinderen tussen de 5 en 15 jaar oud met een prevalentie van 90 procent bij de groep jongvolwassenen. Er zijn geen duidelijke risicogroepen aan te wijzen en epidemieën worden veel gezien. Epidemische verheffingen worden waargenomen doordat de infectiedruk vaker op hogere leeftijd optreedt, waarbij infecties vaker symptomatisch verlopen. Een lage endemiciteit wordt gezien in de Verenigde Staten, Australië en landen in Midden- en Noord-Europa en Japan, waar per jaar tot 15 klinische gevallen van HAV-infectie per 100.000 inwoners worden gerapporteerd. De prevalentie van HAV-antistoffen is 10 procent bij kinderen met een leeftijd van 15 jaar en neemt geleidelijk toe tot 70 procent bij personen van 50 jaar of ouder. In deze laag-endemische landen wordt de ziekte verkregen door te reizen naar landen met een hogere prevalentie; elke leeftijdsgroep is in principe gevoelig voor hepatitis A.²² Epidemische verheffingen worden af en toe gezien. In deze gebieden wordt hepatitis A ook gezien bij homoseksuele mannen.¹² Gezien de snelheid waarmee landen zich economisch en sociaal ontwikkelen, moet de bovenstaande indeling van landen in de verschillende niveaus niet te statisch worden gezien.

In Nederland

Nederland behoort tot de landen met een lage endemiciteit. Het aantal aangiften (vanaf 1951 een aangifteplichtige ziekte) is aanzienlijk afgenomen in de jaren zestig en gestabiliseerd in de jaren zeventig met 5 tot 7 gevallen per 100.000 inwoners per jaar.²⁴ Vanaf de jaren zestig wordt een lichte stijging gezien van het relatieve aandeel van volwassenen, maar kinderen

blijven oververtegenwoordigd in de aangiften. Seroprevalentie-onderzoek onder de Nederlandse bevolking en bloeddonoren in 1993 laat zien dat minder dan vijf procent van de tieners antistoffen heeft tegen HAV. Op veertigjarige leeftijd heeft 50 procent van de donoren antistoffen en op de leeftijd van 55 jaar 80 procent.²⁵ Deze hoge prevalentiecijfers op oudere leeftijd reflecteren de endemische situatie van HAV-transmissie zo'n veertig jaar of langer geleden.

Homoseksuele mannen vormen een op zichzelf staande risicogroep. Bij deze groep worden af en toe epidemieën gezien van klinische gevallen van hepatitis A.²⁶ Een case-control-onderzoek onder homoseksuele mannen in Amsterdam liet zien dat oro-ale en digitaal-ale seksuele contacten en bezoek aan sauna's geassocieerd waren met acute hepatitis A.¹²

In de periode 1993-1997 ging het in tweederde van de aangegeven gevallen om infecties die waarschijnlijk waren verkregen in Nederland.²⁷ Toch wordt hepatitis A in Nederland gezien als een importziekte. De maandelijkse incidentie van hepatitis A in Nederland vertoont namelijk ieder jaar een seizoengebonden patroon waarbij na de zomervakantie, in de maanden augustus en september, een sterke toename van de incidentie wordt gezien. Kinderen die de zomervakantie hadden doorgebracht in een land waar hepatitis A endemisch is, overwegend Marokko en Turkije, leken de belangrijkste importeurs te zijn van hepatitis A in Amsterdam, Utrecht, Rotterdam en Den Haag. De sterke toename na de zomervakantie kon worden onderscheiden in diverse kleinere epidemieën: allereerst kinderen van Marokkaanse en Turkse afkomst die de vakantie in het moederland hadden doorgebracht, vervolgens kinderen van dezelfde etnische achtergrond die niet op reis waren geweest en vervolgens kinderen en volwassenen van overwegend Nederlandse afkomst.²⁷

In bovengenoemde eigen onderzoek²⁰ is getracht om de klinische epidemiologische verbanden te bevestigen met gebruik van moleculair-biologische methoden. Bij 30 van de 33 onderzochte patiënten met een hepatitis A die in het winterseizoen van 1997/1998 werden gemeld en medewerking aan de studie verleenden is de RT-PCR op feces positief bevonden. De amplificaten zijn vervolgens op hun nucleïnezuursequentie onderzocht. Bij vergelijking van de sequenties van de amplificaten met gepubliceerde sequenties van wereldwijd bekende stammen van werden er twee genotypes herkend in deze patiëntenpopulatie van sporadische gevallen: genotype 1A en genotype 1B. Genotype 1B werd gevonden bij kinderen van Marokkaanse en Turkse afkomst, alsook bij een volwassene die in contact was geweest met deze kinderen. Twee andere volwassen patiënten met dit genotype 1B betrof reizigers naar Algerije en Zuid-Afrika. Dit Afrikaanse genotype onder genoemde groep van reizigers of contacten met reizigers bevestigt het eerder beschreven klinisch-epidemiologische importmodel van hepatitis A.

Genotype 1A werd gevonden bij alle zes homoseksuele mannen die aan het onderzoek deelnamen alsook bij een jongeman van 16 jaar, die geen reizigers-of contact met reizigersrisico rapporteerde en die aangaf alleen heteroseksuele contacten gehad te hebben. Dit genotype 1A komt voor in West-Europa en Noord-Amerika en zou kunnen worden geïmporteerd of in bepaalde risicogroepen als endemisch virus in Nederland kunnen circuleren, of beide.

De epidemiologische gegevens over mogelijke transmissiewegen, zoals hierboven beschreven en verzameld met

behulp van uitgebreid bron- en contactonderzoek, zullen nog in meer uitgebreide onderzoeken worden bevestigd door middel van genetische subtypering van HAV.

Pre- en postexpositie profylaxe

Lang voordat het HAV werd ontdekt, werd profylaxe tegen hepatitis A met behulp van menselijk immunoglobuline toegepast. Tot begin jaren negentig was dit de enige manier om iemand te beschermen tegen een HAV-infectie. Sindsdien is naast de passieve bescherming ook actieve vaccinatie mogelijk.

Immunoglobuline geeft direct kortdurende bescherming. De dosering is afhankelijk van de concentratie van de specifieke antistoffen in het product en het lichaamsgewicht van de te beschermen persoon en de gewenste duur van bescherming. Bij de bestrijding van een epidemische verheffing en bij individuele bescherming na expositie aan HAV is de minimale gewenste beschermingsduur (gezien de incubatietijd) zes weken.

Actieve vaccinatie tegen hepatitis A vindt plaats met een geïnactiveerd hepatitis-A-vaccin. Na vaccinatie ontstaat er snel (in het algemeen binnen twee weken) een beschermende immuniteit die in ieder geval een jaar aanhoudt. Na een volledige serie van twee vaccinaties of een revaccinatie wordt uitgegaan van ten minste 10 jaar bescherming.¹

De GGD en melding van hepatitis A

Hepatitis A is een ziekte die moet worden gemeld in het kader van de Infectieziektewet. Na een melding van een hepatitis-A-patiënt zal de GGD proberen de bron op te sporen door te vragen naar andere gevallen van geelzucht in de omgeving (dit mede gezien de onderrapportage), recent bezoek aan het buitenland en (bij mannen) de aard van de seksuele gerichtheid. Uitleg over de noodzaak van strikte hygiëne zal worden gegeven. Vervolgens worden de gezins- of daarmee vergelijkbare contacten van de patiënt (met name personen die van hetzelfde toilet gebruik maken) geïnventariseerd. Bij de besmettelijke periode wordt in de praktijk uitgegaan van een week voor tot een week na het ontstaan van de klachten. Contacten in deze periode komen in aanmerking voor passieve vaccinatie met immunoglobuline. Deze moet zo snel mogelijk gegeven worden, want later dan twee weken na de mogelijke blootstelling is toediening waarschijnlijk niet meer effectief. Mogelijk is ook actieve vaccinatie in staat een epidemische verheffing in te perken. Onderzoek bij chimpansees heeft aangetoond dat actieve vaccinatie HAV-infectie kan voorkomen indien toegediend kort na blootstelling aan HAV.²⁸ Een goed opgezet klinisch onderzoek waarin na blootstelling de effectiviteit van het HAV-vaccin wordt vergeleken met toediening van immunoglobuline laat nog op zich wachten. Het gebruik van vaccin als post-expositie-profylaxe zou bijvoorbeeld in de kinderdagverblijven en scholen in Amsterdam en andere grote steden veel voordelen hebben, omdat hier relatief veel kinderen zijn die op reis gaan naar Marokko en Turkije waar hepatitis A endemisch is. Zoals hierboven is gemeld, spelen deze kinderen een belangrijke rol bij de import en verdere verspreiding van

HAV bij terugkomst in Nederland. Dit is dan ook de reden dat de GG&GD in Amsterdam in 1998 gestart is met een HAV-vaccinatiecampagne voor de zomervakantie, gericht op kinderen van 1 tot 16 jaar met Marokkaanse en Turkse ouders. In 1998 zijn er een kleine 1.500 en in 1999 meer dan 5.000 kinderen met Havrix Junior gevaccineerd.²⁹ Als het HAV-vaccin in staat is bij epidemische verheffingen op de kinderdagverblijven en scholen verdere verspreiding te voorkomen, heeft een langwerkend vaccin de voorkeur boven een kortdurende passieve immuniteit. Of de vaccinatiecampagnes effect hebben op het voorkomen van hepatitis A in Amsterdam is nog niet te zeggen.

Conclusie

De natuurlijke immuniteit tegen HAV zal in de toekomst zeer waarschijnlijk nog meer afnemen in Nederland. Dit heeft tot gevolg dat Nederlanders die op reis gaan in landen waar HAV endemisch voorkomt, een grote kans lopen om met HAV geïnfecteerd te worden en bij terugkeer het hepatitis-A-virus te importeren. Gezien de grote groep "ontvankelijk" in Nederland, kan hepatitis A epidemisch voorkomen. Daar hepatitis A bij jonge kinderen in het algemeen asymptomatisch voorkomt, en kinderen daardoor een belangrijke rol spelen in de verdere verspreiding van het virus, dient een vaccinatie van deze groep meer een volksgezondheidsbelang dan een persoonlijk belang. Vaccinatie van ouderen heeft zowel een individueel als gemeenschapsbelang. Actieve vaccinatie als pre-expositie-profylaxe (en mogelijk ook als post-expositie-profylaxe) zal meer en meer de passieve bescherming met immunoglobuline gaan verdringen.

Onderzoek waarin naast de verzameling van epidemiologische gegevens eveneens subtypering van HAV plaatsvindt, zal de kennis over de transmissie van HAV in ons land doen toenemen en de preventie ondersteunen.

Summary

In the Netherlands the incidence of Hepatitis A is low. Most cases seen in the Netherlands are related to travelling abroad. Children of Turkish and Moroccan parents who spent their holidays in the country of origin of their parents, play an important role in the import and further transmission of hepatitis A virus in the Netherlands. Active vaccination of travellers and in particular children of one to five years old who travel to countries where hepatitis A is endemic, is strongly recommended. Incidentally, HAV infections are seen among homosexual men, in particular among those visiting saunas. Vaccination of this group is also recommended. Studies into the prevalence of subtypes of HAV will make an important contribution to further knowledge on the transmission of HAV within the Netherlands. This knowledge may in its turn have an impact on further vaccination strategies.

Mw. dr. J.A.R. van den Hoek, arts-epidemioloog,

Mw. dr. S.M. Bruisten, moleculair bioloog,

beiden GG&GD, Cluster Infectieziekten, Nieuwe Achtergracht 100, 1018 WT Amsterdam

Literatuur

- Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998;341:1643-8.
- Niu MT, Polish LB, Robertson BH, et al. Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *J Infect Dis* 1992;166(3):518-24.
- Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, et al. A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National Hepatitis A Investigation Team. *N Engl J Med* 1999;340:595-602.
- Le Guyader F, Haugarreau L, Miossec L, Dubois E. Three-Year Study To Assess Human Enteric Viruses in Shellfish. *Appl Environ Microbiol* 2000;66(8):3241-8.
- Garin D. Exposure to enteroviruses and hepatitis-A-virus among divers in environmental waters in France, first biological and serological survey of a controlled cohort. *Epidemiol Infect* 1994;113:541-9.
- Xu Z, Liz H, Wang J-X, Xiao Z-P, Dong D-X. Ecology and prevention of a shellfish-associated hepatitis A epidemic in Shanghai, China. *Vaccine* 1992;10 Suppl 1:S67-S68.
- De Serres G, Cromeans TL, Levesque B, et al. Molecular confirmation of hepatitis-A-virus from well water: epidemiology and public health implications. *J Infect Dis* 1999;179:37-43.
- Robertson BH, Alter MJ, Bell BP, et al. Hepatitis-A-virus sequence detected in clotting factor concentrates associated with disease transmission. *Biologicals* 1998;26(2):95-9.
- Chudy M, Budek I, Keller-Stanislawski B, et al. A new cluster of hepatitis A infection in hemophiliacs traced to a contaminated plasma pool. *J Med Virol* 1999;57(2):91-9.
- Robertson BH, Erdman DD. Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products. *Dev Biol Stand* 2000;102:29-35.
- Leino T, Leinikki P, Hyypia T, et al. Hepatitis A outbreak amongst intravenous amphetamine abusers in Finland. *Scand J Infect Dis* 1997;29:213-6.
- Leentvaar-Kuijpers A, Kool JL, Veugelers PJ, Coutinho RA, van Griensven GJ. An outbreak of hepatitis A among homosexual men in Amsterdam, 1991-1993. *Int J Epidemiol* 1995;24:218-22.
- Robertson BH, Jansen RW, Khanna B, et al. Genetic relatedness of hepatitis-A-virus strains recovered from different geographical regions. *J Gen Virol* 1992;73:1365-77.
- Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, et al. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology* 1997;26:1634-9.
- Bower WA, Nainan OV, Han X, Margolis HS. Duration of viremia in hepatitis-A-virus infection. *J Infect Dis* 2000;182:12-7.
- Leebeek FW dMRBD. Hepatitis A; een onschuldige kinderziekte? [Hepatitis A; an innocent childhood disease?]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1994;138:937-40.
- Willner IR, Uhl MD, Howard SC, Williams EQ, Riely CA, Waters B. Serious hepatitis A: an analysis of patients hospitalized during an urban epidemic in the United States. *Ann Intern Med* 1998;128(2):111-4.
- Yotsuyanagi H. Duration of viremia in human hepatitis A viral infection as determined by polymerase chain reaction. *J Med Virol* 1993;40:35-38.
- Rosenblum LS, Villarino ME, Nainan OV, et al. Hepatitis A outbreak in a neonatal intensive care unit: risk factors for transmission and evidence of prolonged viral excretion among preterm infants. *J Infect Dis* 1991;164:476-82.
- Bruisten SM, Steenberg van JE, Pijl AS, Niesters HGM, Doornum van GJJ, Coutinho RA. Molecular epidemiology of hepatitis-A-virus in Amsterdam. *J Med Virol* 2000;63:88-95.
- Polish LB, Robertson BH, Khanna B, et al. Excretion of hepatitis-A-virus (HAV) in adults: comparison of immunologic and molecular detection methods and relationship between HAV positivity and infectivity in tamarins. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3615-7.
- Hadler SC, Hollinger FB, Lemon SM, Margolis HS, editors. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1991; Global impact of hepatitis-A-virus infection: changing patterns. p. 14-20.
- WHO. Public health control of hepatitis A: memorandum from a WHO meeting. *Bulletin of the World Health Organization* 1995;73(1):15-20.
- Termorshuizen F. De epidemiologie van hepatitis A in Nederland [The epidemiology of hepatitis A in the Netherlands, 1957-1998]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1998;142:2364-8.
- Zaaijer HL. Hepatitis A antibody titres after infection and immunization: implications for passive and active immunization. *J Med Virol* 1993;40:22-7.
- Coutinho RA, Albrecht-Lent P, Lelie N, Nagelkerke N, Kuipers H, Rijdsdijk T. Prevalence and incidence of hepatitis A among male homosexuals. *Br Med J* 1983; 287:1743-5.
- van Gorkom J. Jaarlijkse epidemie van hepatitis A in verband gebracht met reisgedrag van kinderen van immigranten in de vier grote steden [Annual epidemics of hepatitis A in four large cities related to holiday travel among immigrant children]. *Ned Tijdschr Geneesk* 1998;142:1919-23.
- Robertson BH, D'Hondt EH, Spelbring J, Tian H, Krawczynski K, Margolis HS. Effect of postexposure vaccination in a chimpanzee model of hepatitis-A-virus infection. *J Med Virol* 1994;43:249-51.
- GG&GD Amsterdam. Jaarverslag afdeling Infectieziekten. 1999.

Hepatitis E: nieuwe ontwikkelingen

H.L. ZAAIJER

Hepatitis-E-virus (HEV) veroorzaakt sporadische gevallen en epidemieën van acute hepatitis in de (sub)tropen. Bij sporadische gevallen in de Westerse wereld lijkt niet altijd sprake te zijn van import. Recentelijk bleek dat een hoog percentage van varkens in Azië en Noord-Amerika op jonge leeftijd een infectie met een HEV-achtig virus doormaakt. Ook bleek tot 91 procent van onderzochte knaagdieren in de Verenigde Staten een positieve reactie te vertonen voor IgG-anti-HEV. Mogelijk zijn geïsoleerde gevallen van hepatitis E in het Westen zoönotisch.

Trefwoorden: epidemiologie, hepatitis-E-virus

Voor de Nederlandse arts is hepatitis-E-virus (HEV) een rareiteit, die soms de oorzaak blijkt te zijn van acute geelzucht bij een terugkerende reiziger. In India is HEV echter de meest frequente oorzaak van acute hepatitis bij volwassenen. Infectie met hepatitis-A- of -B-virus komt in de tropen misschien vaker voor, maar deze infecties vinden daar meestal zonder symptomen plaats op (zeer) jonge leeftijd. De epidemiologie van hepatitis E kent twee raadsels: waarom treedt infectie met HEV in endemische gebieden pas op bij jonge volwassenen? En wat moet men denken van meldingen van geïsoleerde gevallen van hepatitis E in Westerse landen bij mensen die niet hebben gereisd? Recente bevindingen werpen een nieuw licht op de epidemiologie van hepatitis E.

Epidemiologie

HEV is een RNA-virus zonder envelop, voorlopig ingedeeld bij de Calici-virussen. Er bestaan minstens twee genotypes: het Birmese en het Mexicaanse. Het virus is endemisch in Azië, Noord-Afrika en Midden-Amerika. Het veroorzaakt daar lokale epidemische verheffingen, voornamelijk door fecale contaminatie van drinkwater en geïsoleerde gevallen. Hepatitis E treedt vooral op bij jonge volwassenen. Klinisch is hepatitis E niet te onderscheiden van hepatitis A. Subklinisch verloopende hepatitis E komt voor, chronisch verloopende hepatitis E komt niet voor. Het beloop is iets vaker fulminant dan bij hepatitis A. In vergelijking met hepatitis A is verspreiding door direct contact (secundaire gevallen) zeldzaam, wat misschien de hogere voorkeursleeftijd van hepatitis E ten opzichte van hepatitis A verklaart. Zwangere vrouwen zijn verhoogd vatbaar voor hepatitis E en hebben een verhoogde kans op een fulminant beloop. Specifieke therapie voor hepatitis E is niet beschikbaar. Onderzoek bij proefdieren naar bescherming tegen hepatitis E door vaccinatie met recombinant capsid-eiwit is veelbelovend.^{1,2}

Hepatitis E in Nederland

Van Zeijl beschreef als eerste een importgeval van hepatitis E in Nederland.³ Als importziekte bleek hepatitis E niet zeldzaam te zijn: over de periode 1992-1996 rapporteerden wij 19 gevallen van geïmporteerde hepatitis E.⁴ Twee Nederlandse patiënten echter leden aan hepatitis E zonder voorafgaand tropenbezoek.^{5,6} Ook vonden wij bij een gezonde Nederlandse bloeddonor, die niet reisde, seroconversie van IgG tegen HEV, met tijdelijke aanwezigheid van IgM-anti-HEV.⁵

Inmiddels zijn in vele Westerse landen sporadische gevallen van hepatitis E gemeld. Ook lijkt een klein deel van de Westerse bloeddonors anti-HEV-antistoffen te bezitten. Tot voor kort werden deze inheemse gevallen terecht met de nodige scepsis bezien. Immers: bij een sporadisch non-importgeval is secundaire besmetting, door een terugkerende reiziger met subklinische verloopende hepatitis E, nooit helemaal uit te sluiten. En bij anti-HEV-positieve donors die niet reisden, zonder geelzucht in de anamnese, kan sprake zijn van specifieke reactie of kruisreactie in de anti-HEV-test. Recente bevindingen werpen een nieuw licht op deze zaak.

Hepatitis E: een zoönose?

In 1997 beschreven Meng en collega's de isolatie van een virus uit varkens, dat nauw verwant is aan HEV.⁷ Dit HEV-achtige virus infecteert de meeste Amerikaanse, Canadese, Koreaanse, Thaise en Chinese varkens op jonge leeftijd.⁸ In 1998 volgde de publicatie van een geval van hepatitis E bij een Amerikaan die niet had gereisd. De geïsoleerde stam was nauwer verwant aan de Amerikaanse varkens-HEV (99 procent aminozuurovereenkomst), dan aan de klassieke Birmese en Mexicaanse genotypes (80 procent aminozuurovereenkomst).⁹ Het verband tussen varkens, mensen en HEV kwam overigens niet uit de lucht vallen. Enige jaren tevoren vonden Amerikaanse onderzoekers aanwijzingen dat HEV circuleert in gemeenschappen in Nepal waar mensen en varkens zeer dicht op elkaar leven. Twee recente onderzoeken rapporteren een zeer hoge prevalentie van HEV-antistoffen bij knaagdieren in de USA.^{10,11} Tot 91 procent van ratten uit grote steden blijkt positief voor IgG-anti-HEV. De seroprevalentie neemt toe met de leeftijd. Enkele rattenpopulaties, gevangen op eilanden, waren negatief voor IgG-anti-HEV. Een rat met acute HEV-infectie is nog niet gevangen; typering van het betrokken virus moet dus nog geschieden. De hoge prevalentie van HEV-antistoffen bij Amerikaanse varkens en knaagdieren werpt de vraag op of humane hepatitis E niet veel vaker voor zou moeten komen als HEV inderdaad zo breed verspreid is. Misschien is er bij de genoemde dieren sprake van een verwant, serologisch kruisreagerend virus dat slechts bij uitzondering pathogeen is voor de mens.

Zijn geïsoleerde gevallen van hepatitis E zoönotisch? Nederland telt ongeveer 13 miljoen varkens. Amsterdam zou meer ratten dan mensen huisvesten. Het lijkt zinnig om bij rattenvangers en varkensfokkers met acute geel-

zucht ook aan hepatitis E te denken; en om bij een geval van hepatitis E in Nederland, dat niet geïmporteerd is, navraag te doen naar mogelijk contact met varkens en knaagdieren.

Summary

Hepatitis E virus (HEV) causes sporadic cases and outbreaks of acute hepatitis in (sub)tropical regions. It seems that some sporadic cases of hepatitis E in the Western world cannot be attributed to import. Recently it appeared that a significant percentage of pigs in Asia and North America experience infection with an HEV-like virus. In addition, up to 91 percent of rodents in the USA tested positive for IgG anti-HEV. Possibly isolated cases of hepatitis E in the Western world are of zoonotic origin.

Dr. H.L. Zaaijer, arts-microbioloog, VU Medisch Centrum, Afd. Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Postbus 7057, 1007 MB Amsterdam

Literatuur

- Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol* 2000;15:9-20.
- Yarborough PO. Hepatitis E virus. *Advances in HEV biology and HEV vaccine approaches*. *Intervirology* 1999;42:179-84.
- Van Zeijl JH, van der Kolk WFJ, den Heijer M, Kroes ACM. Onbegrepen hepatitis na een bezoek aan Pakistan: een geval van hepatitis E in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 1992;136:2153-5.
- Zaaijer HL, Lelie PN. Hepatitis E in Nederland, 1992-1996. *Ned Tijdschr Geneesk* 1996;140:1514-5.
- Zaaijer HL, Kok M, Lelie LN, Chau K, van der Pal HJH. Hepatitis E in the Netherlands: imported and endemic. *Lancet* 1993;341:826.
- Hillebrand-Haverkort ME, Zaaijer HL, ten Veen JH. Een thuisblijver met hepatitis E. *Infectieziekten Bulletin* 1996;7:182-4.
- Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:9860-5.
- Meng XJ, Dea S, Engle RE, et al. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J Med Virol* 1999;59:297-302.
- Schlauder GG, Dawson GJ, Erker JC, et al. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J Gen Virol* 1998;79:447-56.
- Kabrane-lazizi Y, Fine JB, Elm J, et al. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:331-5.
- Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, et al. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J Inf Dis* 2000;181:449-55.

Biologie van hechting van bacteriën aan biomaterialen

A. FLEER

De planktonische vorm van een bacterie, solitair rondzwevend in een vloeistof, is kwetsbaar. De sessiele vorm, de aan een oppervlak gehechte bacterie, is veel minder kwetsbaar, niet in de laatste plaats door productie van een biofilm waarin de gehechte bacteriën worden ingebed. De biofilm bestaat voor een groot deel uit een slijmerige polysaccharidesubstantie, ook wel 'extracellular slime substance' (ESS) genaamd. Hechting en de daarop volgende formatie van biofilm zijn strak gereguleerde processen.

Intravasculaire katheters worden ingebracht via een gecontamineerd gebied (huid), maar ook tijdens het operatief inbrengen van een gewrichts- of hartkleprothese zal contaminatie, met name met huidbacteriën niet volledig te vermijden zijn. Het gevolg is een bacteriële biofilm en eventueel op termijn een infectie. Een dergelijke biomateriaal-geassocieerde infectie hoeft in het geval van een katheter niet direct dramatisch te zijn, maar in het geval van een gewrichts- of hartkleprothese kan het een ernstige en potentieel zelfs letale complicatie betekenen. Huidbacteriën, vooral coagulase-negatieve stafylokokken, zijn de voornaamste verwekkers van deze infecties. Resistentie tegen antibiotica is het grootste probleem bij de behandeling van biomateriaalinfecties.

Door intensief onderzoek is in de laatste tien jaar zeer veel inzicht verkregen in de biologie van hechting van bacteriën en van biofilmformatie, en in de fysiologische veranderingen die optreden in bacteriën wanneer zij deel uitmaken van de 'woongemeenschap' van de biofilm.

In de toekomst zal dit inzicht hopelijk leiden tot betere, vooral meer effectieve strategieën voor preventie en behandeling van biomateriaal-geassocieerde infecties.

Trefwoorden: biomaterialen, biofilm, hechting

Hechting van bacteriën aan oppervlakken is voor deze micro-organismen een natuurlijk proces, dat nodig is voor het voortbestaan. De bacterie kan zich zo een 'niche' verschaffen waarin hij toegang heeft tot voedingsstoffen, een symbiose kan aangaan, enz. Deze hechting kan op vele verschillende plaatsen en op vele verschillende manieren plaatsvinden. De mogelijkheden tot adaptatie van bacteriën aan de omstandigheden zijn bijna onuitputtelijk: aan rotsen of boomstammen in rivieren (gladde rotsen in een bergbeekje: veelal een biofilm van *Pseudomonas*), in oliepijpleidingen (verstopping door op de olieproducten 'terende' *Pseudomonas*), en, niet te vergeten, huid en slijmvliezen van mens en dier. Gezien dit fenomenale aanpassingsvermogen is het niet verwonderlijk dat bacteriën mogelijkheden hebben gevonden om te hechten aan biomaterialen. Hierbij zijn tot dan toe onschuldige commensale bacteriën van de huid, coagulase-negatieve stafylokokken, sterk op de voorgrond getreden, omdat is gebleken dat zij een van de belangrijkste verwekkers zijn bij vrijwel alle infecties geassocieerd met biomaterialen.

De mogelijkheid tot hechting aan biomaterialen laat eens te meer zien hoe groot het vermogen tot aanpassing van bacteriën is; in dit geval aan veranderende condities in de gastheer. Het is aannemelijk dat bacteriën voorheen nooit met biomaterialen in contact waren geweest en toch bleek ook hier aanpassing mogelijk – zelfs zeer succesvol.

In dit overzichtsartikel worden de fasen van het hechtings-

proces, de factoren die daarbij van belang zijn en de rol van het biomateriaal beknopt besproken, en tevens wordt kort ingegaan op wat de mogelijke basis is van de opmerkelijke antibiotische resistentie van biofilm-bacteriën.

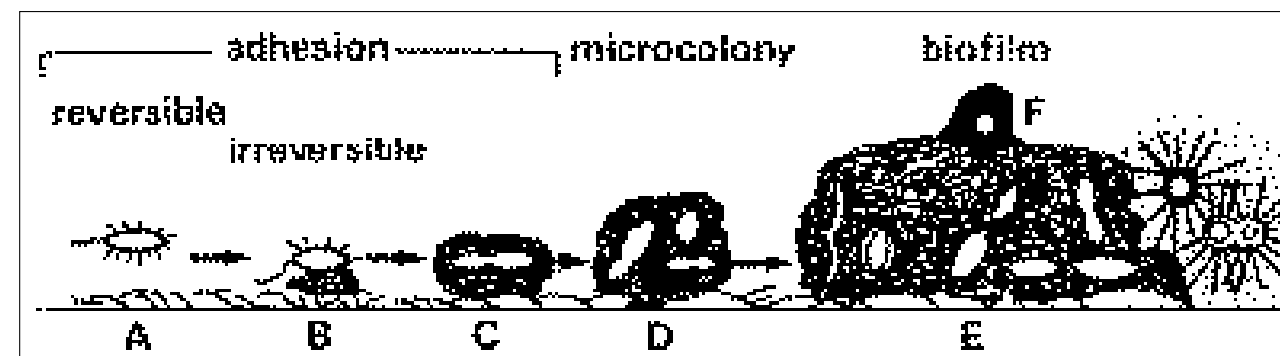
Fasen hechtingsproces, vorming biofilm

In het proces van hechting en biofilmformatie worden verschillende fasen onderscheiden, soms zeer gedetailleerd. Veel van het onderzoek op dit gebied is verricht met coagulase-negatieve stafylokokken, vaak afgekort tot CNS of CONS (laatste vooral in gebruik in de Angelsaksische literatuur), maar is zeker voor een groot deel ook van toepassing op de hechting aan biomaterialen van *Pseudomonas*.

Voor een algemeen begrip van bacteriële hechting is een indeling zoals weergegeven in *figuur 1* het meest praktisch. Gedurende de eerste fase (A) komt het micro-organisme in de nabijheid van het biomateriaaloppervlak en is de hechting reversibel; door een vloeistofstroom of een andere 'shear force' kan het micro-organisme weer worden losgemaakt van het oppervlak. Contact tussen bacterie en oppervlak kan op verschillende manieren tot stand komen: de introductie van een katheter door de huid of het inbrengen van een prothese door een operatiewond zijn enkele voorbeelden van ingrepen die bacteriën dicht in de buurt van het biomateriaal brengen. Desinfectie van de huid voorkomt dit niet, omdat hierbij slechts de buitenste vier tot vijf lagen van de huid van bacteriën

Figuur 1. De verschillende stappen van het hechtingsproces. Nadat het micro-organisme een oppervlak is genaderd, vindt eerst een reversibele associatie plaats (A), waarna via specifieke hechtingsfactoren, bijv. (gelegen op) fimbriae, een irreversibele hechting tot stand wordt gebracht (B). Daarna wordt een microkolonie gevormd door deling en productie van extracellulaire slijmsubstantie (C en D). Formatie van de biofilm komt tot stand door voortgaande productie van slijmsubstantie, deling en eventueel vangst van micro-organismen uit de bloedbaan (E en F) (Aangepast overgenomen uit: Costerton JW, et al. *Bacterial biofilms in nature and disease. Ann Rev Microbiol* 1987;41:435-64).

ADHERENCE OF BACTERIA TO A SURFACE



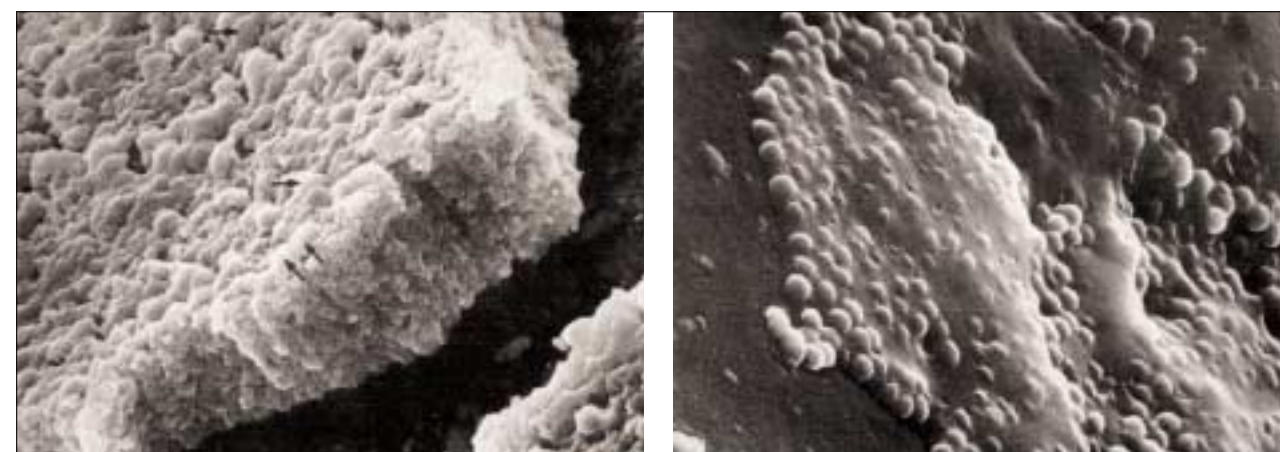
worden ontdaan, terwijl bacteriën tot 20-25 huidlagen diep kunnen worden aangetroffen!¹

Nadat een bacterie een oppervlak voldoende genaderd is, kan als gevolg van fysisch-chemische interacties (o.a. Vanderwaalskrachten) de bacterie zo dicht tot het oppervlak worden gebracht dat specifieke hechtingsfactoren zoals fimbriae of fibrillae kunnen worden gebruikt, als het ware 'in stelling' worden gebracht om stap B, irreversibele adhesie, tot stand te brengen. Vervolgens start de bacterie de productie van extracellulaire polysaccharidecomplexen (vaak ook wel aangeduid als "extracellular slime substance" of ESS of kortweg "slime"), die via de vorming van een microkolonie leidt tot

de formatie van een biofilm (stappen C, D en E), die een relatief grote dikte kan bereiken (*figuur 2*).

Ultrastructureel en functioneel onderzoek met CNS heeft opgeleverd dat voor de overgang van fase A naar B, dus van reversibele naar irreversibele hechting aan het biomateriaaloppervlak, eiwitachtige complexen (adhesines) op de celwand een essentiële rol vervullen. Verwijdering van deze eiwitten voorkomt deze primaire of initiële hechting.²⁻⁴ Uit de laatste twee onderzoeken bleek dat deze hechtingseiwitten tot expressie worden gebracht op haarvormige uitsteeksels, waarschijnlijk vergelijkbaar met fimbriae van Gram-negatieve bacteriën, die bij de laatste onder meer verantwoordelijk

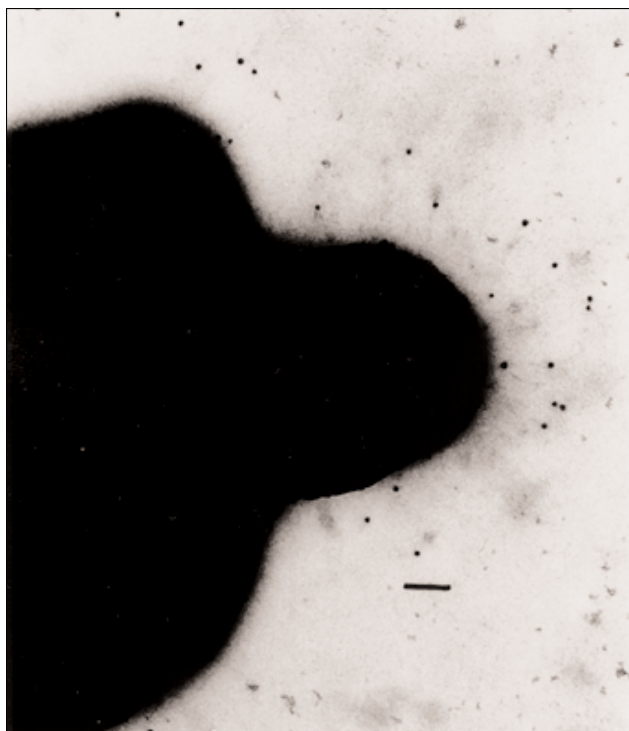
Figuur 2. Biofilm van stafylokokken ingebed in een laag van slijmsubstantie op een polyethyleenkatheter; breukvlak toont multipiele lagen stafylokokken na incubatie gedurende 96 uur (Uit: Peters G, et al. *Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. J Infect Dis* 1982;146:479-82).



zijn voor de hechting aan slijmvliesepitheel. Het was eigenlijk niet goed bekend of stafylokokken dergelijke fimbriae-achtige structuren bezaten, maar in *figuur 3* zijn zij duidelijk te onderscheiden als een soort 'fuzzy coat'. Eiwitcomplexen die waren losgemaakt van het celwandoppervlak van stafylokokken bleken een molecuulgewicht van 220-250 kilodalton te hebben, en zich onder de elektronenmicroscopie zowel als lineaire structuren als in clusters te manifesteren (*figuur 4*). Bovendien bleken deze eiwitten *in vitro* de hechting van stafylokokken aan biomateriaaloppervlak te kunnen remmen.⁵ Het is voorstelbaar dat de lineaire complexen in natieve staat,

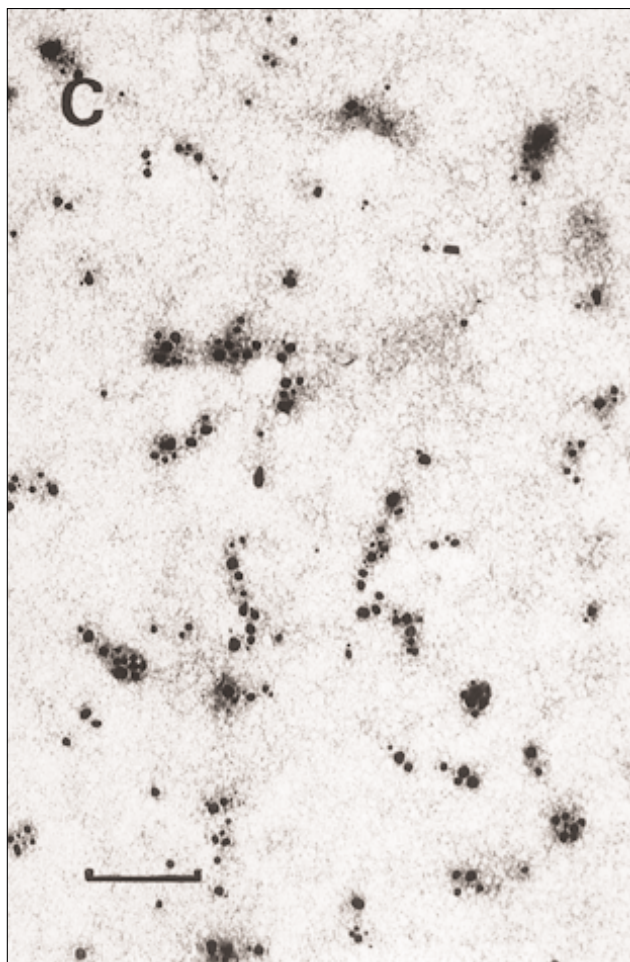
d.w.z. op de celwand, zich presenteren als 'fimbriae-achtige' structuren. Tevens bleek uit het laatste onderzoek dat stafylokokken zich in twee varianten konden voordoen, namelijk met en zonder adhesine, wat kan wijzen op 'phenotype switching' of fasevariatie. Het fenomeen van fasevariatie kan voor een bacteriesoort een selectief voordeel betekenen bij aanpassing aan wisselende condities. Van fasevariatie is aangetoond dat het van belang is voor de virulentie van o.a. pneumokokken en gonokokken. Mogelijk bepaalt dit fenomeen voor een deel de relatieve virulentie van CNS bij infecties geassocieerd met biomaterialen.

Figuur 3. Haarachtige uitsteeksels op het oppervlak van *S. epidermidis*, waarop met een met goud gemerkte antistof een adhesiefactor voor polystyreen wordt aangetoond (zwarte bolletjes zijn gouddeeltjes met een diameter van 12 nanometer; balk: 100 nanometer) (Uit: Timmerman CP, et al. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 1991;59:4187-92).



Verder leverde genetisch onderzoek door de groep van Götz uit Tübingen, met transposonmutanten van stafylokokken, op dat initiële hechting aan biomateriaaloppervlakte via celwand-eiwitten en de daaropvolgende productie van de biofilm door aparte genclusters worden aangestuurd. Zo werden transposonmutanten verkregen, deficiënt in celwand-eiwitten, die niet meer konden hechten maar nog wel in staat waren een biofilm te produceren, en mutanten die een gencluster misten dat later het *ica*-cluster (intercellulair adhesine) is genoemd, die wel konden hechten maar geen biofilm meer vormden.^{6,7} Voor de initiële hechting aan biomateriaaloppervlak bleek een eiwit met een molecuulgewicht van 60 kilodalton cruciaal, voor de opbouw van de biofilm (fasen C, D en E) is het *ica*-gencluster essentieel; het genproduct is een polysaccharidecomplex, dat de naam PIA (polysaccharide intercellular adhesin) heeft gekregen. Naast PIA bleek ook een extracellulair eiwit met een molecuulgewicht van 140 kilodalton onontbeerlijk voor de productie van een biofilm door CNS-stammen na hechting aan biomateriaal.⁸ Het is voorstelbaar dat na het tot stand komen van initiële hechting door eiwitachtige adhesines, deze eiwitten vervolgens als een soort anker dienen voor de polysaccharidecomplexen die uiteindelijk de biofilm gaan vormen. Hoewel voor de initiële hechting ook een polysaccharide adhesine (PS/A, voor polysaccharide adhesin) is beschreven⁹, bleek achteraf dat dit PS/A evenals PIA een product is van het *ica*-gencluster en dat het bovendien qua structuur sterk overeenkomt met PIA.¹⁰ Hechting en de daarop volgende biofilmvorming zijn processen die waarschijnlijk snel en vloeiend in elkaar overgaan, zodat het niet verwonderlijk is dat aanvankelijk ook een polysaccharide als adhesine werd geïdentificeerd. Hechting en de formatie van de biofilm voltrekken zich inderdaad in een rap tempo; binnen enkele minuten hebben de eerste bacteriën zich

Figuur 4. Lineair en in clusters gerangschikte hechtingsfactoren voor polystyreen van *S. epidermidis* aangetoond in een celwandpreparaat door middel van met goud gemerkte antistof tegen deze hechtingsfactor. Balk: 200 nanometer (Uit: Veenstra CJC, et al. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 1996;178:537-41).



gehecht en binnen 12 uur heeft zich een dikke biofilm op het biomateriaaloppervlak gevormd.¹¹ Het genetisch onderzoek door de groep van Götz leverde tevens op dat één van de eiwitten betrokken bij de initiële hechting van CNS aan het biomateriaaloppervlak waarschijnlijk een autolysine of celwandhydrolase is, d.w.z. een enzym betrokken bij de 'turnover' en 'recycling' van peptidoglycaan, de belangrijkste component van de Gram-positieve celwand.¹² Dat een autolysine betrokken is bij hechting aan oppervlakken lijkt een op het eerste gezicht merkwaardige bevinding, maar een dergelijke associatie is al eerder vastgesteld bij enkele notoir pathogene bacteriën, zoals pneumokokken en *Listeria monocytogenes*. Het is voorstelbaar dat een dergelijke autolysine-activiteit de celwand meer permeabel maakt voor transport van binnen naar buiten van producten als eiwit- en polysaccharidecomplexen noodzakelijk voor hechting en biofilmvorming. Van de eiwit- en polysaccharidecomplexen van CNS betrokken bij de hechting aan biomaterialen vertonen sommige een wat bredere verspreiding onder CNS-stammen^{8,9,13}, andere blijken stamspecifiek te zijn.^{4,14} Gezien deze feiten - enerzijds de variëteit aan eiwitten op het oppervlak van CNS die betrokken kunnen zijn bij de initiële hechting aan biomaterialen, anderzijds de brede verspreiding van sommige van deze factoren, zoals de polysacchariden betrokken bij de biofilmformatie - is het voorstelbaar dat er onder de rijke collectie

aan CNS-stammen van de individuele gastheer er altijd wel een aantal zullen zijn die, gezien hun adhesine-fenotype, in staat zijn te hechten aan het biomateriaal dat bij de gastheer wordt geïmplanterd en zodoende dit te koloniseren. Voor een behoud van het overzicht zijn de stafylokokken-componenten waarvan is vastgesteld dat ze een rol spelen bij hetzij initiële hechting, hetzij opbouw van de biofilm, kort samengevat in tabel 1, met de hun toebedeelde rol in het proces van kolonisatie van biomaterialen.

Tabel 1. Celwandcomponenten van stafylokokken betrokken bij hechting aan biomaterialen en biofilmproductie

PROCES	COMPONENTEN
Primaire hechting	eiwitten: 60 kDa* ⁶
	polysaccharide: PS/A ⁹
Accumulatie, microkolonie	eiwit 140 kDa ⁸
Biofilmproductie	polysaccharide: PIA ^{6,7}

* kDa: kilodalton (molecuulgewicht)

De snelheid waarmee dit proces van kolonisatie, met name ook de vorming van een biofilm, plaatsvindt, wordt nog eens onderstreept door de waarneming dat *alle* intravasculaire katheters verwijderd uit patiënten bij scanning-elektronen-microscopisch onderzoek een biofilm blijken te vertonen, ook als zij slechts één dag *in situ* waren geweest!¹⁵ Deze kolonisatie bleek ook onafhankelijk van of er bij de patiënt een infectie was opgetreden, dus er is duidelijk geen kwalitatieve relatie tussen het voorkomen van een biofilm en het risico van optreden van een katheter-geassocieerde infectie.¹⁵⁻¹⁹ Ook bleek er geen kwantitatieve relatie, d.w.z. sterker gekoloniseerde katheters leverden geen groter risico op voor een katheter-geassocieerde infectie.¹⁵ Kortom, wat nu precies het optreden van een infectie bepaalt is, ondanks de toegenomen kennis van de biologie en pathogenese van infecties geassocieerd met biomaterialen, nog steeds een mysterie.

Rol biomateriaal

Er zijn minstens twee manieren waarop biomaterialen de pathogenese van ermee geassocieerde infecties kunnen beïnvloeden: door de mate van hechting van bacteriën aan hun oppervlak en door hun effecten op de afweer (dit laatste aspect wordt binnenkort besproken in een artikel van Zaat en Dankert.

In welke mate de aard van het biomateriaal de adhesie bepaalt is nog steeds onduidelijk, ondanks dat hier veel onderzoek aan gewijd zijn geweest, zowel *in vitro* als in proefdiermodellen. De grote verscheidenheid aan opstellingen en keuze van bacteriële isolaten maakt het trekken van conclusies ten aanzien van de rol van het biomateriaal moeilijk. Echter, de algemene tendens die uit deze onderzoeken naar voren komt is dat hydrofobiciteit van het materiaal adhesie bevordert en dat metalen (titanium, staal, kobalt, chroom) meer resistent zijn tegen bacteriële hechting dan polymeren. Biomaterialen zullen na implantatie vrij snel worden bekleed met allerlei eiwitten (complement, stollingseiwitten, extracellulaire-matrixeiwitten) die van invloed zijn op de adhesie van bacteriën. Zo heeft *Staphylococcus aureus* in het algemeen een groter vermogen tot hechting aan bijvoorbeeld extracellulaire-matrixeiwitten dan CNS, maar ook wat dit betreft bleken er

individuele verschillen tussen stammen te bestaan.²⁰ Hoe groot de invloed van deze plasma- en matrixeiwitten is, bleek uit een studie van Vaudaux et al.²¹ Verschillende stafylokokken-stammen bleken *in vitro* veel beter te hechten aan katheters die uit patiënten waren verwijderd dan aan 'natieve', ongebruikte katheters; deze versterkte hechting correleerde met depositie van fibrine en fibronectine op de uit patiënten verwijderde katheters.

Aan de andere kant is echter vastgesteld dat plasma en serum, met name albumine, de hechting van stafylokokken aan natieve katheters kunnen remmen, waarschijnlijk door neutralisatie van hydrofobiciteit van het biomateriaaloppervlak.

Biofilmbacteriën en antibioticaresistentie

Het is een fascinerend fenomeen dat infecties geassocieerd met biomaterialen buitengewoon resistent blijken te zijn tegen antibiotische behandeling. Dit correleert met een in een aantal onderzoeken ondubbelzinnig vastgestelde hoge mate van resistentie van sessiele (biofilm-) bacteriën tegen antibiotica, ondanks het feit dat de planktonische (suspensie-) vorm van dezelfde stam gevoelig bleek voor het geteste antibioticum.²²⁻²⁴ Deze verhoogde resistentie van biofilmbacteriën tegen antibiotica heeft klaarblijkelijk te maken met het vermogen een biofilm te vormen; een mutant die nog wel kon hechten, maar deficiënt was in biofilmproductie, ontwikkelde niet de typische antibiotische resistentie van de biofilmpositieve ouderstam.²⁵ Tevens wordt de resistentie sterk bepaald door de leeftijd van de biofilm, d.w.z. hoe te ouder de biofilm, hoe meer resistent.²⁶

De algemene opvatting is dat de hoge mate van antibiotische resistentie die bacteriën in biofilms vertonen vooral berust op fysiologische veranderingen die optreden in deze micro-organismen met het toenemen van de leeftijd van de biofilm. Alhoewel een verminderde penetratie van antibiotica in biofilms kan bijdragen aan dit fenomeen van verhoogde resistentie, wordt de betekenis hiervan minder belangrijk geacht.²⁷⁻²⁹ Binding van het antibioticum door biofilmcomponenten met als gevolg inactivatie kan ook bijdragen aan resistentie van biofilmbacteriën.³⁰

De aard van de fysiologische veranderingen die tot antibiotische resistentie leiden is waarschijnlijk complex. Een aantal van deze veranderingen is samengevat in tabel 2. In 'oudere' biofilms én dieper in de biofilm is de stofwisseling van bacteriën laag tot nihil, onder meer door een gebrek aan voedingsstoffen.

Tabel 2. Oorzaken van verhoogde antibiotische resistentie van bacteriën in biofilms

- trage groei
- verlaagd metabolisme
- verminderde opname/permeabiliteit
- 'trapping' van antibiotica in biofilm (door exopolysacchariden)
- geïmmobiliseerd bètalactamase
- inductie van veranderingen in buitenmembraaneiwitten

Dit leidt tot een (sterke) verlaging van de groeisnelheid en een verminderde 'turnover' en synthese van allerlei vitale componenten, zoals nucleïnezuren, eiwitten en celwandbestanddelen; deze reactie van bacteriën, die vooral optreedt door gebrek aan aminozuren, wordt "stringent response" genoemd.³¹ Bacteriële cellen krimpen tot wat een 'ultramicro'-vorm wordt genoemd, vergelijkbaar met het proces van

sporevorming, waarbij stoffen gegenereerd tijdens deze respons actief de ribosomale eiwitsynthese remmen. Deze cellen zijn zeer resistent tegen antibiotica. Niet alleen draagt de verlaagde groeisnelheid op zich al fors bij aan de antibiotische resistentie, ook de verlaagde eiwitsynthese met als gevolg verlaagde aanmaak van celwandbestanddelen maakt dat bijvoorbeeld de werkzaamheid van antibiotica die hierop aangrijpen, zoals aminoglycosiden (ribosoom) en bètalactams (celwandsynthese) sterk daalt.

Tevens zijn een aantal specifieke veranderingen vastgesteld die bijdragen aan resistentie. Zo werd vastgesteld dat in biofilmcellen van *Pseudomonas aeruginosa* de productie van bètalactamase kon worden geïnduceerd die blijkbaar gebonden bleef aan de biofilm, waardoor een additionele barrière voor bètalactams werd gecreëerd.³² Een andere belangrijke barrière tegen antibiotica van deze bacterie wanneer hij zich in een biofilm bevindt is verminderde permeabiliteit. Dit laatste is geassocieerd met veranderingen in de buitenmembraan en kan soms op verrassende manier tot stand worden gebracht, zoals Martinez et al. onlangs aantoonde. Deze onderzoekers vonden dat eluaten van gesiliconeerde urinekatheters resistentie tegen imipenem induceerden in *P. aeruginosa* doordat zij veranderingen in de buitenmembraaneiwitten teweegbrachten.³³

Zo ontstaat er dus een complex beeld van veranderingen in bacteriën in een biofilm die alle kunnen en zullen bijdragen aan de (sterk) verhoogde antibiotische resistentie die zo karakteristiek is voor de biofilm.

Vergeleken met dit sombere beeld van algemene resistentie van biofilmbacteriën tegen antibiotica is de situatie ten aanzien van effecten van antibiotica op primaire hechting en de biofilmproductie iets gunstiger. Zowel voor CNS als voor *P. aeruginosa* is aangetoond dat primaire adhesie en biofilmproductie worden geremd door antibiotica.^{33,34,35} Van deze laatste bevindingen is gebruik gemaakt door biomaterialen te impregneren met verschillende antibiotica, om zodoende kolonisatie te remmen.³⁶ De gunstige resultaten die hiermee werden bereikt hebben geleid tot toepassing van gecoatde katheters in patiënten, voornamelijk met redelijk succes.^{37,38} Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de resultaten die zijn behaald met gecoatde katheters en commentaar hierop wordt verwezen naar een artikel over katheter-gerelateerde infecties in een volgende uitgave.

De boodschap die uit deze onderzoeken naar voren komt is dat in de vroege fase van kolonisatie van biomaterialen, globaal de eerste twee dagen, antibiotica dit proces nog kunnen remmen, maar dat als de biofilm zich na enige dagen heeft gevestigd, antibiotica geen effect meer hebben. Dus de enige effectieve behandeling van biomateriaal-geassocieerde infecties met antibiotica is te verwachten in de eerste dagen, of door de toepassing van biomaterialen waarin antibiotica zijn geïncorporeerd, zoals bij katheters en orthopedische implantaten.

Conclusie

Infecties geassocieerd met biomaterialen zijn een teken des tijds. In de moderne geneeskunde is het gebruik van bio-

materialen niet meer weg te denken en zal het nog verder toenemen. Infecties zijn een uiteraard ongewenst maar onvermijdelijk 'bijproduct' van het toepassen van deze materialen. De kennis van de biologie en de pathogenese van deze infecties is gedurende de laatste tien jaar sterk toegenomen. Centraal in dit proces van kolonisatie van biomaterialen staat het vermogen van bepaalde bacteriën, met name coagulase-negatieve stafylokokken (CNS) om aan deze materialen te hechten. De primaire hechting wordt hierbij tot stand gebracht door oppervlakte-eiwitten, waarna de productie start van een biofilm, die vooral bestaat uit polysaccharidecomplexen. Verder is gebleken dat biomaterialen direct na implantatie worden gekoloniseerd, zeker als zij worden ingebracht via een besmet gebied, zoals huid of urethra. Op termijn zal deze toegenomen kennis tot gevolg moeten hebben dat preventie en behandeling van deze infecties effectiever worden. Voornamelijk zijn de enige vruchten die worden geplukt van dit betere inzicht de redelijk succesvolle profylactische toepassing van biomaterialen waarin antibiotica zijn opgenomen.

Summary

Planktonic bacteria, e.g. free floating in suspension, are relatively vulnerable and susceptible to all kinds of environmental hazards. In contrast, the sessile, adherent bacterial cell, particularly when embedded in a biofilm, is much less vulnerable and occasionally even extremely resistant. The biofilm is one of the most characteristic aspects of adherent bacterial populations and primarily composed of polysaccharide complexes, often called "extracellular slime substance" (ESS). Adhesion of bacteria to a surface, the subsequent formation of a microcolony and the production of the biofilm are sequential events governed by separate gene complexes. Intravascular catheters are inserted through a contaminated surface (the skin), but even during implantation of prosthetic joints or heart valves in an operating theatre contamination of the surgical area with skin commensals will be unavoidable. Bacterial colonization will result in a biofilm covering the biomaterial surface and this may cause a biomaterial-related infection any time in the future. The fact that these infections are usually caused by skin commensals, notably coagulase-negative staphylococci, is a logical consequence of these procedures. Bacteria encased in biofilms are rather resistant against all kinds of external influences, and antibiotic resistance is indeed a characteristic feature of biomaterial-related infection.

Intensive study during the last decade has considerably increased our understanding of the biology of bacterial adhesion and ensuing biofilm formation as well as our knowledge of the physiology of bacterial cells inside a biofilm "community". This will hopefully result in better and more effective strategies for prevention and therapy of biomaterial-related infections in the near future.

Dr. A. Fleeer, arts-microbioloog, Wilhelmina Kinderziekenhuis, Universitair Medisch Centrum KC 02.069.1, Postbus 85090, 3508 AB Utrecht

Literatuur

- Brown E, Wenzel RP, Hendley WO. Exploration of the microbial anatomy of the normal human skin by using plasmid profiles of coagulase-negative staphylococci; search for the reservoir of resident skin flora. *J Infect Dis* 1989;160:644-50.
- Hogt A, Dankert J, Hulstaert CE, Feijen J. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly (ethylenepropylene). *Infect Immun* 1986;51:294-301.
- Pascual A, Fleeer A, Westerdal NAC, Verhoef J. Modulation of adherence of coagulase-negative staphylococci to teflon catheters *in vitro*. *Eur J Clin Microbiol* 1986;5:518-22.
- Timmerman CP, Fleeer A, Besnier JM, De Graaf L, Cremers F, Verhoef J. Characterization of a proteinaceous adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect Immun* 1991;59:4187-92.
- Veenstra GJC, Cremers FFM, Van Dijk H, Fleeer A. Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of *Staphylococcus epidermidis*. *J Bacteriol* 1996;178:537-41.
- Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Götz F. Characterization of Tn917 insertion mutants of *Staphylococcus epidermidis* affected in biofilm formation. *Infect Immun* 1996;64:277-82.
- Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 1996;20:1083-91.
- Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, Perderau-Remington F, Peters G. A 140-kilodalton extracellular protein is essential for accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infect Immun* 1997;65:519-24.
- Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, Pier GB. Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin from *Staphylococcus epidermidis*. *J Infect Dis* 1988;157:713-22.
- McKenney D, Hübner J, Muller E, Wang Y, Goldmann DA, Pier GB. The *ica* locus of *Staphylococcus epidermidis* encodes production of the capsular polysaccharide adhesin. *Infect Immun* 1998;66:4711-20.
- Herrmann M, Peters G. Catheter-associated infections caused by coagulase-negative staphylococci: clinical and biological aspects. In: Catheter-related infections, Seifert H, Jansen B, Farr BM, eds. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong. 1997:79-109.
- Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin-mediated attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 1997;24:1013-24.
- Muller E, Takeda S, Shiro H, Goldmann D, Pier GB. Occurrence of capsular polysaccharide adhesin among clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *J Infect Dis* 1993;168:1211-8.
- Timmerman CP, Besnier JM, de Graaf L, et al. Characterisation and functional aspects of monoclonal antibodies specific for surface proteins of coagulase-negative staphylococci. *J Med Microbiol* 1991;35:65-71.
- Raad I, Costerton JW, Sabbarwal U, Sacilowski M, Anaissia E, Bodey GP. Ultrastructural analysis of indwelling catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 1993;168:400-7.
- Marrie TJ, Costerton JW. Scanning and transmission electron microscopy of *in situ* bacterial colonization of intravenous and intra-arterial catheters. *J Clin Microbiol* 1984;19:687-93.
- Marrie TJ, Noble MA, Costerton JW. Examination of the morphology of bacteria adhering to peritoneal dialysis catheters by scanning electron microscopy. *J Clin Microbiol* 1983;18:1388-98.
- Passerini L, Costerton JW, King EG. Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med* 1992;20:665-73.
- Cheesbrough JS, Elliott TSJ, Finch RG. A morphological study of bacterial colonisation of intravenous cannulae. *J Med Microbiol* 1985;19:149-57.
- Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, et al. Fibronectin, fibrinogen and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis* 1988;158:693-701.
- Vaudaux PE, Pittet D, Haeberli A, et al. Host factors selectively increase staphylococcal adherence on inserted catheters: a role for fibronectin and fibrinogen/fibrin. *J Infect Dis* 1989;160:865-75.
- Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW. Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:619-24.
- Vergeres P, Blaser J. Amikacin, ceftazidime, and flucloxacillin against suspended and adherent *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* in an *in vitro* model of infection. *J Infect Dis* 1992;165:281-9.
- Chuard C, Vaudaux PE, Waldvogel FA, Lew DP. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:625-32.
- Schwank S, Rajacic Z, Zimmerli W, Blaser J. Impact of bacterial biofilm formation on *in vitro* and *in vivo* activities of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:895-8.
- Anwar H, Costerton JW. Enhanced activity of combination of tobramycin and piperacillin for eradication of sessile biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1666-71.
- Dunne WM, Mason EO, Kaplan SL. Diffusion of rifampin and vancomycin through a *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:2522-6.
- Darouiche RO, Dhir A, Miller AJ, Landon GC, Raad II, Musher DM. Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis* 1994;170:720-3.
- Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2517-22.
- Farber BF, Kaplan MH, Clogston AG. *Staphylococcus epidermidis* extracted slime inhibits the antimicrobial action of glycopeptide antibiotics. *J Infect Dis* 1990;161:37-40.
- Gilbert P, Collier PJ, Browne MRW. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1865-8.
- Giwerzman B, Tvenstrup Jensen E, Hoiby N, Kharazami A, Costerton JW. Induction of β -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:1008-10.
- Martinez-Martinez L, Pascual A, del Carmen Conejo M, Picabea L, Perea EJ. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem induced by eluates from siliconized latex urinary catheters is related to outer membrane protein alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:397-9.
- Dunne WM. Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin or cefamandole on biofilm production by coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:390-3.
- Yassien M, Khardori N, Ahmedy A, Toama M. Modulation of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* by quinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2262-8.
- Raad I, Darouiche R, Hachem R, Sacilowski M, Bodey GP. Antibiotics and prevention of microbial cocolonization of catheters. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2397-400.
- Raad I, Darouiche R, Dupuis J, et al. Central venous catheters coated with minocycline and rifampin for the prevention of catheter-related colonization and bloodstream infections: a randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med* 1997;127:267-74.
- Darouiche RO, Raad II, Heard SO, et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. *N Engl J Med* 1999;340:1-8.

(Kleine) dilemma's in de geneeskunde

Nierbekkenontsteking: keuze voor het individu of voor de maatschappij

A.I.M. HOEPELMAN

Resistentie tegen antimicrobiële middelen is een grote bedreiging voor de gezondheidszorg. De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) heeft de strijd hiertegen dan ook gemaakt tot één van haar belangrijkste speerpunten voor de komende eeuw.

Trefwoorden: antimicrobiële resistentie, epidemiologie

Wereldwijd en ook in Nederland is er bij bacteriën sprake van een duidelijke toename van resistentie tegen antimicrobiële middelen.^{1,2} Vele factoren dragen bij tot deze toename, maar alhoewel niet onomstotelijk bewezen, lijkt ook antibioticumgebruik door patiënten bij te dragen aan deze ontwikkeling.^{1,2} Het op juiste indicatie voorschrijven is dus van eminent belang. In Nederland hanteren we het uitgangspunt dat het verstandig is om een antibioticum met een zo smal mogelijk spectrum te gebruiken om de antibiotische druk zoveel mogelijk te beperken.

Urineweginfecties (UWI) komen frequent voor. In de huisartsenpraktijk bedraagt de incidentie 30 tot 40 per 1.100 patiënten per jaar. Het betreft meestal ongecompliceerde urineweginfecties, maar ook nierbekkenontsteking (acute pyelonefritis) komt met een incidentie van 3,1 per 1.000 vrouwen per jaar regelmatig voor.

De discussie over de vraag welke antibiotica de voorkeur verdienen bij de behandeling van urineweginfecties valt op uiteenlopende wijze te benaderen. Onderzoeken naar de effectiviteit van diverse antibiotica bij urineweginfecties laten een zeer goede effectiviteit zien met weinig onderlinge effectiviteitsverschillen.³ Bij de keuze van een antibioticum voor urineweginfecties spelen gegevens over de gevoeligheid van de verwekkers een toonaangevende rol. Hierbij wordt meestal gekeken naar de gevoeligheid van de meest voorkomende verwekker van UWI, *E. coli*.

De resistentie van *E. coli* en andere uropathogenen neemt de laatste jaren toe. Een recentelijk gepubliceerd Amerikaans onderzoek toont aan dat er in de jaren 1992 tot 1996 een significante toename was van resistentie bij isolaten van vrouwen met een ongecompliceerde infectie.⁴ Voor ampicilline steeg het percentage resistente stammen in deze periode van 29 naar 38 procent (voor *E. coli* alleen van 26 naar 34 procent), voor trimethoprim van 9 naar 16 procent (voor *E. coli* van 9 naar 18 procent) en voor het combinatiepreparaat co-trimoxazol van 8 naar eveneens 16 procent (voor *E. coli* van 9 naar 18 procent). Deze percentages zijn vergelijkbaar met de Nederlandse gegevens. In het Universitair Medisch Centrum Utrecht steeg het percentage co-trimoxazol resistente *E. coli* van 17 naar 28 en voor de poliklinische patiënten van 20 naar 25. Cijfers van het RIVM tonen aan dat momenteel 26 procent (n = 21.336) van de *E. coli* geïsoleerd in de urine ongevoelig is voor co-trimoxazol, tegen 8 procent van de isolaten aangetroffen

in de feces van de open populatie (overeenkomend met het resistentiepercentage van 10 bij *E. coli* uit de urine van niet eerder behandelde patiënten).⁴

In de VS maar zeker ook in Nederland verloopt de keuze voor geneesmiddelen zoveel mogelijk volgens het 'evidence based medicine'-principe. Voor veel ziektebeelden worden op grond hiervan richtlijnen gemaakt. In de Verenigde Staten is co-trimoxazol jarenlang het middel van keuze geweest voor de behandeling van acute pyelonefritis, op grond van het feit dat de beste onderzoeken met dit geneesmiddel zijn uitgevoerd. In de NHG-Standaard voor de huisarts wordt geadviseerd om bij een gecompliceerde urineweginfectie te kiezen voor amoxicilline/clavulaanzuur gedurende 10 dagen, of voor (met name bij overgevoeligheid) co-trimoxazol 2 dd 960 mg gedurende 10 dagen. In de recente CBO-consensus wordt gekozen voor of een parenteraal cefalosporine, amoxicilline/clavulaanzuur of een chinolon.

Onlangs toonden Talan et al. in een Amerikaanse populatie twee belangrijke zaken aan:⁵

- een 7-daagse therapie met ciprofloxacine is effectiever dan een 14-daagse therapie met co-trimoxazol bij vrouwen met een acute ongecompliceerde pyelonefritis;
- bij de met co-trimoxazol behandelde vrouwen is het resultaat van de therapie afhankelijk van de gevoeligheid van *E. coli* voor het gebruikte geneesmiddel (effectiviteit 96 procent vs. 50 procent, 95 procent betrouwbaarheidsinterval voor het verschil 0,15-0,77, P-waarde < 0,001; bij respectievelijk gevoelige en ongevoelige stammen).

Deze laatste bevinding is met name interessant omdat er maar weinig onderzoeken op het gebied van de infectieziekten bestaan waarin zo duidelijk een relatie tussen gevoeligheid van het geïsoleerde micro-organisme en uitkomst van de therapie wordt aangetoond.

Naar aanleiding van het onderzoek van Talan wordt dan ook terecht geconcludeerd dat ciprofloxacine het middel van keuze is voor de orale behandeling van een acute ongecompliceerde nierbekkenontsteking. En ingesteld op *evidence based medicine* als het land is, wordt in de meest recente richtlijnen van de IDSA (Infectious Diseases Society of America) geadviseerd om bij een nierbekkenontsteking de therapie te starten met een fluorochinolon en bij bewezen gevoeligheid over te gaan op co-trimoxazol.³

Algemeen wordt aangenomen dat toename in gebruik van een antibioticum leidt tot een toename van resistentie, zoals ook blijkt uit de gegevens van een eerder aangehaald Amerikaans onderzoek. Maar ook recent onderzoek van eigen bodem toont dit opnieuw aan.²

Moeten we er dus nu op grond van de meest recente gegevens voor kiezen om alle patiënten met verdenking op een nierbekkenontsteking te behandelen met een chinolon zoals ciprofloxacine?

Aan deze strategie kleven nogal wat nadelen:

1. het percentage chinolon-ongevoelige micro-organismen zal ongetwijfeld stijgen²;
2. het middel is aanzienlijk duurder dan co-trimoxazol of amoxicilline/clavulaanzuur;
3. het middel wordt onveranderd uitgescheiden en blijft in het milieu achter;
4. het middel heeft een breder werkingsspectrum dan de meeste andere geneesmiddelen voor urineweginfecties en geeft dus een grotere selectiedruk.

Aan de andere kant:

1. is het een zeer actief geneesmiddel;
2. kan het oraal worden ingenomen;
3. wordt het zeer goed verdragen;
4. is het effectief gebleken bij orale behandeling van nierbekkenontsteking;
5. hoeft het maar zeven dagen te worden ingenomen, in tegenstelling tot 14 dagen voor de andere geneesmiddelen.

De eerste groep argumenten is vanuit populatie en maatschappelijk oogpunt ongewenst, terwijl vanuit het individu redenerend de tweede groep argumenten als zeer positief wordt ervaren.

Dit alles is een lastige keuze voor de dokter achter zijn bureau.

Dankzegging: De auteur wil Prof. dr. J. Verhoef en dr. H.J. de Neeling danken voor het kritisch doorlezen van het manuscript.

Prof. dr. A.I.M. Hoepelman, internist, Universitair Medisch Centrum, Afd. Interne Geneeskunde F.01.126, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht

Literatuur

1. Gupta K, Scholes D, Stamm WE. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *JAMA* 1999;281:736-8.
2. Goettsch W, van Pelt W, Nagelkerke N, et al. Increasing resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* from urinary tract infections in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:223-8.
3. Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ, Stamm WE. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis* 1999;29:745-58.
4. De Neeling J, de Jong J, Overbeek BP, de Bruin RW, Dessens-Kroon M, van Klingeren B. Kwantitatief gevoeligheidsonderzoek met intra- en extramurale isolaten van *Escherichia coli*. RIVM 1999. Rapport nr. 359001002.
5. Talan DA, Stamm WE, Hooton TM, et al. Comparison of ciprofloxacin (7 days) and trimethoprim-sulfamethoxazole (14 days) for acute uncomplicated pyelonephritis in women: a randomized trial. *JAMA* 2000;283(12):1583-90.

Melding infectieziekten door artsen-microbioloog

Eenvoudiger toepassing verplichtingen voortvloeiend uit de infectieziektewet voor huisartsen en medisch specialisten

J.H.T.C. VAN DEN KERKHOF, J.K. VAN WIJNGAARDEN, W.L.M. RUIJS

In 1999 is de nieuwe Infectieziektewet geïntroduceerd. Naar aanleiding hiervan heeft een werkgroep van het Landelijk Overleg Infectieziektenbestrijding mede in opdracht van de Inspectie voor de Gezondheidszorg een advies uitgebracht met betrekking tot zowel een kwalitatieve als kwantitatieve verbetering van de wettelijk verplichte melding. De in dit artikel beschreven handelswijze maakt onderdeel uit van dit advies. Er wordt ingegaan op juridische achtergronden en voorwaarden waaronder de arts-microbioloog een (voor)aanmelding mag doen van B-ziekten. Dit wordt geformaliseerd met een machtigingsovereenkomst. Een model voor een dergelijke overeenkomst is opgenomen.

Trefwoorden: infectieziektewet, meldingsplicht

In april 1999 is de Infectieziektewet in werking getreden als opvolger van de oude Wet Bestrijding Infectieziekten en Opsporing Ziekteoorzaken (WBIOZ). Deze oude wet was reeds vele malen bijgesteld, en voldeed niet meer aan de eisen van de tijd. De infectieziektewet regelt de melding van een aantal infectieziekten aan de overheid en beschrijft de maatregelen die de overheid kan nemen om verspreiding te voorkomen. De lijst van ziekten waarop de wet van toepassing is, is kritisch geëvalueerd, waarbij het individuele belang van bescherming van de privacy is afgewogen tegen het publieke belang van bescherming van de volksgezondheid in bredere zin. Dit criterium is leidend geweest bij vaststelling van de nieuwe lijsten waardoor deze korter zijn geworden, en tevens zijn de filosofie en meldingsmethodiek rond groep-C-meldingen ingrijpend gewijzigd. De zogenaamde A-, B- en C-ziekten staan in tabel 1 vermeld. Groep C wordt primair niet door de behandelaar maar door de arts-microbioloog gemeld.

Tabel 1. Lijst meldingsplichtige ziekten

A-ziekten	Paratyfus A,B en C
Kinderverlamming	Pest
	Tuberculose
B-ziekten	Virale hemorrhagische koorts
Bacillaire dysenterie	Vlektyfus
Botulisme	Acute voedselvergiftiging of
Buiktyfus	- infectie
Cholera	
Difterie	C-ziekten
Febris recurrens	Brucellose
Hepatitis-A	Gele koorts
Hepatitis-B	Leptospirose
Hepatitis-C	Malaria
Hondsdolheid	Miltvuur
Kinkhoest	Ornithose / psittacose
Legionellose	Q-koorts
Mazelen	Rodehond
Meningokokkose	Trichinose

De wettelijke meldingsplicht, in de terminologie van de oude wet 'aangifteplicht', is altijd gekenmerkt geweest door een min of meer ernstige mate van onderrapportage. Dit fenomeen baart zowel de Inspectie voor de Gezondheidszorg (IGZ) als het Landelijk Overleg Infectieziekten (LOI)* ernstige zorgen. De melding zoals omschreven in de Infectieziektewet is bedoeld om interventies mogelijk te maken ter voorkoming van verdere verspreiding van (infectie)ziekten, en is expliciet *niet* bedoeld voor louter registratie en epidemiologie. De wetgever is van mening dat het belang van epidemiologisch inzicht in infectieziekten op een andere wijze moet worden gewaarborgd. Dit is ook de reden dat in de nieuwe wet beter dan voorheen verankerd is dat de melding aan de GGD moet worden gedaan. Dit in tegenstelling tot de oude wet, waarbij aan een rijksinstantie werd gemeld die in feite alleen bewaakt; de GGD kan direct maatregelen nemen.

In 1999 is in opdracht van het LOI een werkgroep ingesteld met als opdracht aanbevelingen te doen voor verbetering van deze melding, zowel in kwalitatieve als in kwantitatieve zin. Met de invoering van de nieuwe wet zijn de GGD's primair belast met het toezicht op de meldingsplicht (art. 26 lid 2 Infectieziektewet). Een aantal aanbevelingen van deze werkgroep zijn gericht op het bevorderen van het meldingsproces. Deze aanbevelingen zijn geformaliseerd in de (concept)richtlijn 'Toezicht op de meldingsplicht infectieziekten'. De hierna beschreven werkwijze met betrekking tot het melden is een belangrijk element in de richtlijn. Zij kan door alle behandelaars in Nederland worden toegepast.

* Het Landelijk Overleg Infectieziekten is de beleidsvormende vergadering van de Landelijke Coördinatiestructuur Infectieziektenbestrijding (LCI). Deze structuur is in 1995 gevormd naar aanleiding van de evaluatie van de polio-epidemie van 1992/1993. Zij voorziet in de behoefte van coördinatie van regio-overschrijdende inzet van GGD's, is ook verantwoordelijk voor protocolontwikkeling en rapporteert aan het Ministerie van VWS. In het overleg zijn de GGD's, het RIVM, de artsen-microbioloog en de IGZ vertegenwoordigd.

Makkelijker melden

De Infectieziektewet verplicht de arts die de diagnose stelt om hiervan binnen 24 uur melding te doen aan de directeur van de GGD (art. 4 Infectieziektewet). In de praktijk betreft het vaak relatief zeldzame aandoeningen waardoor melding in de drukte van alledag nogal eens vergeten wordt. Tevens is de melding soms tijdrovend en kunnen in de hectiek prioriteiten anders worden gelegd.

Om deze problemen te ondervangen is in overleg met artsen-microbioloog, juristen en de IGZ gezocht naar manieren om de administratieve belasting van de melding te verminderen en de kans dat deze daardoor vergeten wordt, te verkleinen. Het lijkt logisch om te onderzoeken in hoeverre de arts-microbioloog, die immers nauw betrokken is bij de diagnostiek van vele van de in dit kader relevante infectieziekten, bij het proces kan worden betrokken. De meldingsplicht kent een drietal categorieën:

- De enige A-ziekte, kinderverlamming, moet reeds bij vermoeden zo spoedig mogelijk worden gemeld, dus eigenlijk moet er bij iedere laboratoriumaanvraag voor poliovirus een telefoontje naar de GGD worden gepleegd. U belt dan bij voorkeur niet met de directeur maar met de arts infectieziektenbestrijding.
- Voor de B-ziekten geldt dat de arts die de diagnose stelt meldingsplichtig is. De diagnose wordt mede in het laboratorium gesteld, waarbij de interpretatie van de laboratoriumgegevens door de arts-microbioloog in combinatie met de klinische gegevens tot een definitieve conclusie leiden.
- Voor de C-ziekten geldt dat de melding bij wet is toegevoegd aan de arts-microbioloog. Omdat de wetgever bij deze ziekten het brede belang van de volksgezondheid in het kader van de bestrijding minder groot achtte in relatie tot het patiëntenbelang van de privacy, is dit een anonieme melding geworden - een anonimiteit die alleen met toestemming van de patiënt kan worden opgeheven.

De voorgestelde stroomlijning die hierna verder wordt uitgewerkt betreft de melding van B-ziekten en gaat uit van een samenwerking tussen arts-microbioloog, GGD en behandelend arts. Het proces gaat als volgt in zijn werk:

Bij een positieve laboratoriumbevinding van een meldingsplichtige aandoening in groep B doet de arts-microbioloog een vooraanmelding van de betrokken aandoening aan de directeur van de GGD (lees: arts infectieziekten). Op de uitslag van het onderzoek wordt schriftelijk gemeld dat een dergelijke vooraanmelding bij de GGD is gedaan. Op basis van deze vooraanmelding neemt de arts infectieziekten contact op met de hoofdbehandelaar voor verdere gegevens en overlegt over eventueel aanvullend onderzoek en/of interventies. Pas na dit contact kan een GGD-medewerker contact opnemen met betrokken patiënt voor aanvullende informatie, adviezen en/of voorlichting.

Is dit geoorloofd? De wettelijke basis

De wetgever legt de opdracht voor melding van de infectieziekte bij de behandelend arts, de hoofdbehandelaar. Deze kan echter een medebehandelaar machtigen tot het doen van een vooraanmelding. Van de verschillende mogelijkheden zoals delegeren, machtigen of mandateren is 'machtigen' in

dit geval de meest aangewezen juridische vorm in bestuursrechtelijke context. Voor een dergelijke handelwijze behoort een solide wettelijke basis te bestaan. Om misverstanden en misbruik te voorkomen is het van belang dat geformaliseerde schriftelijke afspraken worden gemaakt tussen betrokken partijen.

De wettelijke basis bestaat in het feit dat de arts-microbioloog, volgens de systematiek van de WGBO, bij het doen van de aanvraag voor onderzoek door de hoofdbehandelaar in consult is gevraagd. Op deze wijze maakt hij deel uit van de functionele eenheid, te weten het medisch behandelteam. Hij meldt gegevens waarvan hij krachtens zijn medebehandelaarschap kennis heeft naar aanleiding van een wettelijk voorschrift aan de GGD. De door hem te melden gegevens betreffen slechts een deel van de gegevens die volgens dit wettelijk voorschrift uiteindelijk ter kennis van de GGD mogen komen (zie tabel 2). Deze gegevensset bevat bij voorkeur identificerende data om onnodig en tijdrovend zoek door de medewerkers van de GGD bij de hoofdbehandelaar te voorkomen. Ervaring in de GGD-praktijk heeft geleerd dat het anoniem ter beschikking stellen van gegevens tot veel zinloos spuurwerk leidt dat zowel ergernis bij de behandelende sector alsook bij medewerkers van de GGD veroorzaakt. In dit proces komt vaak niet ter zake doende privacy-gevoelige informatie naar boven waardoor in de praktijk de privacy van de patiënt uiteindelijk met zo'n initieel anonieme benadering niet gediend is.

Tabel 2. Gegevens te verstrekken ingevolge artikel 5 Infectieziektewet vs. overeenkomst

VOLGENS ARTIKEL 5 INFECTIEZIEKTEWET	VOLGENS OVEREENKOMST
Naam	Naam
Voornaam	- (evt. initialen)
Adres	Adres
Woonplaats	Woonplaats
Geslacht	-
Geboortedatum	Geboortedatum
Verblijfplaats	-
Ziekte	Ziekteverwekker
Eerste ziektedag	-
Vaccinatioestand	-
Chemoprofylaxe	-
Bron / plaats besmetting	-
Datum vermoeden / vaststelling	Datum aanvraag
Wijze vaststelling ziekte / diagnose	-
Betrokken voedselproductieketen	-
Betrokken verzorging	-

De wetenschap dat er in een aantal gevallen een vooraanmelding wordt gedaan, ontslaat de hoofdbehandelaar echter niet van de verantwoordelijkheid tot het doen van de feitelijke melding. Dat wil zeggen dat als er om een of andere reden iets mis gaat met de (vooraan)melding door de arts-microbioloog, deze hiervoor niet aansprakelijk kan worden gesteld. De uiteindelijke verantwoordelijkheid blijft bij de behandelend arts liggen. Behalve op basis van een laboratoriumbevinding kan een infectieziekte namelijk ook op basis van een klinisch beeld of op epidemiologische gronden bij de GGD worden gemeld. Dit kan uiteraard niemand anders dan de hoofdbehandelaar doen.

Nadere afspraken

- Het is niet wenselijk dat de GGD op basis van de gegevens van de vooraanmelding contact opneemt met de patiënt. Laboratoriumgegevens zijn alleen betekenisvol in combinatie met het klinisch beeld. De GGD-medewerker dient dus eerst de diagnose te verifiëren bij de hoofdbehandelaar en met hem of haar te overleggen in hoeverre verder bron- en contactonderzoek en eventuele interventies mogelijk en gewenst zijn. Bovendien is het goed mogelijk dat de patiënt nog niet van de diagnose op de hoogte is, en het is onzorgvuldig dat kennis omtrent de diagnose in eerste instantie via de GGD bij de patiënt terechtkomt; de GGD-medewerkers zijn immers niet op de hoogte van de context en eventuele specifieke problematiek of gevoeligheden.
- Om één en ander te formaliseren is het zoals hiervoor reeds opgemerkt zorgvuldig om afspraken over deze machtiging te formaliseren met behulp van een tripartiete machtigingsovereenkomst. In deze overeenkomst machtigt de behandelend arts de medisch microbiologen die werkzaam zijn bij een met name genoemd laboratorium tot het doen van een vooraanmelding aan de directeur van de lokale GGD. De te melden gegevens worden in de overeenkomst limitatief opgesomd. Tevens worden in de overeenkomst afspraken gemaakt met betrekking tot de hiervoor besproken problemen (wie blijft uiteindelijk verantwoordelijk? neemt de GGD eerst contact op met de hoofdbehandelaar?).
- Omdat de melding een individuele verantwoordelijkheid is van de behandelend arts, kan een overeenkomst hierover in de zin zoals hier voorgesteld in principe niet door een vertegenwoordiger van een aantal artsen worden gesloten (denk aan een voorzitter van de District Huisartsen Vereniging, of een medisch directeur van een ziekenhuis), hoewel dit in organisatorische zin vele voordelen zou bieden. Wel is het mogelijk om te werken met een overeenkomst waar een lijst van namen is bijgevoegd, voorzien van bijbehorende parafen.
- Het is zorgvuldig om de procedure van de melding in het kader van de Infectieziektewet op te nemen in de patiëntenfolders van ziekenhuizen, groepspraktijken en GGD's.

Hierna vindt u een voorstel voor een tekst die u voor de overeenkomst zou kunnen gebruiken. Uiteraard kan hierop

worden gevarieerd, zij het dat het verstandig is om de geest van de overeenkomst niet aan te tasten, omdat dit aanleiding zou kunnen geven tot nieuwe en verwarrende discussies. De tekst is te downloaden vanaf de website van het LCI: www.lci.lcr.nl.

In de toekomst kan de melding van infectieziekten verder worden vereenvoudigd als bij elektronische dossiervorming een faciliteit wordt ingebouwd die bij vaststelling van een bepaalde diagnosecode automatisch een melding doet aan de GGD. Bovenstaande werkwijze wordt dan overbodig. Immers, ook laboratoriumuitslagen zullen dan elektronisch worden aangeleverd, zodat nauwelijks tijdverlies te verwachten is. Hoe lang we hier nog op moeten wachten verschilt per regio, maar tot die tijd biedt de bovenbeschreven procedure tijdswinst en een grotere kans op een meer volledige melding. Bovenbeschreven richtlijn is getoetst door de KNMG en door deskundigen in het gezondheidsrecht.

Summary

In 1999 a new act on infectious disease was introduced. Following this introduction, a working-party was instituted by the National Infectious Diseases Council. Their mandate was to advice on qualitative and quantitative means of improvement of the reporting system of infectious diseases. This paper describes the proposed procedure. Details are given on legal backgrounds and framework in which the clinical microbiologist is allowed to provide an early warning of a reportable disease to the public health service. In order to provide a legal basis a formal authorization is required. A suggested format for such an authorization is presented here.

Dankzegging aan Mr. L. van der Giessen, jurist Bestuurdienst regio Zuid-Holland Zuid.

Dr. J.H.T.C. van den Kerkhof, arts infectieziekten, GGD Zuid-Holland Zuid, Korte Parallelweg 51, 3311 JN Dordrecht

Dr. J.K. van Wijngaarden, arts, Inspectie voor de Gezondheidszorg, Postbus 5837, 2508 DE Den Haag

Mw. dr. W.L.M. Ruijs, arts, Landelijke Coördinatiestructuur Infectieziektenbestrijding (LCI), Postbus 16071, 2500 BB Den Haag

Tekstvoorbeeld voor machtigingsovereenkomst

Machtiging

inzake melding als bedoeld in artikel 4 van de Infectieziektewet

De ondergetekenden:

I de heer / mevrouw <naam>, voorzitter van de medische staf van het <naam> Ziekenhuis, gevestigd te <adres, postcode, plaats>, handelend ter uitvoering van het besluit van de algemene vergadering van de medische staf van <datum> namens de artsen werkzaam in het <naam> Ziekenhuis, hierna te noemen: de behandelend arts

of de heer / mevrouw <naam>, voorzitter van de huisartsengroep (HAGRO) <naam>, gevestigd te <adres, postcode, plaats>, handelend ter uitvoering van het besluit van de HAGRO <naam>, namens de bij de HAGRO aangesloten artsen, hierna te noemen: de behandelend arts

en

II <naam>, directeur van het microbiologisch laboratorium <naam>, gevestigd <adres, postcode, plaats>, hierna te noemen: het laboratorium

en

III <naam>, directeur van de GGD <naam/regio> gevestigd <adres hoofdvestiging>, hierna te noemen: de GGD

overwegende dat:

- de Infectieziektewet voorziet in maatregelen om de gezondheid van de bevolking te beschermen tegen infectieziekten;
- de Infectieziektewet een aantal infectieziekten met name noemt, waarvan de behandelend arts de vaststelling of het vermoeden daarvan verplicht is te melden aan de GGD;
- de ziekteverwekkers van bedoelde infectieziekten doorgaans worden vastgesteld door het laboratorium, dat in opdracht van de behandelend arts een onderzoek heeft verricht als bedoeld in artikel 1, lid d van de Infectieziektewet;
- de arts-microbioloog in het kader van de Wet Geneeskundige Behandelingsovereenkomst beschouwd wordt als medebehandelaar;
- ondergetekenden het daarom uit praktisch oogpunt wenselijk achten, dat het laboratorium ook een (voor)aanmelding van de infectieziekte aan de GGD namens de behandelend arts (hoofdbehandelaar) verzorgt;

komen het volgende overeen:

- De behandelend arts machtigt de behandelend arts-microbioloog om namens hem/haar meldingen te doen aan de GGD, als bedoeld in hoofdstuk II, artikel 4 van de Infectieziektenwet, voor zover het diagnostisch onderzoek betreft voor ziekten uit de B-categorie.
- Het laboratorium doet de melding naar aanleiding van het resultaat van een in opdracht van de behandelend arts door het laboratorium verricht microbiologisch onderzoek, van stoffen die door de behandelend arts ten behoeve van onderzoek van het lichaam van diens patiënt zijn afgescheiden.
- De melding door het laboratorium betreft de navolgende identificerende gegevens: naam, adres, woonplaats en geboortedatum van de patiënt; de naam en het praktijkadres van de behandelend arts; de datum van aanvraag van het onderzoek, alsmede de naam van de ziekteverwekker.
- Indien het laboratorium een melding doet, stelt het de behandelend arts daarvan binnen 24 uur in kennis.
- Omdat het laboratorium niet alle voor melding relevante gegevens aan de GGD kan melden, zal de GGD naar aanleiding van de melding door het laboratorium contact opnemen met de behandelend arts, met het verzoek om aanvullende informatie over de patiënt. Dit contact vindt plaats nadat het laboratorium de behandelend arts van de uitslag op de hoogte heeft gesteld.
- De GGD en de behandelend arts bespreken ook welke aanvullende maatregelen er vanuit epidemiologisch gezichtspunt nodig zijn voor de bestrijding van de ziekte.
- De GGD neemt nooit contact op met een patiënt vóórdat de behandelend arts of diens waarnemer in de gelegenheid is gesteld de patiënt over de diagnose in te lichten, of als blijkt dat er anderszins bezwaar bestaat tegen verder onderzoek of maatregelen.
- De behandelend arts blijft achteraf verantwoordelijk voor het doen van de melding en voor het verstrekken van aanvullende voor de melding relevante gegevens aan de GGD, alsmede voor het onmiddellijk doen van een melding bij vermoeden of vaststelling van ziekten in groep A als bedoeld in de Infectieziektewet, dan wel het doen van de melding in gevallen waarbij de arts dit noodzakelijk acht.
- Deze machtiging biedt partijen verder geen vrijwaring van eventuele aanspraken of sancties die mogelijk zouden voortvloeien uit het feit dat zij jegens elkaar of derden nalatig zijn geweest in het vermoeden, vaststellen of melden van een infectieziekte.

Aldus in drievoud opgemaakt te <plaats> op <datum>.

Arts (zie bijgevoegde lijst)

Laboratorium

GGD

Moleculaire diagnostiek: (on)begrensde mogelijkheden...

M.C.A. BLANS, F. BOSMA, B. MARAHA, I.J.B. SPIJKERMAN, K. WAAR, M. VAN WESTREENEN, K.C. WOLTHERS

Op 15 februari 2001 hield de Nederlandse Vereniging van Arts-assistenten in opleiding Medische Microbiologie (NVAMM) haar achtste wetenschappelijke symposium. Net als voorgaande jaren werd het symposium gehouden in de Koninklijke Nederlandse Academie voor Wetenschappen in Amsterdam. Dit jaar werden de verschillende mogelijkheden en de beperkingen van de moleculaire diagnostiek in het microbiologische lab besproken. 's Ochtends werd, onder voorzitterschap van Mw. prof. dr. C.A. Bruggeman, met name aandacht geschonken aan de invloed van de moleculaire diagnostiek op de medische microbiologie en de nieuwe uitdagingen als gevolg daarvan. 's Middags werden onder leiding van dr. M.F. Peeters verschillende toepassingen van moleculaire technieken belicht. Tijdens hun voordrachten lieten sommige sprekers zich (gelukkig) uit over de rol van microbiologen in het moleculaire veld hetgeen leidde tot discussie.

Trefwoorden: DNA-chip, kwantitatieve PCR, moleculaire diagnostiek, symposium

Het begon met pus

De goocheldoos van de moleculair bioloog is overvol. Maar zijn de trucs wel zo origineel en gevarieerd als het publiek denkt? Dr. B.K. Stulp, moleculair bioloog bij de afdeling Pathologie en Laboratoriumgeneeskunde van het Academisch Ziekenhuis Groningen, probeerde tijdens zijn voordracht een antwoord te geven op deze vraag. Allereerst werd een overzicht gegeven van de geschiedenis van de moleculaire biologie. Vanaf de ontdekking van het nucleïne in pus door Miescher in 1871 tot aan de ontwikkeling van de PCR door Mullis in 1985 werden de hoogtepunten belicht. Vervolgens kwamen verschillende nieuwe technieken aan bod. Enkele methoden voor de amplificatie, modificatie, karakterisatie en mutatie-detectie van DNA werden uitgelegd, evenals methoden voor de analyse van RNA en eiwit. Volgens Stulp zijn de mogelijkheden van de moleculaire diagnostiek niet onbegrensd. Op enkele uitzonderingen na wordt gebruikt gemaakt van een beperkt repertoire aan technieken, waarbij vooral hybridisatie en oligonucleotiden een belangrijke rol spelen. Ondanks dit beperkte repertoire is echter wel veel mogelijk in de moleculaire biologie.

De plaats van moleculaire biologie binnen de medische microbiologie

De impact van de moleculaire diagnostiek binnen de medische microbiologie werd besproken door dr. M.F. Peeters, arts-microbioloog in het St. Elisabeth Ziekenhuis te Tilburg. De invloed van de medische microbiologie op de behandeling van infectieziekten is door de relatief langzame diagnostiek niet groot. De introductie van moleculaire technieken heeft daarin eigenlijk weinig veranderd, met als belangrijke uitzondering nauwkeurige identificatie van micro-organismen zoals gewent in het kader van epidemieën van ziekenhuisinfecties met MRSA of VRE. Ook hebben moleculaire methoden hun plaats veroverd in de diagnostiek van voorheen niet te detecteren micro-organismen zoals *Tropheryma*, *Bartonella* en *Bordetella*. Er werd benadrukt dat laboratoriumdiagnostiek het belangrijkste element is in het beroepsprofiel van de arts-micro-

bioloog, het plechtanker van het vak medische microbiologie. Daarom moeten artsen-microbioloog (in opleiding) zich alle vaardigheden op het gebied van de moleculaire biologie eigen maken om daarmee blijvende invloed te kunnen hebben op het beheer rond diagnostiek en behandeling van infectieziekten, anders bestaat de kans dat zij de controle over de diagnostische microbiologie verliezen aan zuiver technologie-georiënteerde laboratoria.

Koch & Pasteur versus Watson & Crick in de diagnostische bacteriologie: kweek versus DNA-technologie?

Prof. dr. M. Vaneechoutte, verbonden aan het Laboratorium Bacteriologie en Virologie van het Universitair Ziekenhuis Gent, besprak de invloed van amplificatietechnieken in de diagnostiek. DNA-amplificatietechnologie maakt in het algemeen een snellere en gevoeligere diagnostiek van klinische infecties mogelijk. Voor deze techniek is echter een beperktere rol weggelegd in de bacteriologie dan in de virologie, waar tot nu toe voornamelijk serologie en viruskweek beschikbaar waren. Daar gelden problemen als aspecificiteit, lage gevoeligheid of bewerkelijkheid en traagheid, en de PCR-technologie betekent een ommekeer. Ook in de bacteriologie heeft de PCR-technologie een aantal verbeteringen en nieuwe mogelijkheden gebracht, zoals detectie van potentieel latente resistentiegenen (bijv. *mecA*) en het aantonen van niet kweekbare (bv. *Tropheryma whippelii* in ziekte van Whipple) of moeilijk kweekbare (bv. *Mycobacterium tuberculosis* en *Chlamydia trachomatis*) micro-organismen. Toch zal de kweek van bacteriën niet kunnen worden vervangen door DNA-technologie. Het bepalen van de antimicrobiële gevoeligheid van de infecterende microben is van primair belang. Met behulp van kweek en het Kirby-Bauer-antibiogram of de Etest kan dit snel, eenvoudig en relatief goedkoop. Wanneer resistentie op genotypische manier moet worden aangetoond, dan moeten zowel aanwezigheid als expressie van een groot aantal genen worden bepaald, wat een onbegonnen taak is. Bovendien geeft de kweek van een klinisch monster ook

een (kwantitatief) beeld van de verschillende organismen. Het implementeren van een kwantitatieve PCR voor uiteenlopende organismen lijkt daarentegen een onmogelijke opdracht. Anders dan verwacht blijkt de gevoeligheid van kweek trouwens in vele gevallen hoger dan die van PCR zoals bij ZN-negatieve tuberculosis en bloedkweek (1 bacterie in 10 ml bloed detecteerbaar), en is kweek in andere gevallen (sputum- en fecesmonsters) voldoende, gezien de hoge aantallen van de aanwezige pathogene organismen. Het gebrek aan specificiteit van de PCR is trouwens een groter probleem dan de sensitiviteit. Gevoeligheid zowel als specificiteit van de PCR worden nogal eens overschat door het analyseren van uitsluitend discrepante resultaten.

Ook de veel geroemde DNA-chiptechnologie biedt geen oplossing voor de vermelde problemen. Naast al de praktische en theoretische beperkingen van de DNA-technologie in de bacteriologie, mag niet worden vergeten dat de kweektechnologie ook voortdurend wordt verbeterd. Voorbeelden zijn de vloeibare cultuur van mycobacteriën, de automatische biochemische identificatie en de MIC-bepaling. Concluderend heeft de PCR binnen de bacteriologie een specifiek doch beperkt toepassingsgebied, wat betekent dat de standaardtechnieken van kweek en resistentiebepaling onverminderd van betekenis zijn.

Nieuwe ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek van parasitaire infecties

In plaats van prof. dr. A.M. Deelder vertelde dr. H. Hokke, werkzaam op de afdeling Parasitologie van het Leids Universitair Medisch Centrum, over de nieuwe moleculaire ontwikkelingen op het gebied van de parasitologie. In de diagnostiek van parasitaire infecties is de laatste jaren een introductie van nieuwe moleculaire technieken gaande ter vervanging van of als aanvulling op de klassieke methoden die meestal gebaseerd zijn op klinisch of parasitologisch onderzoek. Net als bij de andere infectieziekten neemt het aantal PCR-toepassingen toe. Zij worden gebruikt voor bijvoorbeeld het onderscheid tussen cysten van *E. histolytica* en die van *E. dispar*. Behalve (geamplificeerd) DNA is er echter een scala aan parasiet-specifieke eiwitten, glycoconjugaten en metabolieten die voor kunnen komen in urine of bloed van geïnfecteerde individuen. Er worden geavanceerde technieken ontwikkeld die het mogelijk maken deze moleculen direct, gevoelig en specifiek aan te tonen.

In de diagnostiek van *Schistosoma*-infecties worden testen die gebaseerd zijn op de detectie van verschillende glycoproteïnen toegepast voor patiëntendiagnostiek of ter ondersteuning van wetenschappelijk onderzoek. Dergelijke glycoproteïnen, die door volwassen wormen en eieren worden uitgescheiden in urine of bloed, kunnen worden gekwantificeerd in een ELISA met monoklonale antilichamen. Voor toepassing in het veld worden prototypes van deze testen in een dipstick-formaat ontwikkeld.

Recentelijk zijn gevoelige technieken beschikbaar gekomen die het mogelijk maken bovengenoemde en andere moleculen in urine of bloed aan te tonen met homogene testen. Een techniek die momenteel in Leiden ontwikkeld wordt voor *Schistosoma* maakt gebruik van een Zeiss Confocor 2 voor fluorescentiecorrelatie-spectroscopie (FCS). Deze techniek is in staat om in een meetvolume van minder dan een femtoliter individuele moleculen te detecteren als die een fluorescerend label bevatten of met een fluorescerend molecuul (bijvoorbeeld een monoklonaal antilichaam of ander specifiek reagens)

interactie vertonen.

Massaspectrometrie wordt gebruikt om urine of serum op metabolieten van geneesmiddelen te onderzoeken. Deze techniek is ook te gebruiken voor detectie van parasitaire metabolieten. Een doel is de identificatie van niet-immunogene producten die potentieel beter correleren met de intensiteit van infectie.

Bovenstaande technieken verkeren deels in een experimenteel stadium en moeten nog worden geëvalueerd voordat ze in de praktijk van het medisch microbiologisch laboratorium zullen worden gezien. De versnelling in het beschikbaar komen van moleculaire technieken laat er echter geen twijfel over bestaan dat sommige van de beschreven methoden in het komende decennium toepassing zullen vinden in zowel de parasitaire als de microbiologische diagnostiek in het algemeen.

Kwaliteitsbeheersing

Zoals bij andere laboratoriumtechnieken vereist ook de moleculaire microbiologie kwaliteitscontroles. Aan de hand van de in 1995 opgestelde richtlijnen voor moleculaire diagnostiek van de NCCLS besprak dr. A.G.M. Buiting, arts-microbioloog in het St. Elisabeth Ziekenhuis te Tilburg, de verschillende aspecten hiervan.

Er werd ingegaan op de eisen die worden gesteld aan kwaliteitsbeheersing van de validatie van moleculair-microbiologisch onderzoek en kwaliteitsborging in de post-validatiefase. Optimale voorzorgsmaatregelen, omstandigheden die een minimale kans op contaminatie bereiken, kwaliteitsbewaking van de apparatuur en de zorgvuldige keuze van de reagentia zijn essentieel voor (patiënt-gerelateerd) moleculair-biologisch onderzoek. Dit geldt voor de inrichting van het laboratorium en voor alle stappen van het onderzoek, waaronder monstervoorbereiding, amplificatie en detectie. Concluderend: naast de algemene laboratoriumrichtlijnen zijn er ook richtlijnen toegespitst op de moleculaire biologie. Implementatie hiervan vergt forse inspanningen, maar kan in de toekomst een vereiste zijn voor de accreditatie van moleculaire microbiologische laboratoria.

Gebruik van moleculaire technieken in polyfasische taxonomische onderzoeken

Dr. P.A.R. Vandamme, doctor-assistent aan het Laboratorium voor Farmaceutische Microbiologie van de Universiteit van Gent, beschreef de theorie van de polyfasische taxonomie en illustreerde dit met een boeiend praktijkvoorbeeld over het *Burkholderia cepacia*-complex. De polyfasische taxonomie integreert verschillende aanvaarde principes voor de (her)classificatie van bacteriën. De huidige polyfasische taxonomie bestaat uit verschillende elementen: DNA-DNA-hybridisatie, vergelijkende onderzoeken van sterk geconserveerde macromoleculen (zoals het 16S rDNA) voor fylogenetische doeleinden en andere fenotypische en moleculaire methoden. Deze methoden worden gecombineerd om bacteriën te onderscheiden op verschillende taxonomische niveaus.

B. cepacia is een veelzijdig organisme dat vrijwel overal voorkomt waarbij het grond, water, planten, mensen en dieren als natuurlijke niches heeft. *B. cepacia* is oorspronkelijk bekend als plantpathogeen maar is ook berucht om zijn vermogen levensbedreigende infecties te veroorzaken bij mucoviscidose. Moeizame diagnostiek, rapporten over hybridespecies en verschillen tussen humane- en omgevingsisolaten waren aanleiding voor een taxonomisch onderzoek naar *B. cepacia*.

Meer dan 2.500 isolaten van mucoviscidosepatiënten, andere patiënten en uit de omgeving zijn met verschillende taxonomische methoden geïdentificeerd. Deze studie toonde aan dat een aantal nieuwe species en genera regelmatig foutief als *B. cepacia* werd geïdentificeerd. Tevens werd aangetoond dat *B. cepacia* een complex van minstens negen nauw verwante species vormt en dat deze negen species een verschillend pathogeen vermogen hebben voor mensen of planten, antimicrobiële resistentie en verspreiding. De polyfasische taxonomische benadering was nodig om deze fylogenetische differentiatie van de *B. cepacia*-stammen te verkrijgen en deze kennis kan nu worden gebruikt om op een efficiënte manier onderscheid te maken tussen de verschillende species.

Het gebruik van moleculaire technieken bij de diagnostiek van tuberculose

Mw. dr. G. Noordhoek, moleculair bioloog op het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland in Leeuwarden, besprak de toepasbaarheid van en de ontwikkelingen in de moleculaire diagnostiek van tuberculose. De laatste jaren passen medisch-microbiologische laboratoria in toenemende mate moleculaire technieken toe. Zo ook bij de diagnostiek van mycobacteriële infecties: directe detectie uit klinisch materiaal, identificatie van verschillende species en detectie van resistentie tegen één of meer geneesmiddelen. Directe detectie van mycobacteriën in patiëntenmateriaal levert tijdswinst op ten opzichte van de kweek. De specificiteit de PCR is toegenomen, echter de sensitiviteit vormt in het geval van mycobacteriële verwerkers een probleem. De gevoeligheid kan worden vergroot door te zoeken naar sequenties die in veelvoud voorkomen (multicopy targets). Identificatie van de verschillende atypische mycobacteriën is van belang bij immuungecompromitteerde patiënten en specifieke primers bieden hierbij een uitkomst. RFLP (restricted fragment length polymorphism) en spoligotyping kunnen worden toegepast voor epidemiologische doeleinden. Een stamspecifieke marker kan dan al in een vroeg stadium informatie geven over bijvoorbeeld het te verwachte resistentiepatroon. De toepasbaarheid van moleculaire technieken binnen de diagnostiek van infecties met mycobacteriën is aangetoond, maar het gevaar op missen van een pathogeen bij onderzoek van een verkeerd deel van het monster (sampling error) mag niet worden onderschat.

Virologie in 'real-time'

Dr. H.G.M. Niesters, moleculair bioloog op de afdeling Virologie van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam, schetste de ontwikkelingen op het gebied van moleculaire technieken in de klinische virologie. Juist in de virologie hebben moleculaire technieken relatief makkelijk hun intrede gedaan, simpelweg omdat er voor een aantal virussen geen kweekmethoden voorhanden zijn en er dus nog geen 'gouden standaard' bestond. Rond 1990 speelde de vraag in het Dijkzigt Ziekenhuis of en hoe er in amplificatietechnieken moest worden geïnvesteerd. De afdelingen Virologie en Medische Microbiologie en Infectieziekten werken op dit front nauw samen en dit heeft geresulteerd in de implementatie van de inmiddels 'standaard' moleculaire technieken tot de nieuwe kwantitatieve moleculaire technieken. Het kwantitatief aantonen van virussen is alleen van belang als er een relatie bestaat tussen de hoeveelheid virus en de kans op ziekte, of indien het effect van antivirale therapie zo

kan worden vervolgd. Dit is het geval voor virussen als HIV-1, HBV en HCV en hiervoor zijn kwantitatieve testen dus ook commercieel verkrijgbaar. Er bestaat echter ook behoefte aan de ontwikkeling van kwalitatieve en kwantitatieve moleculaire technieken voor andere virussen, zoals de herpesvirussen, HIV-2, of het influenzavirus.

Bij de moleculaire diagnostiek heeft men te maken met drie processen: 1. de pre-amplificatiestap (het verwerken van de monsters tot DNA of RNA), 2. de amplificatiestap (de PCR) en 3. de post-amplificatiestap (het aantonen van wat geamplificeerd is). Introductie van automatische nucleïnezuurextractie en de technieken waarbij tijdens het proces de mate van amplificatie wordt gemeten ('real-time') hebben stap 1 en 3 dusdanig verkort, dat het mogelijk is een uitslag in één dag te produceren. Bij de real-time-amplificatietechniek met de TaqMan kan men de amplificatie van het product direct volgen met een laser, en stap 3 is dus niet meer nodig. Een voorbeeld is het meten van de EBV-load om het ontstaan van lymfoproliferatieve ziekte na een beenmergtransplantatie aan te tonen. Het ontstaan van EBV-gerelateerde lymfomen gaat gepaard met een snelle dynamiek van EBV-load. Van allogene BMT-patiënten die T-cel-gedepleteerd zijn daalt de mortaliteit indien gestart wordt met anti-CD20-therapie zodra de EBV-load boven de 10^3 kopieën per ml komt. Het effect van de anti-CD20-therapie kan op deze manier ook goed worden vervolgd. Bij deze patiënten is een frequent vervolgen van cruciaal belang en daarom wordt deze PCR iedere dag uitgevoerd.

Een kort tijdsinterval tussen inzenden en rapportage is dus niet het probleem bij de moleculaire technieken indien ze vaak genoeg worden ingezet. Maar hoe zit het met de kwaliteitscontrole? Alledrie de stappen moeten gecontroleerd worden, van opwerken tot het aantonen van amplificatieproduct. De afdeling virologie maakt nu gebruik van een universele standaard, waarbij aan ieder monster 1.500-5.000 kopieën herpesvirus afkomstig van zehonden wordt toegevoegd. Zo wordt het hele proces, inclusief het opwerken van DNA, gecontroleerd.

De kwantitatieve technieken voor de virusdiagnostiek voldoen dus aan de voorwaarden 'snel' en 'betrouwbaar'. Deze technieken zullen zeker bijdragen aan een verbeterde virale diagnostiek, meer inzicht in pathogenese van de virusinfectie en een betere behandeling.

DNA-chip-technologie in de medische microbiologie

Als laatste kwam aan het woord dr. Alex van Belkum, moleculair-bioloog verbonden aan de afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten van het Academisch Ziekenhuis Rotterdam. Hij daagde de arts-microbioloog (in opleiding) uit met de vraag hoe het moet met het domein van de arts-microbioloog met enerzijds alle nieuwe moleculaire technieken en anderzijds de clinicus: heeft de arts-microbioloog nog wel toekomst? Ja, gelukkig voor ons, en de oplossing zit in de samenwerking in het laboratorium tussen arts-microbioloog en moleculair-biologen.

Er is inmiddels een heel scala aan moleculaire technieken voorhanden voor detectie en typering van micro-organismen en voor het aantonen van resistentie tegen antibiotica. Steeds kleinere hoeveelheden klinisch materiaal kunnen worden geanalyseerd; een voorbeeld is toepassing van de laser capture microdissection. De voortgang van de micro-technologie leidt tot de ontwikkeling van nieuwe technieken voor de microbiologie zoals o.a. de DNA-chiptechnologie,

ontwikkeld door Affymetrix. Deze techniek is nog niet voorhanden in Nederland, maar dat zal volgens Van Belkum niet lang meer duren. De DNA-chip bestaat uit een drager, de chip, waarop korte nucleïnezuursequenties gesynthetiseerd kunnen worden. Detectie van het target kan dan met fluorescentie-probes (dit kan ook weer cDNA, RNA, etc zijn). Er ontstaat een miniaturveldje met oplichtende probes, dat kan worden gelezen door een speciale reader. De chip kan worden geladen met honderdduizenden verschillende oligonucleotiden waarbij gebruik wordt gemaakt van subtiele chemische methoden. Voor het vervolgen van een bepaalde mutatie kan men oligonucleotiden van 20 baseparen synthetiseren, waarvan steeds een positie varieert. De target zal aan de juiste sequentie hechten en fluoresceren. Met een kant en klare chip duurt deze procedure ongeveer vijf uur, waarvan een uur wordt gebruikt voor analyseren van de data.

Deze techniek is toepasbaar voor het opsporen van resistentie-mutaties, zoals bij *M. tuberculosis*, maar ook kunnen genen onderling worden vergeleken, bijvoorbeeld om *M. bovis* van *M. tuberculosis* te onderscheiden. Misschien is het in de toekomst bruikbaar voor fylogenetische analyses door multi-locus-sequencing. Ongetwijfeld zal deze technologie vanwege de zeer brede capaciteit nog veel toepassingen kennen voor het oplossen van complexe microbiologische vraagstukken en een bijdrage leveren aan diagnostiek en typering.

Conclusie

Tijdens het symposium 'Moleculaire diagnostiek: (on)begrensde mogelijkheden...' werd getracht verschillende aspecten van de moleculaire diagnostiek te belichten. Tijdens de verschillende voordrachten werd maar weer eens duidelijk dat de importantie van de moleculaire biologie binnen het microbiologisch groeiende is. Het is dan ook taak van de arts (assistent)-microbioloog om toch zoveel mogelijk actief betrokken te blijven bij de verschillende ontwikkelingen op dit gebied, waardoor hij zijn ondersteunende rol in de diagnostiek en behandeling van infectieziekten kan garanderen.

Summary

On 15 February 2001 the Dutch society of medical microbiologists in training (Nederlandse Vereniging van Arts-assistenten in opleiding Medische Microbiologie, NVAMM) organised the 8th scientific symposium. Located in Amsterdam just like previous years, possibilities and impossibilities of molecular diagnostics were discussed. During the morning prof. dr. C.A. Bruggeman had the chair and she addressed specifically the influence of molecular diagnostics on medical microbiology. During the afternoon with dr. M.F. Peeters as chairman special applications of the molecular techniques were highlighted. Some speakers directed during their talk the role of microbiologists in molecular diagnostics, which led to broad discussions.

Mw. M.C.A. Blans, arts-assistent, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Afd. Medische microbiologie Go4.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht

Mw. F. Bosma, arts-assistent, Academisch Ziekenhuis Nijmegen, Afd. Medische microbiologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

B. Maraha, arts-assistent, St. Elisabeth Ziekenhuis, Afd. Medische microbiologie, Postbus 747, 5000 AS Tilburg

Mw. dr. I.J.B. Spijkerman, arts-assistent, Leids Universitair Medisch Centrum, Afd. Medische microbiologie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden

Mw. K. Waar, arts-assistent, Academisch Ziekenhuis Groningen, Afd. Medische microbiologie, Postbus 30001, 9700 RB Groningen

Mw. dr. M. van Westreenen, arts-assistent, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Afd. Medische microbiologie Go4.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht

Mw. dr. K.C. Wolthers, arts-assistent, Erasmus Universitair Medisch Centrum, Afd. Medische microbiologie, Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE Rotterdam

Moleculaire microbiologie in het Rijk van de Rode Koningin

De wapenwedloop tussen pathogene bacteriën en de mens

Rede uitgesproken bij de aanvaarding van het ambt van bijzonder hoogleraar op het vakgebied van de moleculaire microbiologie aan de Medische Faculteit van de Universiteit van Utrecht op 10 april 2001 door prof. dr. F. Mooi. Dit bijzonder hoogleraarschap wordt ondersteund door de Stichting Infectieziekten.

Meneer de rector magnificus, dames en heren.

De Rode Koningin

Moleculaire Microbiologie in het Rijk van de Rode Koningin. Voor velen van u vermoedelijk een wat cryptische titel, en ik wil dan ook beginnen deze uit te leggen. De Rode Koning is een figuur, de koningin uit het schaakspel, die Alice tegenkomt in het boek "The Looking Glass", geschreven door Lewis Carroll. Alice en de Rode Koning rennen door een landschap, en op een gegeven moment merkt Alice op dat ze ondanks al dat geren, onder dezelfde boom blijven. Een gevoel dat sommigen van u wellicht zullen herkennen. Ik citeer:

"Why, I do believe we've been under this tree the whole time! Everything's just as it was!"

"Of course it is," said the Queen. "What would you have it?"

"Well, in our country," said Alice, still panting, "you'd generally get to somewhere else if you ran very fast for a long time as we've been doing."

"A slow sort of country!" said the Queen. "Now, here, you see, it takes all the running you can do, to keep in the same place". Dit beeld is door Van Valen (Van Valen-1973), een evolutiebioloog, gebruikt om de wapenwedloop, de co-evolutie, tussen concurrerende levende wezens te verduidelijken. Hij noemde het "The Red Queen hypothesis". Bij concurrerende levende wezens, kunt u denken aan het jachtluipaard en de antilope, maar ook een ziekteverwekkende bacterie, een pathogeen, en zijn gastheer, bijvoorbeeld de mens. Een wapenwedloop houdt in, dat beide partijen moeten, met de nadruk op moeten, investeren om te voorkomen dat de tegenpartij gaat overheersen. De evolutie selecteert voor een steeds sneller jachtluipaard, maar als reactie daarop komt zijn prooi ook onder evolutionaire druk te staan om sneller te rennen. Uiteindelijk schieten geen van beide partijen er iets mee op. Relatief gezien is er geen vooruitgang. Beide partijen rennen heel hard maar blijven, relatief gezien, ten opzichte van elkaar, op dezelfde plaats. Vandaar: "It takes all the running you can do, to keep in the same place".

Ik wil me beperken tot de wapenwedloop die plaatsvindt tussen de mens en pathogene bacteriën. Een voorbeeld van een wapenwedloop tussen bacterie en mens, is het gebruik van antibiotica. Al snel na de invoering van penicilline werden bacteriën penicilline resistent. Dat leidde tot de ontwikkeling van nieuwe antibiotica, waar vervolgens weer resistentie tegen ontstond. Er zijn nu bacteriën, zoals sommige tuber-

culose-, *Shigella*- en *Staphylococcus*-stammen, die niet of nauwelijks meer te behandelen zijn met de beschikbare antibiotica. De bacterie heeft zich aangepast, men spreekt wel van adaptatie. We zijn weer terug bij af. Ik zal de wapenwedloop tussen pathogeen en gastheer, bacterie en mens, behandelen vanuit het perspectief van de moleculaire microbiologie. Ik zal het hebben over de rol die de moleculaire microbiologie speelt bij het bestuderen van deze processen, maar ook bij het aandragen van oplossingen. Vandaar mijn titel: moleculaire microbiologie in het Rijk van de Rode Koningin.

Zijn pathogene bacteriën, infectieziekten, nog wel een probleem?

Een retorische vraag. Volgens de WHO sterven er 13 miljoen mensen per jaar aan infectieziekten, dat is een kwart van het totaal aantal doden (WHO-1999). Mondiaal gezien zijn infectieziekten nog altijd een enorm probleem. De grootste killers zijn longontsteking, AIDS, diarree, tuberculose, malaria en mazelen. Als je kijkt naar het aantal geïnfecteerden dan zijn de getallen natuurlijk veel groter. Men schat dat 2 miljard mensen geïnfecteerd zijn met TB, en 60 miljoen mensen met HIV. We hebben ook te maken met nieuw ontdekte, en wederopkomende infectieziekten. Denkt u maar aan HIV. Maar ook malaria, cholera, kinkhoest, Ebola, en nog vele anderen. Cholera en kinkhoest komen later terug in mijn verhaal. Bovendien rijst het besef, dat veel infectieziekten verantwoordelijk zijn voor, of een bijdrage leveren aan, chronische ziekten zoals hart en vaatziekten, kanker, en artritis. Bij de nieuw ontdekte infectieziekten zoals bijvoorbeeld veroorzaakt door de *Ebola*-en *Nipah*-virussen, betreft het vaak kleine geïsoleerde uitbraken, in verre landen. Maar vergeet u niet, dat AIDS ooit is begonnen als zo'n geïsoleerde uitbraak. Een virus dat is overgesprongen van de chimpansee naar de mens (Hahn-2000). Een zoönotische transmissie. Deze vond vermoedelijk in het begin van de vorige eeuw plaats. 70 jaar later zijn 60 miljoen mensen besmet, in sommige Afrikaanse landen 10 tot 20 procent van de bevolking. Veel infectieziekten van de mens zijn ontstaan door zoönotische transmissie. TB bijvoorbeeld, hebben we vermoedelijk zo'n 15 duizend jaar geleden gekregen van runderen (Sreevatsan-1997). Kinkhoest mogelijk van varkens of honden (van der Zee-1997). Er zijn een aantal factoren die bijdragen aan de wederopkomst van infectieziekten. Zoals, mobiliteit. De wereld is klein geworden. Men spreekt in dit verband wel van een global village. Mobiliteit heeft bijvoorbeeld een grote rol gespeeld bij de verspreiding van HIV. Een ander, zeer actueel voorbeeld, is de mond en klauwzeerepidemie, die zijn oorsprong vond in India, en vermoedelijk via Saoedi-Arabië in Engeland terecht is gekomen. De snelle verspreiding van multiresistente pneumokokken over de wereld mag ook genoemd worden. De toename van mensen met een verzwakt immuunsysteem speelt ook een rol bij de wederopkomst

van infectieziekten. Dit komt door de toename van het aantal ouderen, door medisch ingrijpen, zoals chemotherapie, en ook door ondervoeding in ontwikkelingslanden. Ook de toename in bevolkingsdichtheid is een factor. Al deze factoren hebben een positief effect op de evolutie en transmissie van pathogenen. Het een en ander heeft tot gevolg dat ook in een ontwikkeld land als de VS de mortaliteit ten gevolge van infectieziekten toeneemt (Armstrong-1999). Rond 1900 stierven er per jaar nog 500 mensen per 100.000 inwoners aan infectieziekten. Dit is afgenomen tot 30 in de jaren '50-'82. Daarna is er echter weer sprake van een toename, en verdubbeling tot 60 per 100.000 in de jaren '82-'94. Deze toename is voornamelijk het gevolg van AIDS, longontsteking, resistentie, en ziekenhuisinfecties.

De wapens van de bacterie

De rennende Rode Koningin als metafoer, voor een wapenwedloop tussen pathogeen en mens. Als je denkt aan een wapenwedloop, dan denk je ook aan wapens. Wat zijn nu de wapens van de bacterie? Ten eerste de populatiegrootte. Hoe groter de pathogeenpopulatie hoe meer variatie je daarin aantreft. En variatie is het substraat van de evolutie. Verder is de mutatiefrequentie een functie van de populatiegrootte. Hoe groter de populatie, hoe sneller een organisme zich dus kan aanpassen. Laat ik de populatiegrootte van bacteriën illustreren met wat voorbeelden. Ons lichaam bevat meer bacteriecellen dan eigen cellen. Een menselijk lichaam bevat meer bacteriecellen dan het totaal aantal mensen op aarde. 60 procent van de biomassa van deze aarde bestaat uit bacteriën. Verreweg de meeste daarvan zijn overigens onschadelijk voor ons. Sterker nog, ons leven is afhankelijk van bacteriën. Een tweede wapen van de bacterie is zijn korte generatietijd. Een nieuwe bacteriegeneratie kan ontstaan in 20 minuten, bij de mens duurt dat 30 jaar. Dat scheelt een factor 800.000. Een korte generatietijd laat een snelle expansie toe onder invloed van selectie. De basis van epidemieën. Bovendien is de mutatiefrequentie, een functie van de generatietijd. Organismen met een korte generatietijd kunnen snel muteren, en zich dus snel aanpassen aan nieuwe situaties. Het derde wapen is het vermogen om exogeen DNA op te nemen. Exogeen, dat wil zeggen DNA van buiten de cel. Dat kan bijvoorbeeld door transformatie, transductie via bacteriofagen, of via conjugatie. Via conjugatieve plasmiden met een groot gastheerbereik, beschikken bacteriën over een enorme genenpool. Gezamenlijk geven deze eigenschappen bacteriën het vermogen zich snel aan te passen aan nieuwe omstandigheden, door veranderingen in hun erfelijk materiaal. Door mutaties. Ze kunnen snel evolueren. Dit klinkt misschien wat theoretisch. Daarom zal ik zal aan de hand van een tweetal voorbeelden illustreren, dat het adapterend vermogen van bacteriën gevolgen kan hebben voor onze gezondheid.

Cholera

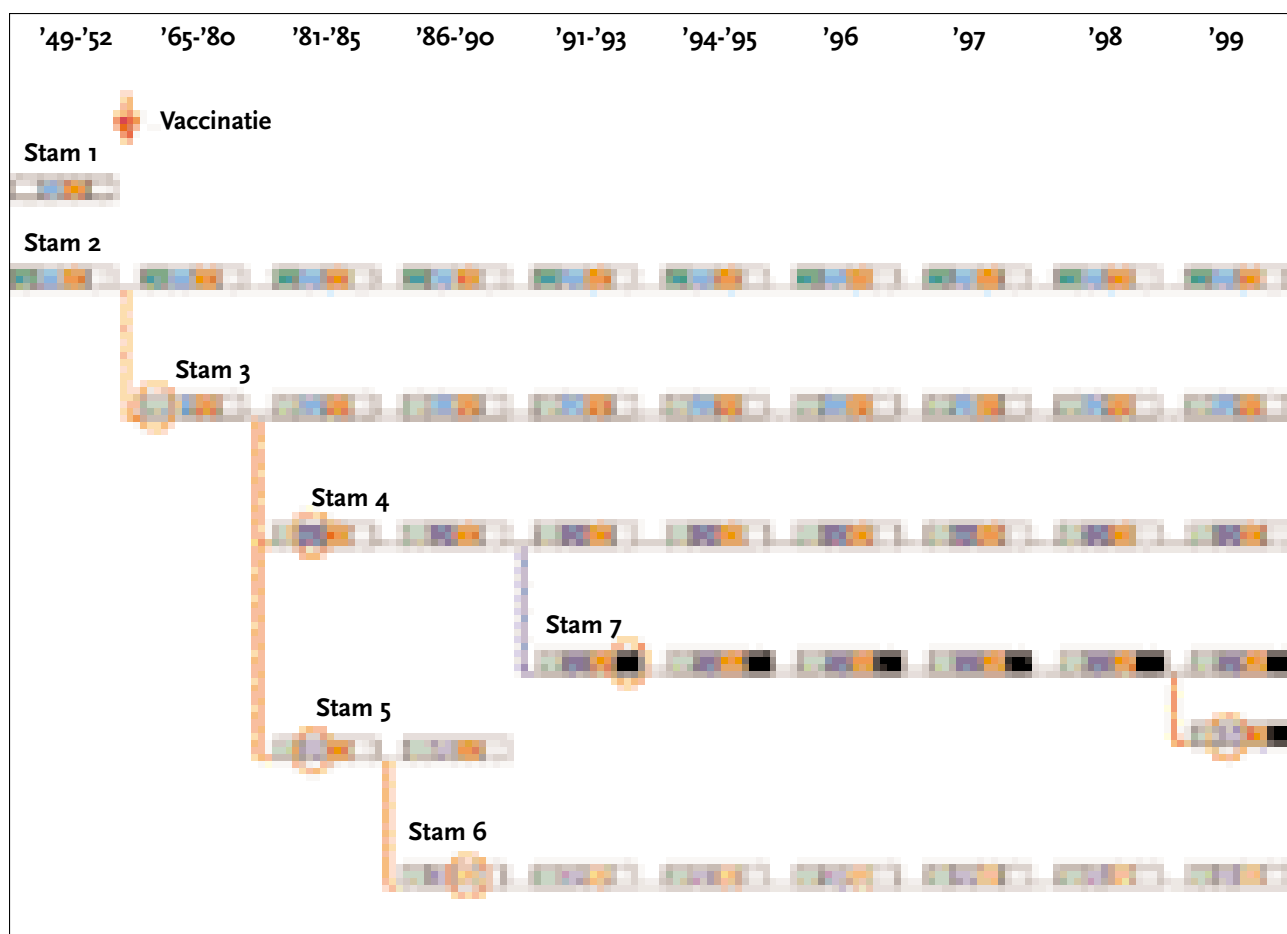
Allereerst cholera. Cholera wordt gerekend tot de "re-emerging infectious diseases", infectieziekten die aan het terugkomen zijn. Het is een ziekte die op vrijwel alle continenten voorkomt. De grootste problemen geeft cholera in Azië en Afrika. Elk jaar importeren toeristen cholera in Nederland. Gelukkig kan de bacterie zich hier niet handhaven. Sinds mensenheugenis wordt cholera veroorzaakt door de zogenaamde O1-stam (Mooi-1997). O1 slaat op het, lipopolys-

accharide, het jasje van de bacterie, dat gecodeerd wordt door de O1-genen. Cholera en O1 waren bijna synoniemen. Echter, eind 1992 werd in India een cholera-epidemie veroorzaakt door een bacterie met een heel ander jasje, dat men de naam O139 heeft gegeven. Men dacht eerst met een geheel nieuwe bacterie te maken te hebben, maar onder andere uit werk van dr. Elies Bik uitgevoerd in mijn groep (Bik-1995), bleek dat het dezelfde bacterie was, die een nieuw jasje had aangetrokken. Uit het onderzoek van Elies, en anderen, bleek dat de cholera bacterie genen had opgenomen van een niet pathogene bacterie die een O139-kapsel had. De O139-genen vervingen de O1-genen waardoor de buitenkant van de cholera bacterie veranderde. De O1-cholera bacterie veranderde in een O139-bacterie maar de pathogene eigenschappen bleven behouden. Vandaar de opmerking van Elies, dat de O139-stam een wolf in schaapskleren is (Bik-1996). Waarom veroorzaakte deze nieuwe cholera-stam een epidemie? In de Gangesdelta is cholera endemisch, een groot gedeelte van de populatie heeft dus antilichamen tegen de O1-stam. Als een O1-stam in de Gangesdelta een mens infecteert loopt hij dus een grote kans om herkend te worden door O1-antilichamen die in staat zijn de bacterie te doden. O1-antilichamen herkennen de O139-stam niet, die had dus vrij spel in 1992. Men hoopte dat de O139-stam weer zou verdwijnen, maar dat bleek niet het geval, hoewel de incidentie lager is dan die van de O1-stam. Ondertussen heeft de O139-stam zich verspreid over tien Aziatische landen. Men heeft ruim 20 jaar gedaan over de ontwikkeling van een vaccin tegen de O1-stam. En er moet nu weer een hoop geld en tijd geïnvesteerd worden om het cholera-vaccin aan te passen, zodat het ook beschermt tegen de O139-stam. Dus een relatief simpele genetische gebeurtenis, de overdracht van een cluster genen, kan grote gevolgen hebben.

Kinkhoest

Bij het tweede voorbeeld dat ik wil behandelen, kinkhoest, komen we wat dichterbij huis. Kinkhoest wordt veroorzaakt door de bacterie *Bordetella pertussis*, en is een ernstige ziekte van de ademhalingswegen, die vooral voor baby's levensgevaarlijk kan zijn. Voor de introductie van vaccinatie in Nederland kwam kinkhoest veelvuldig voor, en was zelfs een van de grootste oorzaken van kindersterfte. Begin 1900 stierven er ongeveer 1.000 kinderen per jaar aan kinkhoest. Door betere voeding, zorg en hygiëne nam dit af tot 150 in 1952. In dat jaar werd kinkhoestvaccinatie ingevoerd, waardoor de kindersterfte teruggebracht is tot vrijwel nul. Kinkhoest was uit het beeld verdwenen. Een zeer succesvol vaccin dus. Echter, sinds enige jaren is kinkhoest terug van weggeweest, het is ook een van wederopkomende infectieziekten. Dit blijkt bijvoorbeeld uit het aantal aangiften in Nederland. We zagen in het jaar 1996 een dramatische stijging in het aantal kinkhoestaangiften, sindsdien is dit aantal erg hoog gebleven (deMelker-2000). In de VS is kinkhoest ook een probleem, uit Amerikaanse studies is gebleken dat ongeveer 20 procent van de mensen die langer dan een week hoesten, kinkhoest hebben (Mink-1992). Uit cijfers van dr. Joop Schellekens en dr. Hester de Melker van het RIVM blijkt, dat de bacterie in hoge mate circuleert in de Nederland bevolking. Een paar procent van onze bevolking wordt ieder jaar geïnfecteerd door de kinkhoest bacterie. Zo'n 200- tot 300.000 mensen per jaar. De meeste volwassenen merken daar niet zoveel van. Maar kinkhoest kan ook voor volwassenen erg belastend

Figuur 1. Verandering in de *B. pertussis*-populatie in Nederland. Stammen zijn weergegeven door gesegmenteerde blokjes. Ieder gekleurd segment symboliseert één van de 4 onderzochte genen. Een verandering in kleur (omcirkeld) geeft een mutatie aan. De onderzochte periodes zijn aangegeven boven de figuur.



zijn. Vraagt u dat maar eens aan professor Jan Verhoef. Bovendien kunnen volwassenen baby's besmetten voor wie kinkhoest nog altijd een gevaarlijke ziekte is.

Wat is de oorzaak van de wederopkomst van kinkhoest? Het leek ons waarschijnlijk, dat meer dan 40 jaar vaccinatie heeft geleid tot veranderingen in de bacteriepopulatie, waardoor deze minder vatbaar is geworden voor het effect van vaccinatie (Willems-1996). Hierdoor zou de vaccineffectiviteit wat gedaald kunnen zijn. U moet dan niet direct te denken aan dramatische effecten. Op langere termijn kan zelfs een kleine daling in vaccineffectiviteit grote gevolgen hebben. Onze hypothese was dus, dat de bacterie in de loop der tijd veranderd is. We zijn dat gaan onderzoeken, waarbij we ons gericht hebben op de buitenkant van de bacterie (Mooi-1998). Immers vaccinatie is voornamelijk gericht tegen de buitenkant, het jasje van de pathogeen. We zijn begonnen de bacterie te bestuderen uit de periode 1949-1952, het prevaccinatie tijdperk dus. Dat kon dankzij de mooie stammencollectie van het RIVM. In de figuur ziet u een symbolische, geabstraheerde, weergave van de bacterie. Die is als het ware gereduceerd tot de vier genen (gekleurde blokjes) die wij hebben onderzocht. Verschillen in genen worden aangegeven door verschillen in kleuren. Zo'n verschil vertaalt zich in een verschil in het oppervlak van de bacterie. En we hebben bij cholera al gezien dat dit gevolgen kan hebben voor de volksgezondheid. In de periode 1949-1952, voor de invoering van vaccinatie, bestond de bacteriepopulatie uit twee stammen. Het kinkhoestvaccin bevat beide stammen. Een goed vaccin dus, dat gericht is tegen alle varianten. In 1952 wordt gestart met

vaccinatie. Als we nu kijken naar de populatie in de periode '65-'80, dan blijkt dat stam 1 volledig verdwenen is. Stam 2 komt nog voor, en er is een nieuwe stam bijgekomen. Deze stam is waarschijnlijk uit stam 2 ontstaan door een verandering, een mutatie, in een van de vier genen die wij onderzochten. Hierdoor is het oppervlak van de stam enigszins veranderd. In de periode '81-'85 vinden we, naast stam 2 en 3, 2 nieuwe stammen, die door mutaties zijn ontstaan uit stam 3. In de periode '86-'90 vinden we weer een nieuwe stam. En dat proces gaat door tot op de dag van vandaag. Het resultaat van deze micro-evolutie is, dat we van twee stammen in de prevaccinatieperiode, naar zes stammen heden ten dage, zijn gegaan. Bovendien zijn de oorspronkelijke stammen, die nog steeds gebruikt worden om het vaccin te maken, vrijwel geheel verdwenen uit de populatie. Het vaccin sluit dus niet goed meer aan bij de huidige bacteriepopulatie. Wij denken dat dit, althans ten dele, de toename in kinkhoest verklaart. Om de kinkhoestepidemieën te bestrijden krijgen kinderen van vier jaar nu een extra vaccinatie. Overigens zijn de veranderingen in de kinkhoest bacteriepopulatie niet alleen in Nederland opgetreden. Samen met collega's van het Amerikaanse Centers for Disease Control and Prevention, het CDC, hebben we aangetoond dat er in de VS soortgelijke verschuivingen in de kinkhoestbacteriepopulatie hebben plaatsgevonden (Cassiday-2000). Ook in Italië, Finland en Australië hebben we in samenwerking met buitenlandse collega's veranderingen in de kinkhoest bacteriepopulatie aangetoond (Mastrantonio-1999, Mooi-1999).

Een ander voorbeeld van adaptatie, dat ik niet uitgebreid zal behandelen, wordt beschreven in het proefschrift van dr. Hester Bootsma (Bootsma-1999). Het betrof een samenwerkingsproject tussen prof. Hans van Dijk en prof. Jan Verhoef van de Faculteit Geneeskunde, en mijn groep op het RIVM. Het werk van Hester toonde aan hoe een bacterie, in dit geval *Moraxella catarrhalis*, een resistentiegen opnam, en hoe dat gen zich in vrij korte tijd over de mondiale *Moraxella*-populatie kon verspreiden (Bootsma-2000). In minder dan 15 jaar is daardoor het aantal resistente *Moraxella*-bacteriën toegenomen van nul naar 90 procent. De tijd laat helaas niet toe dat ik inga op twee andere projecten die het belang van samenwerking tussen RIVM en de Faculteit Geneeskunde onderstrepen: Het MRSA-project waarop dr. Ine Frenay (Frenay-1994) is gepromoveerd en dat ik, samen met prof. Jan Verhoef en prof. Christine Vandenbroucke, heb begeleid. En het project van drs. Sandra Hellwig dat zich richt op humorale immuniteit tegen kinkhoest, dat ik samen met prof. Jan van de Winkel begeleid.

Genomics

Ik heb in het voorgaande aangegeven hoe de moleculaire microbiologie ons in staat stelt inzicht te krijgen in het ontstaan van epidemieën. Ik zal het nu hebben over wat nieuwe ontwikkelingen in de moleculaire microbiologie, die mijns inziens in de nabije toekomst een grote bijdrage zullen leveren aan ons kennis van, en strijd tegen, infectieziekten. Een van deze nieuwe ontwikkelingen wordt wel samengevat met het woord genomics. Het was James Watson, samen met Francis Crick de ontdekker van de structuur van DNA, die in 1988 voor het eerst voorstelde om de complete DNA-volgorde van het humane genoom te bepalen. Als vingeroefening is men eerst begonnen met bacteriële genomen en in 1995 werd het eerste volledige bacteriële genoom gepubliceerd: van *Haemophilus influenzae*, 1,8 mi basen groot (Fleischmann-1995). Zoals u misschien weet hebben twee groepen inmiddels een groot deel van de volgorde van het humane genoom bepaald. Een samenvatting van hun werk is gepubliceerd in februari van dit jaar in Nature en Science. Dertien jaar na de eerste plannen (Venter-2001, Intern. Hum. Gen. Seq. Cons.-2001). Zoals gezegd, in 1995 werd de volgorde van het *Haemophilus influenzae*-genoom bepaald. Hierna volgden al snel meer bacteriële genomen. En het is tegenwoordig nauwelijks meer bij te houden. Anno 2001 zijn meer dan 40 bacteriële genomen gepubliceerd, en er zitten er nog tenminste 100 in de pijplijn. Wat heeft dit nu voor informatie opgeleverd? Er blijkt dat 50 procent van de genen, geïdentificeerd in de bacteriële genomen, nieuw is. Dat wil zeggen dat er geen functie van bekend is. Daarvan is weer 50 procent uniek voor een bepaalde bacterie. De 40 bacteriële genomen hebben dus al 28.000 unieke en nieuwe genen opgeleverd. Een enorme schatkamer waaruit de mens kan putten. Deze genen leveren nieuwe doelen op, bijvoorbeeld om een antibioticum tegen te ontwikkelen. De huidige antibiotica zijn voornamelijk gericht tegen processen betrokken bij DNA, RNA, eiwit- en celwand-synthese. Genomics heeft nieuwe doelwitten geïdentificeerd zoals processen betrokken bij uitscheiding van toxines, opname van voedingsstoffen en celdeling. Men schat dat 6 procent van een bacterieel genoom betrokken is bij opname van voedingsstoffen. Veel van deze eiwitten zijn geconserveerd en uniek voor bacteriën,

waardoor het mogelijk is om breedspectrum-antibiotica te ontwikkelen.

Genomics kan ook een belangrijke bijdrage leveren aan vaccinontwikkeling. Dit zal ik illustreren aan de hand van het werk van de groep van Rappuoli gepubliceerd in Science (Pizza-2000). Deze onderzoekers hebben in zeer korte tijd vijf eiwitten geïdentificeerd die onderdeel kunnen vormen van een vaccin tegen hersenvliesontsteking veroorzaakt door de meningokok. Men heeft eerst de DNA-volgorde van het meningokok-genoom bepaald. Dat is tegenwoordig in een paar maanden mogelijk. Vervolgens heeft men gebruik gemaakt van de genoomvolgorde en de computer, in silico zoals dat wel heet, potentiële kandidaten geselecteerd voor een vaccin. Men heeft daarbij gezocht naar bacterieproducten, eiwitten, die worden uitgescheiden. Dus aan de buitenkant van de bacterie zitten. Na wat uren achter de PC, heeft men 570 eiwitten gevonden die voldeden aan de criteria. Het is gelukt om een groot deel van deze eiwitten, 350 van de 570, tot expressie te brengen in een andere bacterie, *Escherichia coli*, het huisdier van de moleculaire microbioloog. Een paar maanden werk. De 350 eiwitten zijn vervolgens geïsoleerd en gebruikt om muizen mee te immuniseren. De 350 verschillende antisera werden vervolgens getest op het vermogen om aan de buitenkant van de bacterie te binden en om de bacterie in aanwezigheid van complement te doden. Complement is een van de verbindingen waarmee ons lichaam zich tegen bacteriën verdedigt. Wederom een paar maanden werk. Deze screening leidde tot de selectie van zeven eiwitten. Vervolgens heeft men gekeken of deze eiwitten constant of variabel waren in verschillende meningokokstammen. Dat was in een weekje bekeken: bij vijf eiwitten werd nauwelijks variatie gevonden, deze worden verder onderzocht. De vondst van een aantal geconserveerde eiwitten die aan het oppervlak van de bacterie zitten was onverwacht, omdat meer dan 30 jaar onderzoek in het pre-genoomtijdperk slechts één constant eiwit heeft opgeleverd. Het onderzoek geleid door Rappuoli duurde daarentegen ongeveer een jaar. De vijf eiwitten moeten natuurlijk eerst nog getest worden in de mens voordat men een vaccin kan maken. Helaas duurt dat nog veel te lang: vijf tot tien jaar. Ik zou ervoor willen pleiten om deze laatste klinische fase aanzienlijk te versnellen en te vereenvoudigen. Zeker nu we vaccins hebben, of aan het ontwikkelen zijn, tegen pathogenen die veel sneller kunnen evolueren dan de cholera en kinkhoestbacterie. Ik denk aan Hib, meningokokken en pneumokokken. Ieder jaar hebben we een ander influenzavaccin. Dat moet ook omdat het virus razendsnel verandert. Soortgelijke mogelijkheden zouden er ook moeten komen voor vaccins tegen bacteriële pathogenen die een snelle evolutie vertonen.

Micro-arrays

Een tweede belangrijke ontwikkeling is die van de micro-arrays, ook wel DNA-chips genoemd. Deze ontwikkeling werd pas mogelijk nadat genomics tot volle bloei was gekomen. Met een micro-array kan de expressie van ieder gen van een organisme, individueel, onderzocht worden. Wat vroeger in duizenden experimenten uitgezocht moest worden, kan nu in één experiment. Gist heeft ruim 6000 genen, en die zijn allen vertegenwoordigd op een gist-DNA-chip. Voor de mens, die 30 tot 40.000 genen heeft, hebben we dus voldoende aan zes of zeven van deze chips. Omdat men van ieder gen de plaats kent op de chip, weet men dus precies welke genen

op welke wijze door een behandeling beïnvloed worden. Een elegante toepassing van micro-array is beschreven door een groep in Stanford. Deze groep heeft micro-arrays gebruikt om nieuwe doelwitten voor antibiotica tegen de TB-bacterie te vinden (Wilson-1999). Ze zijn daarbij uitgegaan van INH, een remmer van de celwandsynthese. INH is een van de meest gebruikte antibiotica om TB-patiënten te behandelen. Er ontstaat echter snel resistentie tegen. De TB-bacterie werd gekweekt met INH, vervolgens keek men naar het effect hiervan op genexpressie met behulp van micro-arrays. Een aantal genen bleek geactiveerd te worden door INH. De hypothese was, dat als je een bepaald proces verstoort in de bacterie, zoals celwandsynthese, de bacterie reageert door een verhoogde synthese van enzymen betrokken bij dat proces. Dat bleek te kloppen. Men vond op deze manier een aantal nieuwe enzymen betrokken bij de celwandsynthese. Dit zijn doelwitten voor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica.

Een andere groep, van David Relman – alweer uit Stanford, is een stapje verder gegaan (Belcher-2000). Zij hebben micro-arrays gebruikt om de interactie tussen bacteriën en gastheercellen te bestuderen. Bacteriën, in dit voorbeeld de kinkhoestbacterie, werden toegevoegd aan epitheelcellen afkomstig van de mens, en de twee werden een tijdje geïncubeerd. Daarna werd de genexpressie van de epitheelcellen gemeten. Hiervoor gebruikte men een chip met humane genen. De onderzoekers van Stanford vonden dat onder andere de genen voor mucusproductie werden geactiveerd. Overvloedige mucusproductie is inderdaad een van de kenmerken en van problemen van een kinkhoestinfectie. De mucus blokkeert de ademhalingswegen. Ook bleek dat de bacterie een toxine uitscheidde dat de kwaliteit van het mucus beïnvloedde. Het mucus werd taai. Het resultaat is dat de bacterie een wapen van de gastheer, mucus wordt immers gebruikt om onze luchtwegen vrij te houden van bacteriën, modificeert en tegen de gastheer gebruikt. De praktische toepassing van dit werk ligt voor de hand: als men eenmaal weet welke gastheergen de bacterie manipuleert, kan men denken aan gerichte therapie. Met een bacteriechip kan men ook bacteriegenen identificeren die specifiek geactiveerd worden, bijvoorbeeld na binding aan humaan epitheel, of als de bacterie de bloedbaan binnendringt. Het zal duidelijk zijn dat antibiotica of vaccins gericht tegen de betrokken genproducten een belangrijk middel kunnen zijn om infecties te bestrijden. Samen met professor Jan Verhoef, hebben we nu een samenwerkingsproject met de groep uit Stanford om DNA-chips te gebruiken om de veranderingen in de kinkhoest bacterie populatie te bestuderen. Dames en heren, ik heb willen illustreren dat populaties

van pathogene bacteriën een zeer een dynamisch karakter hebben. Bacteriën zullen altijd trachten te ontsnappen aan onze pogingen hen in te dammen. Zo'n adaptatie kan de vorm aannemen van een plotselinge verandering zoals bij cholera, of een geleidelijke verandering zoals bij kinkhoest. Dat betekent dat het werk niet af is als een goed vaccin of antibioticum ontwikkeld is. Je moet de pathoogpopulatie in de gaten blijven houden. Als je belangrijke verschuivingen ziet in de pathoogpopulatie, dan is dat een waarschuwing. Zoals we bij kinkhoest hebben gezien, gaan veranderingen in de pathoogpopulatie soms vooraf aan epidemieën. Dat geeft ons tijd om te reageren. Tot slot heb ik willen illustreren, hoe de moleculaire microbiologie gebruikt kan worden om inzicht te krijgen in evolutie van pathogenen en de oorzaak van epidemieën, zodat we vervolgens tegenmaatregelen kunnen nemen. De mens heeft niet de genetische flexibiliteit van bacteriën. Gelukkig maar, want dan zouden verschillende van u tijdens deze oratie schadelijke mutaties hebben gekregen. Ons voornaamste wapen tegen pathogenen is ons vernuft. Zoals Lederberg, die in 1958 de Nobelprijs kreeg voor zijn werk aan bacteriële genetica, treffend schreef (Lederberg-2000): "Our wits against their genes". En niet toevallig kom ik via deze uitspraak bij onze studenten.

Studenten

Vanaf deze plaats wil ik enige woorden richten tot de studenten onder u die een carrière overwegen in de biologie, infectieziekten, of geneeskunde. Men zegt dat dit de eeuw van de biologie wordt. Mogelijk wat overdreven, maar ik ben er van overtuigd dat de biologie, en ook de infectieziekten, de komende 20 tot 30 jaar ons leven steeds meer zullen beïnvloeden. Toch stelt de politiek relatief weinig geld ter beschikking voor onderzoek. En voor jonge onderzoekers is het moeilijk om een vaste plek in de Nederlandse wetenschap te bemachtigen. Daar zijn al vele woorden aan gewijd, hopelijk volgen er nu eindelijk wat daden. Zoals bijvoorbeeld in Frankrijk waar het budget van INSERM, een Franse biomedische instelling, met 16 procent is verhoogd. In Engeland, waar het budget voor basaal onderzoek in de komende drie jaar met ruim 3 miljard gulden verhoogd wordt. In Canada, waar 400 miljoen gulden geïnvesteerd wordt in genomics. In de VS, waar het budget voor de National Institute of Health aanzienlijk verhoogd zal worden. De bloei van biomedisch onderzoek in de landen om ons heen zal ongetwijfeld veel talent wegzuigen uit Nederland. We moeten de politiek ervan overtuigen dat we er zonder uw vernuft, uw 'wits', niet komen.

Literatuur

- Armstrong GL, Conn LA, Pinner Y. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *J Am Med Assoc* 1999;281:61-6.
- Belcher CE, Drenkow J, Kehoe B, et al. The transcriptional responses of respiratory epithelial cells to *Bordetella pertussis* reveal host defensive and pathogen counter-defensive strategies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:13847-52.
- Bik EM, Bunschoten AE, Gouw RD, Mooi FR. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. *EMBO J* 1995;14:209-16.
- Bik EM. Cholera. Vaccine development and evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Academisch proefschrift*. Utrecht 1996. ISBN 90-90091-73-4.
- Bootsma HJ. Emergence of β -lactam resistance in *Moraxella catarrhalis*. *Academisch proefschrift*. Utrecht 1999. ISBN 90-393-2201-5.
- Bootsma HJ, van Dijk H, Vauterin P, Verhoef J, Mooi FR. Genesis of BRO β -lactamase-producing *Moraxella catarrhalis*: evidence for transformation-mediated horizontal transfer. *Molec Microb* 2000;36:93-104.
- Cassidy P, Sanden G, Heuvelman K, Mooi FR, Bisgard K, Popovic T. Polymorphism in *Bordetella pertussis* pertactin and pertussis toxin virulence factors in the United States, 1935-1999. *J Infect Dis* 2000;182:1402-8.
- De Melker HE, Schellekens JFP, Neppelenbroek SE, Mooi FR, Rümke HC, Conyn-van Spaendock MAE. Re-emergence of pertussis in the highly vaccinated population of The Netherlands: observations on surveillance data. *Emerging Infect Diseases* 2000;6:348-57.
- Fleischmann RD, Adams MD, White O, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Rd. Science* 1995;269:496-512.
- Hahn BH, Shaw GM, de Cock KM, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 2000;287:607-14.
- International human genome sequencing consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001;409:860-921.
- Lederberg J. Infectious history. *Science* 2000;288:287-93.
- Mastrantonio P, Spigaglia P, van Oirschot H, et al. Antigenic variants in *Bordetella pertussis* strains isolated from vaccinated and unvaccinated children. *Microbiology* 1999;145:2069-75.
- Mink CM, Cherry JD, Christenson PD, et al. A search for *Bordetella pertussis* infection in university students. *Clin Infect Dis* 1992;14:471-4.
- Mooi FR, Bik EM. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trends Microbiol* 1997;5:161-5.
- Mooi FR, van Oirschot H, Heuvelman K, van der Heide HGJ, Gaastra W, Willems RJJ. Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P.69/pertactin and pertussis toxin in the Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *Infect Immun* 1998;66:670-5.
- Mooi FR, He Q, van Oirschot H, Mertsola J. Variation in the *Bordetella pertussis* virulence factors pertussis toxin and pertactin in vaccine strains and clinical isolates in Finland. *Infect Immun* 1999;67:3133-4.
- Pizza M, et al. Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 2000;287:1816-20.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, et al. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9869-74.
- Van Valen LM. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1973;1:1-30.
- Van der Zee A, Mooi FR, van Embden JDA, Musser J. Molecular evolution and host adaptation of *Bordetella* spp: Phylogenetic analysis using multilocus enzyme electrophoresis and typing with three insertion sequences. *Infect Immun* 1997;179:6609-17.
- Venter JC, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001;291:1305-51.
- Willems RJJ, Mooi FR. From whole cell to acellular vaccines. *Reviews in Medical Microbiology* 1996;7:13-21.
- Wilson M, DeRisi J, Kristensen H, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:12833-8.
- WHO. Removing obstacles to healthy development. World Health Organization, Geneva, 1999.

Uitreiking Interbrew-Baillet Latour Prijs

De *Interbrew-Baillet Latour Prijs ter Bevordering van de Gezondheid* is een jaarlijkse internationale prijs met als doel een erkenning te zijn voor een uitzonderlijke bijdrage in de verbetering van de menselijke gezondheid. Dit jaar werd de prijs toegekend aan dr. Jan van Embden, verbonden aan het Laboratorium voor Infectieziekten Onderzoek van het RIVM. De prijs is toegekend vanwege de belangrijke bijdragen die dr. van Embden heeft geleverd op het gebied van tuberculosebestrijding, en de rol van zogeheten heat-shock-eiwitten bij artritis. In 1993 werd tuberculose door de WHO als een van de grote bedreigingen van de gezondheid genoemd. Naar schatting is één derde van de wereldbevolking, tweemiljard mensen, besmet met tuberculose, en per jaar sterven drie miljoen mensen aan tuberculose. Dr. van Embden is in 1980 gestart met het tuberculoseonderzoek, in een periode dat de ziekte nog niet zo in de belangstelling stond. Aanvankelijk richtte zijn onderzoek zich op heat-shock-eiwitten de veroorzaker van tuberculose, *Mycobacterium tuberculosis*. Dit leidde tot de ontdekking van de rol van deze eiwitten in immuniteit en artritis. Dit onderzoek, uitgevoerd in samenwerking met prof. van Eden (Universiteit Utrecht) en Prof. Cohen (Weizmann Instituut, Israël), heeft geleid tot een geheel nieuw onderzoeksveld dat zich richt op de rol van heat-shock-eiwitten in infectieziekten.

Een tweede gebied waarin dr. van Embden een zeer belangrijke bijdrage heeft geleverd, is de moleculaire epidemiologie van tuberculose. Zijn onderzoek heeft in belangrijke mate

bijgedragen aan een beter begrip van de verspreiding van tuberculose de laatste 10 jaar. Samen met dr. Peter Hermans, dr. Dick van Soolingen en dr. Leo Schouls ontwikkelde dr. van Embden moleculaire methoden voor de bestudering van transmissie van tuberculose, die nu wereldwijd als standaard zijn geaccepteerd. Deze methoden worden nu ook toegepast bij epidemiologisch onderzoek aan andere pathogenen. De toepassing van deze methoden hebben ertoe geleid dat men de oorzaken van de toenames in tuberculose kon opsporen, en gericht kon bestrijden. De groep van dr. van Embden was ook een van de eerste die het belang van het Internet inzag bij infectieziektebestrijding.

Dr. van Embden heeft een belangrijk bijdrage geleverd aan de coördinatie van internationaal onderzoek en training. Hij heeft verschillende Europese projecten geïnitieerd en geleid. Verder werd hij veelvuldig geraadpleegd als tuberculose-expert door de WHO. Ondanks zijn vele activiteiten die ten koste gingen van zijn eigen onderzoek, heeft dr. van Embden meer dan 150 publicaties op zijn naam staan. Veel onderzoekers van ontwikkelingslanden zijn voor korte of langere tijd te gast geweest in het laboratorium van dr. van Embden. Op deze wijze is de kennis die is ontwikkeld in zijn groep ook ten goede gekomen aan die landen waar tuberculose zijn meeste slachtoffers maakt.

Prof. dr. F.R. Mooi

Koninklijke onderscheiding voor prof. dr. C.P.A. van Boven

Op 11 juni 2001 ontving prof. dr. C.P.A. van Boven de versierselen behorende bij zijn benoeming tot Officier in de Orde van Oranje-Nassau. Het waren vooral zijn grote verdiensten op het gebied van het medisch onderwijs in Maastricht en in Leiden en zijn activiteiten binnen de Medisch Specialisten Registratie Commissie (MSRC) die aanleiding gaven hem koninklijk te onderscheiden.

Cees P.A. van Boven is geboren in 1932 en na zijn studie geneeskunde aan de Rijksuniversiteit Leiden specialiseerde hij zich in de medische microbiologie (registratie 1966). Hij is wetenschappelijk medewerker geweest aan de universiteiten te Nijmegen (prof. dr. J. van der Veen), te Utrecht (prof. dr. K.C. Winkler) en te Rotterdam (prof. dr. M.F. Michel). Begin jaren zeventig was hij Fullbright Fellow aan de universiteit van Chicago.

Van 1975 tot 1991 was Van Boven hoogleraar medische microbiologie aan de Rijksuniversiteit Limburg te Maastricht, en van 1991 tot 1997 hoogleraar medische microbiologie aan de Rijksuniversiteit Leiden. Hij is in deze periode zeer actief

geweest in het medisch onderwijs, zowel voor wat betreft de artsenopleiding als de opleiding van specialisten. Zo was hij in Maastricht onder andere lid van het bestuur van de medische faculteit, aandachtsgebied onderwijs (1979-1981), voorzitter onderwijscommissie (1981-1984) en voorzitter van de vaste commissie voor de examens (1984-1990) en is hij in Leiden sinds 1998 voorzitter van de Projectgroep Vernieuwing Onderwijs van het LUMC. In de jaren tachtig was hij lid en voorzitter van het bestuur van de Stichting Zuid-Limburgse Laboratoriumschool Sittard, waar hij ook gastdocent was. Wat de specialistenopleiding betreft was hij van 1980 tot 2000 lid van de MSRC en van 1986 tot 2000 was hij lid van de Commissie van Uitvoering van de MSRC. Bij zijn afscheid van de MRSC zijn de verdiensten van Van Boven door de voorzitter uitgebreid gememoreerd. In het Concilium Microbiologicum Medicum (1975-1999) was hij lid, secretaris en voorzitter. Sedert 1996 is hij voorzitter van de Commissie Nascholing van de NVMM en lid van de Algemene Visitatie Commissie.

Ook bestuurlijk is Van Boven zeer actief geweest. Hij was onder andere voorzitter van de Sectie Medische Microbiologie van de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (1980-1985), lid van het Hoofdbestuur van de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie (1983-1985), lid van het bestuur van de Nederlandse Vereniging voor Infectieziekten (1986-1994) en lid en voorzitter van het Bestuur van de Stichting Infectieziekten (1990-1995). Cees van Boven heeft zich - naast zijn gewaardeerde zuiver

professionele activiteiten als arts-microbioloog en hoogleraar medische microbiologie – bijzonder ingezet. Hij deed dat altijd op zeer aimabele wijze.

Wij feliciteren hem met deze eervolle onderscheiding.

Dr. M.F. Peeters, arts-microbioloog, voorzitter Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, St. Elisabeth Ziekenhuis, Postbus 747, 5000 AS Tilburg

PERSONALIA

Nieuwe aanmeldingen NVMM

- Dr. W. Bitter, Melkhoeve 59, 3992 XS Houten
- Prof. dr. O.P. Kuipers, Rijksuniversiteit Groningen, Afd. Moleculaire Genetica, Kerklaan 30, 9751 NN Haren
- Dr. C.W. Ang, Academisch Ziekenhuis Rotterdam, Afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam
- Dhr. S.M.M.P. Verheesen, P. de Beaufortstraat 1, 6231 EB MEERSSEN

Adreswijzigingen

- Mw. dr. L. Dijkshoorn-Bruin, Leids Universitair Medisch Centrum, Afd. Infectieziekten C5-P, Postbus 9600, 2300 RC Leiden (voorheen Afd. Medische Microbiologie)
- A.L.W. de Gee, Gezondheidsdienst voor Dieren, Postbus 9, 7400 AA Deventer, (voorheen Gezondheidsdienst voor Dieren in Drachten)

PROMOTIES

9 mei 2001

E.L.M. op de Coul

Epidemiological trends of HIV shown through phylogenetic trees. Promotoren: prof. dr. R.A. Coutinho, prof. dr. J. Goudsmit. Co-promotor: dr. M. Cornelissen. Universiteit van Amsterdam, GGGD, sector Volksgezondheid en Milieu; AMC, vakgroep Humane Retrovirologie.

29 mei 2001

F.P. de Vries

Colonization and invasion of human epithelia by *Neisseria meningitidis*. Promotoren: prof. dr. J. Dankert, prof. dr. J.P.M. van Putten. Universiteit van Amsterdam, AMC, afd. Medische Microbiologie.

7 juni 2001

G. Vreugdenhil

Enteroviruses and type 1 diabetes mellitus; putative pathogenic pathways. Promotor: prof. dr. J.M.D. Galama. Co-promotor: dr. W. Melchers. Universitair Medisch Centrum St. Radboud, vakgroep Medische Microbiologie.

11 juni 2001

R. Mang

Endogenous retroviruses and xenotransplantation. Promotor: prof. dr. J. Goudsmit. Co-promotor: dr. A.C. van der Kuyl. Universiteit van Amsterdam, AMC, afd. Humane Retrovirologie.

19 juni 2001

M.Y. Tjong

Aspects of mucosal immunity in patients with HPV related cervical neoplasia. Promotor: prof. dr. M.P.M. Burger. Co-promotor: dr. N. van der Vauge. Universiteit van Amsterdam, AMC, afd. Verloskunde/Gynaecologie.

26 juni 2001

S. Kostense

Mechanisms of decreasing HIV-1 specific CD8+ T cell activity during progression to AIDS. Promotor: prof. dr. F. Miedema. Universiteit van Amsterdam, AMC, Sanquin - CLB.

18 september 2001

B.H.B. van Benthem

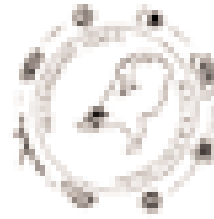
Epidemiological studies of HIV-infection in women. Promotor: prof. dr. R.A. Coutinho. Co-promotor: dr. M. Prins. Universiteit van Amsterdam, GGGD, sector Volksgezondheid en Milieu.

ORATIE

2 februari 2001

prof. dr. J. Galama

Virussen/paradox van preventie. Hoogleraar in de Virologie, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, vakgroep Medische Microbiologie.



Wetenschappelijke najaarsvergadering 2001

Gemeenschappelijke vergadering van de NVMM en de VIZ

Donderdag 15 november

Jaarbeurs Utrecht

PROGRAMMA:

9.00 – 9.25 uur	Koffie
9.25 uur	Opening
9.30 – 10.15 uur	Prof. D. Morrison (Chicago): <i>"The impact of bacterial genomics"</i>
10.15 – 11.00 uur	Prof. G. van Ommen (Leiden): <i>"The impact of human genomics"</i>
11.00 – 11.45 uur	Prof. D. Back (Liverpool): <i>"Pharmacogenetics and the perspectives for the treatment of infectious diseases."</i>
11.45 – 12.30 uur	Prof. J.P. Vandenbroucke: <i>"Genomics: the future of medicine?"</i>
12.30 – 14.00 uur	Lunch
12.45 – 13.45 uur	Huishoudelijke vergadering VIZ
14.00 – 15.30 uur	Vrije voordrachten
15.30 – 16.00 uur	Koffie/theepauze
16.00 – 18.00 uur	Huishoudelijke vergadering NVMM

Kosten lunch: f 25,- p.p. (contant te betalen op 15 november 2001)

Opgave deelname lunch (verplicht!) voor 1 november 2001 bij:

Janny de Haan, Secretariaat NVMM
Laboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland
Postbus 21020, 8900 JA LEEUWARDEN
tel: (058) 293 94 95, fax: (058) 293 92 00
e-mail: nvmm@knmg.nl

1 - 5 SEPTEMBER 2001:

11th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms,

Freiburg, Duitsland. Inf.: Prof. dr. Manfred Kist, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg, Duitsland. Tel.: +49 761 203 6590, fax: +49 761 203 6562, e-mail: kistman@ukl.uni-freiburg.de, Internet: www.chro2001.de.

2 - 5 SEPTEMBER 2001:

Najaarsvergadering European Society for Clinical Virology (ESCV),

Lahti, Finland. Inf.: Dr. J. Schirm, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Postbus 30039, 9700 RM Groningen. Tel.: (050) 512 51 60, fax: (050) 527 14 88, e-mail: schirmjsg@compuserve.com, Internet: www.escv.org.

2 - 6 SEPTEMBER 2001:

Second International Eijkman Symposium 'Tropical diseases: from molecule to bedside',

Bogor, Indonesië. Inf.: Harm Snippe, Eijkman-Winkler Instituut, Heidelberglaan 100, UMC G04.614, 3584 CX Utrecht. Tel.: (030) 250 75 28, fax: (030) 254 17 70, e-mail: H.Snippe@lab.azu.nl, Internet: www.ewi.med.uu.nl/symposium.

16 - 19 SEPTEMBER 2001:

6th International Montecarlo Symposium on Microbial Strategies and Antimicrobial Defences,

Montecarlo, Monaco. Inf.: EAC, Milaan, Italië. Tel.: +39 025 990 2320, fax: +39 025 990 0758, e-mail: montecarlo@eac.it, Internet: www.eac.it/montecarlo2001.htm.

17 - 21 SEPTEMBER 2001:

Pseudomonas 2001,

Palace for Congresses, Brussel, België. Inf.: Dr. Pierre Cornelis, Afd. Immunologie, Parasitologie en Ultrastructuur, Lab. of Microbial Interactions (MINT, IMOLI), Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology, Vrije Universiteit Brussel, St. Genesius Rode, België. Tel.: +32 2 359 0221, fax: +32 2 3590390, e-mail: pcorne@vub.ac.be, Internet: http://homepages.vub.ac.be/~pcornel/pseudomonas2001.htm.

22 - 25 SEPTEMBER 2001:

41st International Conference on Antimicrobial Agents & Chemotherapy (ICAAC),

Chicago, Illinois, USA. Inf.: ASM Conferences, Washington DC, USA. Tel.: +1 202 942 92 48, fax: +1 202 942 93 40, e-mail: meetingsinfo@asmusa.org, Internet: www.asmusa.org.

30 SEPTEMBER - 4 OKTOBER 2001:

53th Meeting of the German Society for Hygiene and Microbiology,

Aken, Duitsland. Inf.: Prof. Luetticken, Institut für Med. Mikrobiologie, Aachen, Duitsland. Tel.: +49 241 808 95 10, fax: +49 241 808 94 83, e-mail: wiss-info@dghm-2001.de, Internet: www.dghm-2001.de.

9 OKTOBER 2001:

Bijeenkomst Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie, Streeklaboratorium Haarlem. Inf.: Dr. J. Schirm, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Postbus 30039, 9700 RM Groningen. Tel.: (050) 512 51 60, fax: (050) 527 14 88, e-mail: schirmjsg@compuserve.com.

11 - 12 OKTOBER 2001:

European Meeting on Molecular Diagnostics,

Kurhaus Hotel, Scheveningen. Inf.: Wens Congress, Baarn. Tel.: (035) 542 93 33, fax: (035) 542 94 44, e-mail: molecule@wens.nl, internet: www.wens.nl/molecule.

14 - 17 OKTOBER 2001:

Resistance to Antimicrobial Agents,

Cannes, Frankrijk. Inf.: e-mail: microbiologia@ospedalesacco.lom.it, Internet: www.omegastudio.com.

21 - 24 OKTOBER 2001:

2nd International Meeting on Antimicrobial Chemotherapy and Clinical Practice,

Portofino, Italië. Inf.: Dante Bassetti, Genoa, Italië. Tel.: +39 010 555 2668, fax: +39 010 555 2614, e-mail: mattba@tin.it.

24 - 27 OKTOBER 2001:

Joint Meeting: 3rd IFIC (International Federation of Infection Control) Congress and 10th ESIC (Egyptian Society of Infection Control) Conference,

Cairo, Egypte. Inf.: Prof. Ossama Rasslan, ESIC, Cairo. Tel.: +20 2 2484 2562, fax: +20 2 684 6899, e-mail: ossama-rasslan@hotmail.com.

27 - 30 OKTOBER 2001:

2nd International Meeting in Antimicrobial Chemotherapy in Clinical Practice,

Genève, Italië. Inf.: Prof. Dante Bassetti, Congress Studio International, Milaan, Italië. Tel.: +39 02 3360 4949, fax: +39 02 3360 4939.

1 - 4 NOVEMBER 2001:

32nd IUATLD World Conference on Lung Health,

Parijs, Frankrijk. Inf.: Colloquium/IUATLD, Parijs, Frankrijk. Tel.: +33 1 44 64 1515, fax: +33 1 44 64 1516, e-mail: c.briot@colloquium.fr, Internet: www.iuatld.org.

15 NOVEMBER 2001:

Wetenschappelijk Najaarsvergadering 2001 van de NVMM en de VIZ,

Jaarbeurs Utrecht. Inf.: Janny de Haan, secretariaat NVMM, Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden. Tel.: (058) 293 94 95, fax: (058) 293 92 00, e-mail: nvmm@knmg.nl.

18 - 21 NOVEMBER 2001:

Meeting RAA2001 'Resistance to Antimicrobial Agents',
Cannes, Frankrijk. Onder auspiciën van de International Society
of Chemotherapy. Inf.: Prof. Maria Rita Gismondo, OMEGA
Studio, Milaan, Italië. Tel.: +39 02 349 4935,
fax: +39 02 331 5959, e-mail: raa2001@omegastudio.com,
Internet: www.raa2001.com.

14 DECEMBER 2001

Infectieziekten Symposium Amsterdam (VI),
Academisch Medisch Centrum, Amsterdam. Onderwerpen:
HIV, malaria, tbc. Kosten: geen. Inf.: Nicolaes Tulp Instituut.
Tel.: (020) 566 85 85, fax: (020) 696 32 28,
e-mail: tulpinst@amc.uva.nl.

7 - 9 JANUARI 2002:

**European Society for Clinical Virology (ESCV) Winter
Meeting 2002,**
Londen, UK.

9 - 11 JANUARI 2002:

**European Society for Clinical Virology (ESCV) Winter
Meeting,**
Londen, Engeland. Inf.: Dr. J. Schirm, Streeklab. voor de
Volksgezondheid, Postbus 30039, 9700 RM Groningen.
Tel.: (050) 512 51 60, fax: (050) 527 14 88,
e-mail: schirmjsg@compuserve.com, internet: www.escv.org.

7 - 9 APRIL 2002:

12th Annual Scientific Meeting of SHEA,
Salt Lake City, Utah, USA. Inf.: SHEA Meetings Department,
New Jersey, USA. Fax: +1 856 423 3420.

9 - 10 APRIL 2002:

**Voorjaarsvergadering Nederlandse Vereniging voor
Microbiologie,**
Papendal. Inf.: Dr. E. Boel, Stichting PAMM, Laboratorium voor
Medische Microbiologie, Postbus 2, 5500 AA Veldhoven.
Tel.: (040) 258 81 00, fax: (040) 258 81 12.

24 - 27 APRIL 2001:

**12th European Congress of Clinical Microbiology and
Infectious Diseases (ECCMID 2002),**
Milaan, Italië. Inf.: Administrative Secretariat, c/o AKM
Congress Service, Basel, Zwitserland. Tel.: +41 61 686 7711,
fax: +41 61 686 7788, e-mail: info@akm.ch,
Internet: www.esccmid.org/eccmid2002.

5 - 8 MEI 2002:

**4th European Congress of Chemotherapy and Infection
(ECC),**
Parijs, Frankrijk. Inf.: Congrex Sweden AB, Stockholm, Zweden.
Tel.: +46 8459 6600, fax: +46 8 661 9125,
e-mail: congrex@congrex.se, Internet: www.congrex.se/ecc-4.

28 JULI - 2 AUGUSTUS 2002:

**European Society for Clinical Virology (ESCV) Summer
Meeting,**
The International Congress of Virology, Paris, France. Inf.: Dr. J.
Schirm, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Postbus 30039,
9700 RM Groningen. Tel.: (050) 512 51 60, fax: (050) 527 14 88,
e-mail: schirmjsg@compuserve.com, internet: www.escv.org.

15 - 18 SEPTEMBER 2002:

**Fifth International Conference of the Hospital Infection
Society,**
Edinburgh International Conference Centre, Edinburgh, UK.
Inf.: Concorde Services, HIS2002, Unit 4b, 50 Speirs Wharf,
Port Dundas, Glasgow G4 9TB, Scotland UK.
Tel.: +44 (0) 141 331 0123, fax: +44 (0) 141 331 0234,
e-mail: his@concorde-uk.com, internet: www.his2002.co.uk.

JANUARI 2003:

**European Society for Clinical Virology (ESCV) Winter
Meeting,**
Lissabon, Portugal. Inf.: Dr. J. Schirm, Streeklab. voor de
Volksgezondheid, Postbus 30039, 9700 RM Groningen.
Tel.: (050) 512 51 60, fax: (050) 527 14 88,
e-mail: schirmjsg@compuserve.com, internet: www.escv.org.

6 - 8 APRIL 2003:

13th Annual Scientific Meeting of SHEA,
Arlington, Virginia, USA. Inf.: SHEA Meetings Department,
New Jersey, USA. Fax: +1 856 423 3420.

NEDERLANDSE VERENIGING VOOR MEDISCHE MICROBIOLOGIE – PRIJS

De NVMM-prijs wordt eens in de twee jaar uitgereikt aan een in het Nederlands taalgebied werkzame onderzoeker op grond van zijn/haar research op het gebied van infectieziekten bij de mens, in het bijzonder aangaande het ontstaan, de preventie of de behandeling ervan. De resultaten van het onderzoek dienen



een wezenlijke bijdrage te hebben geleverd aan de literatuur van het vakgebied van de medische microbiologie. De prijsuitreiking zal plaatsvinden tijdens de Voorjaarsvergadering van de NVMM/NVvM op 10 april 2002, alwaar de winnaar een presentatie zal houden over zijn of haar werk.

De jury vraagt u vóór 31 januari 2002 kandidaten voor te dragen voor de NVMM-prijs.

De voordracht van een kandidaat moet worden ingediend bij het secretariaat van de NVMM-prijs, vergezeld van een korte argumentatie, curriculum vitae, publicaties en/of proefschrift in zesvoud.

De NVMM-prijs bestaat uit een bedrag van f 10.000,- (€ 4.538) aangeboden door

Aventis Pharma B.V.

Secretariaat NVMM-prijs

Aventis Pharma B.V., t.a.v. dhr. Dr. H.G.J. Hoedemaker
Postbus 100, 3871 JJ HOEVELAKEN, tel.: 033 – 253 31 61

Jury

Prof. dr. J. Dankert (AMC), Dr. A. Fleeer, voorzitter (UMCU, loc. WKZ),
Prof. dr. F.R. Mooi (RIVM), Prof. dr. A.D.M.E. Osterhaus (AZR Dijkzigt),
Dr. P.E. Verweij (UMC St. Radboud), Dr. H.G.J. Hoedemaker (Aventis Pharma B.V.)