

Visie

Editorial

Richtlijnen mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek

F. Vlaspolder

Infecties geassocieerd met biomaterialen

A. Fleer

Van de redactie

Artikelen

Het gebruik van DNA-fingerprinting om transmissie van tuberculose te onderzoeken

D. van Soolingen, K. Kremer

Immunologie en immunogenetica van tuberculose: op weg naar nieuwe effectieve vaccins?

T.H.M. Ottenhof

Nieuwe inzichten in de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties

S.A.J. Zaat, J.J. Boelens, J. Dankert

Infectieuze complicaties van continue peritoneale dialyse

C.W.H. de Fijter, H.A. Verbrugh

Diagnostiek en behandeling van antistofdeficiënties

E. de Vries, A. Fleer

Rubrieken

Ingezonden

Werkgroepen en verenigingen

Personalia

Promoties

Agenda

Index negende jaargang

Richtlijnen voor auteurs

1

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. A. Fleer/ Dr. T. van Gool/
Dr. A.M. Horrevorts/Mw. L.M. Kortbeek/
Dr. J.G. Kusters/ 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

€ 34,- per jaar voor niet-leden van de NVMM,
Europa € 41,- per jaar, losse nummers € 10,20.
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., 2002
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoelvoudigd, 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	2
Editorial	
Richtlijnen mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek <i>F. Vlaspolder</i>	3
Infecties geassocieerd met biomaterialen <i>A. Fleer</i>	4
Van de redactie	5
Artikelen	
Het gebruik van DNA-fingerprinting om transmissie van tuberculose te onderzoeken <i>D. van Soolingen, K. Kremer</i>	6
Immunologie en immunogenetica van tuberculose: op weg naar nieuwe effectieve vaccins? <i>T.H.M. Ottenhof</i>	11
Nieuwe inzichten in de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties <i>S.A.J. Zaat, J.J. Boelens, J. Dankert</i>	17
Infectieuze complicaties van continue peritoneale dialyse <i>C.W.H. de Fijter, H.A. Verbrugh</i>	25
Diagnostiek en behandeling van antistofdeficiënties <i>E. de Vries, A. Fleer</i>	29
Rubrieken	
Ingezonden	33
Werkgroepen en verenigingen	34
Personalia	34
Promoties	35
Agenda	36
Index negende jaargang	37
Richtlijnen voor auteurs	38

De toekomst van de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Microbiologie (SKMM)

De Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Microbiologie (SKMM) is opgericht in 1981. Zij heeft volgens de statuten ten doel "het bevorderen van de kwaliteit van de uitoefening van het specialisme medische microbiologie, zowel voor wat betreft het diagnostisch onderzoek in de laboratoria als voor wat betreft het daarmee verbonden therapeutisch en preventief functioneren".

Naar de mening van onze beroepsgroep dient de kwaliteitsbewaking van medisch-microbiologische diagnostiek het gehele traject van aanvraag, laboratoriumdiagnostiek, interpretatie en consult te omvatten. Het vormt op deze manier de inhoudelijke toetsing van het kwaliteitssysteem dat weliswaar de procedures, verantwoordelijkheden etc. beschrijft maar niet q.q. de kwaliteit van het product toetst. Deelnemers aan de SKMM-rondzendingen kunnen slechts artsen zijn die als specialist in de medische microbiologie in het specialistenregister staan ingeschreven en als zodanig daadwerkelijk in laboratoria voor medische microbiologie werkzaam zijn. Door op dergelijke wijze te functioneren werd het vakgebied afgeschermd. De SKMM heeft tot op heden goed gefunctioneerd.

Het bestuur van de SKMM, thans onder voorzitterschap van collega dr. L.J.M. Sabbe, heeft het bestuur van de NVMM ervan overtuigd dat de SKMM in zijn huidige opzet onvoldoende toekomst heeft. De SKMM is dringend toe aan een reorganisatie van haar activiteiten. De organisatie moet worden geprofessionaliseerd, met name op het gebied van de logistiek (verzending, administratie, rapportage) en statistische ondersteuning. Het SKMM-bestuur meent dat dé manier om een kwaliteitsbewakende organisatie te houden die professioneel en betaalbaar is, is om alle organisaties op het gebied van kwaliteitsbewaking in de medische laboratoriumdiagnostiek binnen Nederland te bundelen.

Samen met Stichting Kwaliteitsbewaking Ziekenhuis Laboratoria (SKZL), Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Immunologie (SKMI), Stichting Immunofenotypering Hematologische Oncologie Nederland (SIHON), Stichting Kwaliteitscontrole Pathologie (SKKP), Stichting Parasitologisch Laboratoriumdiagnostiek (SPLD), Stichting Subcommissie Stolling (SSS) en Stichting Kwaliteitscontrole Klinische Geneesmiddelenonderzoek en Toxicologie (KKG) heeft de SKMM een intentieverklaring opgesteld tot de oprichting van een overkoepelende organisatie: de Stichting Kwaliteitsbewaking Medische Laboratoria (SKML), kortom een nieuwe organisatie voor externe kwaliteitsbewaking in de medische laboratoriumdiagnostiek. Binnen de SKML zouden in totaal 14 secties ontstaan. De SKMM zou worden opgesplitst in drie secties: bacteriologie (inclusief mycologie), virologie en infectieziekten-serologie. De secties opereren vakinhoudelijk zoveel mogelijk zelfstandig. Ze hebben een eigen bestuur, bestaande uit een vooraf vastgesteld aantal leden die afkomstig zijn uit de relevante beroepsgroepen. Zonder te willen ingaan op verdere details in de voorgestelde bestuursstructuur van de nieuw op te richten Stichting, viel het bij het bestuur (en een aantal leden) van de NVMM niet in goede aarde dat in het bestuur van de sectie infectieziekten-serologie werd geparticipeerd door een lid van de NVKC (naast 4 leden van de NVMM, 1 lid van de NVB, 1 lid van de NVVI). Het staat klinisch chemici vrij te participeren in rondzendingen op het gebied van de infectieziekten-serologie. Wij menen dat alleen de beoefenaren van het specialisme medische microbiologie (eind-)verantwoordelijk zijn voor de infectieziekten-diagnostiek en dat de infectieziekten-diagnostiek inclusief infectieziekten-serologie tot het kennisgebied van het specialisme medische microbiologie behoort. De voorgestelde structuur was dan ook in eerste instantie voor het bestuur van de NVMM niet acceptabel. Op 6 februari jl. heeft het bestuur van de NVMM overlegd met het bestuur van de NVKC in vervolg op een overleg in mei 2001.

Gezien de wens van diverse gremia voor externe kwaliteitsborging om gezamenlijk de SKML te stichten, acht het bestuur van de NVMM het noodzakelijk dat ook de NVKC zich uitsprekt over het kennisgebied van de klinisch chemicus. De NVMM stelt zich daarbij op het standpunt dat een dergelijke visie doorwerkt in de opleiding tot arts-microbioloog of klinisch chemicus en de daartoe geformuleerde eisen. Ergo: iets dat niet behoort tot een kennisgebied van een bepaalde groepering behoort ook niet in de opleidingseisen voor te komen. Een en ander dient uiteraard los te staan van gebruikte technieken, die in verschillende vakgebieden met een verschillend kennisgebied kunnen worden toegepast. Alle aanwezige bestuursleden van de NVKC geven aan dat interpretatie van infectiologische diagnostiek niet tot het kennisgebied van de klinisch chemicus behoort, maar tot dat van de arts-microbioloog. De eenheid van bepaling en interpretatie, zoals de medische microbiologie die voorstaat, hoeft van hen niet zo strikt te zijn. De besturen zijn van mening dat een duidelijk standpunt dient te worden uitgedragen binnen beide verenigingen, zodat op die

locaties waar er een probleem speelt inzake infectieziekten-diagnostiek vanuit de gezamenlijke verenigingsbesturen een bemiddelende rol gespeeld kan worden, op basis van de geuite standpunten. Van de huidige eisen die gesteld worden aan de opleiding tot klinisch chemicus maakt de infectiologie geen deel uit. Gezien de geuite standpunten, met name dat de eindverantwoordelijkheid voor de infectieziekten-serologie bij de arts-microbioloog ligt, denkt het bestuur van de NVMM dat verdere uitwerking kan worden gegeven aan een op te richten SKML.

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

Richtlijnen mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek

In verband met het thema over tuberculose wil ik graag van deze gelegenheid gebruik maken om U op de hoogte te stellen van de opdracht van uit de commissie Kwaliteit van onze vereniging om een werkgroep samen te stellen met als taak te komen tot richtlijnen mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek. De richtlijnontwikkeling heeft de laatste jaren steeds meer een centrale plaats gekregen als het gaat om de medisch-technische aspecten van de kwaliteit van het medisch specialistisch handelen. Richtlijnen vormen tevens een belangrijk onderdeel van de medisch specialistische opleidingen en van de bij- en nascholing van medisch specialisten. De richtlijnontwikkeling en implementatie is de verantwoordelijkheid van de wetenschappelijke verenigingen van erkende medische specialisten. In het bijzonder zullen zij daaraan vormgeven vanuit de commissie kwaliteit van de wetenschappelijke vereniging of de werkgroep richtlijnen. De werkgroep is inmiddels gevormd en bestaat uit de volgende leden: Mw. A. van Duin, arts-microbioloog (secretaris), dr. C.S.B. Lambregts-van Weezenbeek, arts-consulent tuberculosebestrijding, namens de KNCV, dr. A. Buiting, arts-microbioloog, voorzitter commissie Kwaliteit NVMM, dr. W. de Lange, longarts namens de NVALT, dr. D. van Soelingen, microbioloog, verbonden aan het RIVM, hoofd laboratorium Mycobacteriële diagnostiek, dr. C. Richter, internist-infectioloog, namens de NIV en dr. F. Vlaspolter, arts-microbioloog, voorzitter.

Werd een richtlijn de afgelopen jaren veelal op basis van consensus opgesteld, tegenwoordig zal een werkgroep zich meer moeten verantwoorden voor haar uitspraken en aanbevelingen. De nadruk is meer komen te liggen op de wetenschappelijke onderbouwing (evidence-based), zodat de totstandkoming van een richtlijn transparanter is geworden. De werkgroep maakt daartoe gebruik van meta-analyses, systematische reviews en uiteraard de reeds bestaande richtlijnen. Voor literatuurzoekacties wordt gebruik gemaakt van o.a. Medline, Pubmed en de database van het Cochrane Center. Nadat de werkgroepleden de literatuur hebben geanalyseerd, worden de gegevens in een tabelvorm ingedeeld naar de mate van bewijskracht (level of evidence). Hieruit volgen dan de conclusies en aanbevelingen.

Voor alle duidelijkheid: deze manier van werken waarbij de literatuur ontsloten wordt, en vervolgens geordend en gewogen, onthefte de werkgroep niet van de taak te zoeken naar, en eventueel gebruik te maken van, ander betrouwbaar feitenmateriaal. U wordt dan ook opgeroepen om uw medewerking te verlenen aan een enquête, die U binnenkort zult ontvangen, teneinde een goed inzicht te krijgen hoe microbiologisch Nederland tb-diagnostiek bedrijft. Het streven van de werkgroep zal zijn om U, zoveel als mogelijk is, op de hoogte te houden van de ontwikkelingen binnen de werkgroep.

Dr. F. Vlaspolter, arts-microbioloog, Medisch Centrum Alkmaar, Wilhelminalaan 12, 1815JD Alkmaar

Infecties geassocieerd met biomaterialen

Biomaterialen hebben een belangrijke bijdrage geleverd aan de ontwikkeling van de moderne geneeskunde. Veel medische handelingen zouden zonder het gebruik van katheters niet meer mogelijk zijn. Hemodialyse en peritoneaaldialyse hebben de behandeling van patiënten met chronisch nierlijden ingrijpend veranderd. Prothetische gewrichten en hartkleppen hebben het therapeutisch arsenaal van de orthopedie respectievelijk hartchirurgie aanzienlijk uitgebreid. Niet alleen hebben biomaterialen in significante mate bijgedragen (en dragen zij nog steeds bij) tot de ontwikkeling van de geneeskunde, ook de 'hardware' zelf, de biomaterialen dus worden steeds verder ontwikkeld. Van *bio-compatible* en *bio-inert* is nu de ontwikkeling ingeslagen naar *bio-active* en *biodegradable* materialen.

Een keerzijde is echter dat de toepassing van biomaterialen heeft geleid tot een geheel nieuw soort infecties, specifiek geassocieerd met deze materialen. Met name de voorheen onschuldige commensale huidstafylokokken blijken een onverwacht vermogen te bezitten aan biomaterialen te hechten en deze zo te koloniseren, wat in een aantal gevallen tot een manifeste infectie kan leiden. Vooral in het geval van hechting van deze coagulase-negatieve stafylokokken aan materialen toegepast in katheters is veel kennis verworven over de (micro)biologische aspecten van dit proces, van hechting tot aan formatie van de zogenaamde biofilm, zelfs tot op het niveau van genomische regulatie van de verschillende fasen van dit proces. Waarom er in sommige gevallen een manifeste infectie optreedt (en in de meeste gevallen gelukkig niet!) is echter nog steeds raadselachtig, mogelijk speelt de afweer van de gastheer een beslissende rol in dit proces.

Als een infectie optreedt betekent dit voor de patiënt op zijn minst een onwelkome complicatie, in het geval van een heup- of hartklepprothese is het zelfs een regelrechte catastrofe. Voor de patiënt met een geïnfecteerde heupprothese dreigt invaliditeit, met mogelijk ontwrichting van zijn sociaal leven, een geïnfecteerde hartklepprothese is een potentieel dodelijke complicatie. Ook peritonitis geassocieerd met peritoneaaldialyse kan op termijn desastreuze gevolgen hebben voor de patiënt.

Op het gebied van deze relatief nieuwe categorie van infecties wordt door een aantal groepen, ook in Nederland, met succes onderzoek gedaan, waarvan de resultaten kennis en begrip van deze infecties hebben verdiept.

Aan de hand van een serie korte overzichtsartikelen komen in dit tijdschrift de huidige inzichten in de biologie, pathogenese en kliniek van infecties geassocieerd met biomaterialen aan de orde. Hierin worden de algemene principes van het fascinerende proces van hechting van bacteriën aan biomaterialen en de rol van de afweer in de pathogenese van deze infecties besproken naast epidemiologie, klinische verschijnselen, diagnostiek, behandeling en mogelijkheden tot preventie van deze infecties, die aan de hand van een aantal specifieke voorbeelden de revue passeren.

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

Tuberculose, biomateriaal en antistofdeficiënties

Ruim een jaar geleden verzocht ik Wim Severin – still alive and kicking – over het onderwerp tuberculose een zestal groepen auteurs samen te stellen, die in verschillende facetten hiervan zijn ingevoerd. De praktijk is hard, artikelen worden niet tegelijkertijd afgerond voor publicatie en daardoor komen thema's in de verschillende afleveringen door elkaar te lopen. Ook nu is dat zo, in deze aflevering treft u alvast twee artikelen over tbc: over de typering van *Mycobacterium tuberculosis*-stammen ten behoeve van epidemiologische analyse wordt gesproken door Van Soolingen en Kremer uit het RIVM; Ottenhof uit het LUMC gaat in op de immunologie en immunogenetica van tbc, waarbij de mogelijkheden van nieuwe vaccins worden belicht. Meer volgt in de komende afleveringen.

Voor wat de laboratoriumkant van de tbc betreft is er nieuws. Jarenlang is de kweek van *Mycobacterium* gedaan op basis van consensus in een deel van de bacteriologische laboratoria. De laatste jaren zijn er nieuwe kweek- en moleculaire detectietechnieken beschikbaar gekomen en dit heeft mede de behoefte aan bewezen werkzame richtlijnen doen toenemen. Onlangs is voor dit doel met ondersteuning vanuit de Orde van Medisch Specialisten een zogenaamde *specialistische werkgroep* opgericht. Ondanks dat het om een laboratoriumrichtlijn gaat hebben in de werkgroep tevens consulent-artsen, longartsen en infectiologen zitting, om het contact met de epidemioloog en de clinicus te waarborgen. In een commentaar wordt door Vlaspolter uit deze werkgroep bericht.

Voor het behandelen van biomateriaal-gerelateerde infecties zijn door redactielid André Flear de auteurs uitgekozen en aangezocht. In voorgaande afleveringen werden al artikelen opgenomen over dit onderwerp, dit keer een verslag van fundamenteel onderzoek in dit onderwerp van Zaat en co-auteurs (AMC).

In samenspraak met Kullberg en Horrevorts is een serie teksten in voorbereiding die het overlappende interessegebied van infectioloog en medisch microbioloog betreffen. Een eerste artikel in dit kader, van De Vries en Flear, gaat over diagnostiek en behandeling van antistofdeficiënties.

J.A. Kaan, hoofdredacteur, arts-microbioloog, Diakonessenhuis Utrecht, Medisch Microbiologisch laboratorium, Postbus 80250, 3508 TG Utrecht

Het gebruik van DNA-fingerprinting om transmissie van tuberculose te onderzoeken

D. VAN SOOLINGEN, K. KREMER

Vanaf het begin van de jaren negentig zijn verscheidene repeterende DNA-sequenties ontdekt in *Mycobacterium tuberculosis*, geassocieerd met verschillende gradaties van DNA-polymorfisme. De toepassing van DNA-fingerprinting met behulp van deze repeterende DNA-sequenties heeft geleid tot belangrijke ontdekkingen op het gebied van moleculaire epidemiologie en ook tot een verbeterde identificatie van mycobacteriën die tot andere subspecies van het *M. tuberculosis*-complex behoren. Dit artikel is bedoeld om de stand van zaken te beschrijven aangaande het gebruik van DNA-fingerprinting in tuberculoseonderzoek en ook de meest belangrijke bevindingen bij de toepassing van deze techniek.

Trefwoorden: *Mycobacterium*, tuberculose, DNA-fingerprinting, RFLP-typering, epidemiologie, transmissie

Introductie

In Nederland komt tuberculose weinig voor. Met een incidentie van vijf gevallen van actieve tuberculose per 100.000 autochtone inwoners is inmiddels de eliminatiefase bereikt. De epidemiologie van tuberculose wordt in Nederland sterk beïnvloed door de sterk fluctuerende instroom van immigranten uit landen met een hoge tuberculoseprevalentie. Sinds 1991 is meer dan de helft van alle tuberculosepatiënten in Nederland van buitenlandse oorsprong. Immigranten vormen ook de belangrijkste risicogroep voor resistentieproblematiek. Mondiaal is er sprake van een verontrustende situatie, daar er zowel op het Afrikaanse als het Aziatische continent als ook in Oost-Europa een explosieve groei van het aantal ziektegevallen wordt waargenomen en nog verwacht wordt. Deze voorspellingen zijn gebaseerd op de kennis van de interactie tussen de HIV-epidemie en de tuberculose-epidemie, en op de sociodemografische ontwikkelingen in de betrokken gebieden die leiden tot een toename van het absolute aantal patiënten en tot migratie van tuberculosebronnen over landsgrenzen heen.

Inmiddels is duidelijk dat de beheersbaarheid van de tuberculosesituatie vooral wordt bedreigd door het ontstaan van 'hot-spots' van multiresistente tuberculose, waarvan er meerdere in Europa zijn gelokaliseerd. Transmissie van multiresistentie in deze gebieden en verspreiding naar 'schone' gebieden is een realiteit. Zo vormt de hoge prevalentie van multiresistente tuberculose in Oost-Europa een regelrechte bedreiging voor Nederland.

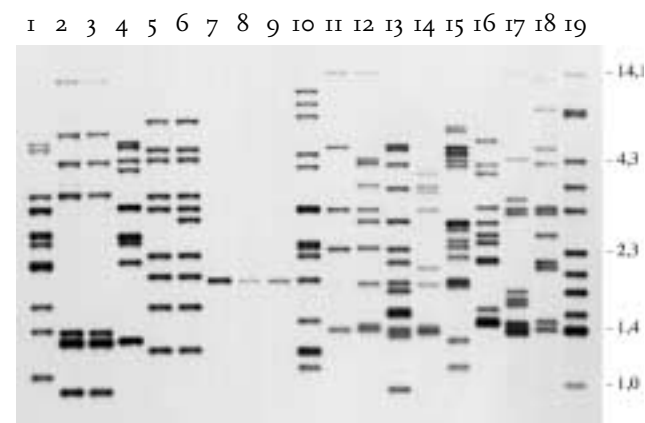
Tot de jaren negentig waren er maar zeer beperkte mogelijkheden om transmissie van tuberculose te onderzoeken door typering van de verwekker van deze infectieziekte, *Mycobacterium tuberculosis*. Veel epidemiologische onderzoeken uit de periode van 1960 tot 1990 zijn gebaseerd op faagtypering. Met faagtypering kon slechts een viertal hoofd-faagtypen en een klein aantal subtypen worden onderscheiden. Soms werd ook gebruik gemaakt van de vergelijking van de resistentieprofielen van *M. tuberculosis*-

isolaten van patiënten, wat echter geen stabiel kenmerk is.¹ Vanaf begin jaren negentig zijn repeterende DNA-sequenties gevonden in het genoom van *M. tuberculosis*, die geassocieerd bleken met verschillende niveaus van DNA-polymorfisme. Deze ontdekkingen hebben niet alleen geleid tot de ontwikkeling van methoden waarmee binnen het subspecies *M. tuberculosis* tienduizenden stammen konden worden onderscheiden, maar heeft ook nieuwe mogelijkheden gegeven om bacteriën van subspecies binnen het *M. tuberculosis*-complex te identificeren. De introductie van deze nieuwe methoden heeft belangrijke nieuwe inzichten opgeleverd in de epidemiologie van tuberculose.

De gestandaardiseerde DNA-typering

De gestandaardiseerde en meest gebruikte moleculaire typeringstechniek voor *M. tuberculosis*-complexisolaten is de restrictie fragmentlengte polymorfisme (RFLP)-typering met insertie-element IS6110 als probe.² Deze methode is gebaseerd op verschillen in het aantal kopieën van IS6110 per stam, variërend van 0 tot ongeveer 25, en variabiliteit in de chromosomale insertieplaatsen van dit repeterende DNA-element. Om IS6110-RFLP-patronen zichtbaar te maken wordt DNA geïsoleerd van een mycobacteriële cultuur. Daarna wordt het DNA gezuiverd en gedigesteerd met restrictie-enzym *PvuII*. De DNA-restrictiefragmenten worden gescheiden op een agarose-gel door middel van elektroforese, en vervolgens door Southern blotting overgebracht op een DNA-membraan. Om de restrictiefragmenten aan te tonen die IS6110-DNA bevatten, wordt het membraan gehybridiseerd met een met peroxidase-gelabelde DNA-probe die een sequentie heeft die complementair is aan de IS6110-sequentie. Na toevoegen van een substraat wordt via het peroxidase-enzym aan de probe een chemiluminescentiereactie opgewekt. Het licht dat bij deze reactie vrijkomt op de restrictiefragmenten waaraan de probe gehecht is, wordt gedetecteerd op een film.³ Een voorbeeld van IS6110-RFLP-patronen van *M. tuberculosis*-complexstammen die geïsoleerd werden in Nederland, is te zien in *Figuur 1*.

Figuur 1. IS6110-RFLP-patronen van *M. tuberculosis*-complexstammen die in Nederland geïsoleerd werden (lanen 1-18). Laan 19 bevat DNA van de internationaal gestandaardiseerde externe marker, met rechts de daarbij horende molecuulgewichten van enkele van de IS6110-bevattende restrictiefragmenten in kilobase-paren. De DNA-fingerprints in de lanen 2 en 3, en in de lanen 7 tot 9, zijn identiek.



Om RFLP-patronen van verschillende laboratoria met elkaar te kunnen vergelijken, zijn alle aspecten van de IS6110-RFLP-typering gestandaardiseerd; het enzym *PvuII*, de sequentie van de probe en de interne- en externe markers.² Dankzij deze markers kunnen de grootten van de restrictiefragmenten die IS6110-DNA bevatten zeer nauwkeurig worden bepaald tijdens de gecomputeriseerde analyse van de DNA-fingerprints, en kunnen grote databanken worden opgebouwd die populatiegebaseerde onderzoeken mogelijk maken.^{4,5} Ongeveer 8,5 procent van de *M. tuberculosis*-isolaten die in Nederland worden gevonden zijn zogeheten 'laag-kopie-stammen'.³ Deze stammen bevatten maximaal vier kopieën van IS6110. Slechts enkele stammen (minder dan 0,1 procent) bevatten geen IS6110-element. Voor laag-kopiestammen is het nodig om een aanvullende RFLP-typering te doen met een andere genetische marker; de *polymorphic GC-rich sequence* (PGRS).^{6,7} De resultaten van de beide typeringen worden in deze gevallen meegewogen.

Stabiliteit van IS6110-RFLP

De DNA-fingerprint van een stam moet snel genoeg veranderen om niet-epidemiologisch verwante stammen een verschillend kenmerk te geven, maar moet ook dermate stabiel zijn dat isolaten van gerelateerde ziektegevallen nog identieke patronen hebben. Recentelijk werd in twee studies een berekening gemaakt van de halfwaardetijd van IS6110-RFLP door te kijken naar de stabiliteit van de seriële isolaten van honderden patiënten.^{8,9} Hieruit bleek dat bij de meeste isolaten de IS6110-RFLP-patronen zeer stabiel waren en werd de gemiddelde halfwaardetijd van IS6110-RFLP op drie tot vier jaar geschat. Deze stabiliteit lijkt in het algemeen voldoende te zijn voor een betrouwbare interpretatie van DNA-fingerprintgegevens aangaande recente transmissie. De Boer et al. onderzochten het voorkomen van laag-intensiteitsbanden in IS6110-RFLP-patronen.¹⁰ In 7,4 procent van de IS6110-RFLP-patronen kwam ten minste één vage band voor. Van een aantal *M. tuberculosis*-isolaten die een dergelijk patroon lieten zien, werden losse koloniekweken gemaakt. Bij RFLP-typering van deze losse koloniekweken bleken zij of een band met een normale intensiteit, of helemaal geen band te hebben op de positie waar de moederstam een laag-intensiteitsband had. Hieruit werd geconcludeerd dat stammen met een laag-intensiteitsband in het IS6110-

RFLP-patroon in feite bestaan uit mengsels van bacteriële populaties met iets verschillende DNA-fingerprints. Omdat de aanwezigheid van laag-intensiteitsbanden in IS6110-RFLP-patronen significant geassocieerd was met hogere leeftijd, lijkt er een verband te zijn tussen transpositie (instabiliteit) van IS6110 en de 'slaaptoestand' waarin de *M. tuberculosis*-bacteriën verblijven in het lichaam van potentiële patiënten en/of het reactivatieproces daarna dat leidt tot de (hernieuwde) manifestatie van tuberculose.¹⁰ Dit zou betekenen dat transpositie van IS6110 een drijvende kracht zou zijn in de genetische aanpassingen die de bacterie ondergaat.

Routinematige toepassing van DNA-fingerprinting in Nederland

In Nederland houden 43 perifere laboratoria zich bezig met de primaire laboratoriumdiagnostiek van tuberculose. Ongeveer 70 procent van de tuberculosegevallen in Nederland wordt bacteriologisch bevestigd. In de afgelopen periode werden daarom jaarlijks zo'n 1.000 tot 1.200 kweken per jaar naar het RIVM gestuurd voor species-identificatie, gevoeligheids-onderzoek en DNA-fingerprinting.

Sinds begin 1993, toen de routinematige DNA-fingerprinting in Nederland werd geïntroduceerd, zijn er al zo'n 6.000 verschillende IS6110-RFLP-patronen in de databank opgeslagen die wekelijks worden vergeleken met de nieuwe DNA-fingerprints. Wanneer identieke DNA-fingerprints worden gevonden, wordt dit doorgegeven aan tuberculose-afdelingen van GGD's. De wetenschap welke patiënten geïnfecteerd zijn met dezelfde *M. tuberculosis*-stammen (zogeheten 'clusters' van patiënten) ondersteunt het bronopsporings- en contactonderzoek. Tevens heeft dit op een hoger abstractieniveau geleid tot nieuwe inzichten betreffende transmissie van tuberculose in het algemeen, zoals gerapporteerd in een artikel over de populatiegebaseerde moleculaire epidemiologie van tuberculose in Nederland.⁵

Structurele DNA-fingerprinting om contactonderzoek te ondersteunen

Na het beschikbaar komen van de RFLP-clustergegevens bij de GGD kan bij zo'n 25 procent van de geclusterde patiënten met zekerheid een contactmoment worden vastgesteld. In totaal bij ongeveer 45 procent van de geclusterde patiënten kan met behulp van de RFLP-gegevens een epidemiologisch verband worden vastgesteld. Dit is een toename van 23 procent ten opzichte van de verwachtingen om deze verbanden vast te stellen zonder de DNA-fingerprintgegevens. In een onderzoek naar de resultaten van contactonderzoek van 784 bevestigde contacten op grond van DNA-fingerprinting bleek dat 31 procent van deze contacten in de eerste ring van het contactonderzoek werden gevonden, 29 procent in de tweede ring, en 40 procent in de derde- en volgende ringen van het contactonderzoek.¹¹ DNA-fingerprinting levert dus met name een bijdrage in het opsporen van losse of toevallige contacten die moeilijk te koppelen zijn aan de bron op grond van het conventionele contactonderzoek.

Nieuwe inzichten in de transmissie van tuberculose

In de eerste twee jaren dat DNA-fingerprinting routinematig werd toegepast, nam het cumulatieve percentage clusterende isolaten zeer sterk toe. Daarna vlakke dit clusteringpercentage af op een niveau van ongeveer 50 procent van het totale aantal patronen.⁵ Tweënvijftig procent van de geclusterde isolaten die in Nederland worden gevonden is beperkt van omvang

en bevat slechts twee tot zes patiënten.⁵ Er zijn echter ook grotere clusters gevonden die vanaf 1993 gestaag in omvang zijn gegroeid. De patiënten in dergelijke clusters behoren veelal tot bepaalde risicogroepen.⁵ Verder behoort ook de micro-epidemie in Harlingen tot de aansprekende voorbeelden van hoe een beperkt aantal onopgemerkte bronnen een epidemische verheffing van grote omvang (47 patiënten) kan veroorzaken.^{5,12}

Ook is met DNA-fingerprinting bewezen dat éénderde deel van alle nieuwe tuberculosegevallen in Nederland is toe te schrijven aan een recente infectie. Het percentage clustering onder ouderen is veel lager dan dat onder jongeren, hetgeen bevestigt dat het ontbreken van clustering een maat is voor reactiviteit van latente infecties, opgelopen in het verre verleden.

Sinds de invoering van accurate stamtypering is het duidelijk geworden dat laboratoriumkruiscontaminaties vaker voorkomen dan vroeger verwacht werd. Bij laboratoriumkruiscontaminaties worden negatieve patiëntenmaterialen fout-positief doordat zij in aanraking komen met bacteriën van besmette bronchoscopen, positieve monsters of controle-stammen. Zulke fouten kunnen leiden tot onnodige bezoeken van foutgediagnosticeerde patiënten aan gespecialiseerde artsen. Een inventariserend onderzoek naar de gevolgen van laboratoriumkruiscontaminaties voor de betrokken patiënten is aangewezen in de afrondingsfase.

Met behulp van DNA-fingerprinting is tevens vastgesteld dat INH-resistentie in het algemeen een negatieve risicofactor is voor transmissie van tuberculose.⁵ De correlatie tussen de verschillende mutaties die tot INH-resistentie leiden en transmissie van tuberculose is nader onderzocht. Er werd gevonden dat *M. tuberculosis*-isolaten met een mutatie op aminozuurpositie 315 van het katalase-gen significant vaker in een IS6110-cluster voorkwamen dan INH-resistente stammen met een andere mutatie. Bovendien bleek dat stammen met deze specifieke mutatie vaker polyresistent waren en dat ze een hoger INH-resistentieniveau hadden.¹³ Uit dierproeven bleek eerder dat INH-resistente stammen minder virulent zijn dan gevoelige stammen, wat overeenkomt met de bevinding dat INH-resistentie in het algemeen (alle resistente stammen samen genomen, onafhankelijk van het mechanisme van resistentie) een negatieve risicofactor voor clustering is. Deze bevindingen zijn echter in tegenspraak met de bevinding dat er wereldwijd veel epidemieën van multi-resistente stammen zijn gevonden.¹ De bevinding dat de meeste mutaties in het katalase-gen leiden tot verlies van katalase- en peroxidase-activiteit, maar dat juist stammen met een mutatie op aminozuurpositie 315 van het katalase-gen wel katalase- en peroxidase-activiteit vertonen verklaart dat INH-resistente stammen met die mutatie wel secundaire gevallen van tuberculose kunnen veroorzaken.

PCR-gebaseerde DNA-typeringen

Alhoewel IS6110-RFLP-typering de meestgebruikte en gestandaardiseerde typeertechniek is voor *M. tuberculosis*-isolaten, is deze techniek niet ideaal. De typering is technisch gezien moeilijk uit te voeren en er is geavanceerde computer-software nodig om de patronen te vergelijken. Bovendien is er relatief veel DNA nodig (ongeveer 2 µg) waarvoor zoveel bacteriën nodig zijn dat een kweek vereist is. Daarom zijn er in de afgelopen jaren diverse typeermethoden ontwikkeld die gebaseerd zijn op amplificatie van DNA van de bacteriën,

de zogenaamde polymerase chain reaction (PCR).

In een onderzoek waarin de reproduceerbaarheid en het discriminerend vermogen van de verschillende typeringsmethoden voor *M. tuberculosis*-complex werden onderzocht, bleek een aantal PCR-gebaseerde typeringen niet reproduceerbaar te zijn.¹⁴ Andere PCR-gebaseerde methoden die gebruik maken van repeterend DNA, zoals *variable number of tandem repeat* (VNTR)-typering, *mycobacterium interspersed repeat units* (MIRU)-typering, spoligotypering en mixed-linker PCR bleken net zo reproduceerbaar als RFLP. Mixed-linker PCR gaf een niveau van discriminatie dat nagenoeg gelijk was aan dat van IS6110-RFLP-typering.^{14,15}

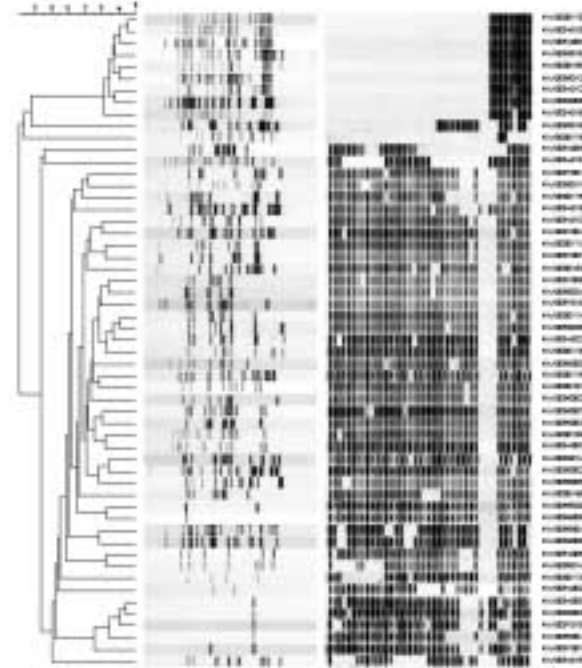
Ondanks het feit dat het discriminerende vermogen van spoligotypering aanzienlijk lager ligt dan dat van IS6110-RFLP, maken veel laboratoria gebruik van deze techniek vanwege de makkelijke uitvoerbaarheid als alternatief voor of als aanvulling op de IS6110-RFLP-typering.^{14,16} Spoligotypering is gebaseerd op het zichtbaar maken van de aanwezigheid van unieke DNA-spacer-sequenties die tussen repeterende stukjes DNA (direct repeats, DR's) in de DR-regio van het *M. tuberculosis*-complexgenoom aanwezig zijn. Deze regio wisselt in samenstelling bij *M. tuberculosis*-stammen in het aantal DR's en in de aanwezigheid van DNA-spacer-sequenties.^{16,17} Bij deze typering worden synthetische oligo's bereid op grond van bekende spacer-sequenties en in rijen op een DNA-membraan gebracht. Om de aanwezigheid van spacer-sequenties in de DR-regio van een onbekende *M. tuberculosis*-complexbacterie te testen, wordt de gehele DR-regio van een dergelijk monster geamplificeerd met primers die op de DR's passen. Vervolgens wordt dit PCR-product dwars op de synthetische oligo's gebracht. Een hybridisatie-signaal, dat gedetecteerd wordt via een reactie op een label aan één van de primers, duidt op de aanwezigheid van een spacer.^{16,17}

De impact van Beijing-genotypestammen op de wereldwijde tuberculose-epidemie

De populatiestructuur van *M. tuberculosis*-isolaten wisselt sterk in de verschillende geografische gebieden. In het algemeen zijn de *M. tuberculosis*-isolaten in gebieden met een lage incidentie van tuberculose genetisch heterogener dan in gebieden met een hoge incidentie van tuberculose. In Tunesië bleek bijvoorbeeld dat 62 procent van de isolaten tot drie genotypenfamilies behoorden die ieder meer dan 65 procent overeenkomst onder de IS6110-RFLP-patronen vertoonden.¹⁸ In Azië bleken de *M. tuberculosis*-isolaten genetisch nog veel geconserveerder te zijn. Meer dan 80 procent van de isolaten uit de Beijing-regio bleken tot één evolutionair sterk geconserveerd genotype te behoren.¹⁷ Deze stammen vertoonden veelbandige IS6110-RFLP-patronen met een sterke mate van overeenkomst en identieke, karakteristieke spoligopatronen (zie *Figuur 2*).

Het belang van de identificatie van Beijing-genotypestammen is inmiddels bevestigd in een aantal internationale onderzoeken.¹ In veel gebieden bleken Beijing-genotypestammen geassocieerd te zijn met resistentie tegen INH en streptomycine.¹ Tevens bleken Beijing-genotype-isolaten geassocieerd met lage leeftijd van patiënten in Vietnam en dus met recente, actieve transmissie.¹⁹ Dit betekent dat Beijing-stammen zich aan het verspreiden zijn in deze regio en waarschijnlijk ook in andere delen van Azië, al werd de associatie met lage leeftijd niet gevonden in Hong Kong en Indonesië.^{20,21}

Figuur 2. Dendrogram van IS6110-RFLP- (links) en spoligopatronen (rechts) van willekeurige *M. tuberculosis*-complexstammen die in Nederland geïsoleerd werden. Het dendrogram is berekend volgens de UPGMA-methode en geeft de mate van overeenkomst weer op grond van beide typeermethoden. De bovenste tak van het dendrogram geeft Beijing-genotypestammen weer, die op grond van beide typeermethoden zeer sterk geconserveerd zijn.



Wat voor selectieve voordelen Beijing-stammen hebben ten opzichte van andere *M. tuberculosis*-stammen is nog niet duidelijk. Het lijkt erop dat infecties met Beijing-stammen in ieder geval moeilijker te behandelen zijn, getuige de veelvuldig optredende resistentie tegen de belangrijkste tuberculostatica. Wellicht verloopt ook de interactie tussen Beijing-stammen en het immuunsysteem bij de mens op een andere wijze dan bij reguliere tuberculosebacteriën. In Indonesië werd namelijk gevonden dat febrile responsen tijdens de eerste twee weken van de behandeling tweemaal zo vaak optraden bij patiënten met een infectie met Beijing-genotypebacteriën, als bij patiënten met infecties met andere *M. tuberculosis*-stammen.²¹

Speciesidentificatie met behulp van DNA-fingerprinting

Tuberculose in de mens wordt niet alleen veroorzaakt door *M. tuberculosis*, maar ook door bacteriën van andere subspecies in het complex. Het *M. tuberculosis*-complex bestaat uit de subspecies *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium bovis*, de vaccinstam *M. bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, en *Mycobacterium canettii*. Laatstgenoemde species werd in 1997 voor het eerst beschreven en is, evolutionair gezien, de meest afwijkende van de subspecies in het complex.²² Deze bacterie heeft een abnormaal glad kolonieoppervlak en een kortere delingstijd dan de andere species uit het *M. tuberculosis*-complex. In RFLP-typering met IS1081 vertonen isolaten van dit species maar één band, terwijl alle andere *M. tuberculosis*-complexstammen vijf tot zeven banden hebben op geconserveerde posities. Op grond van de zes gevallen van *M. canettii* die tot nu toe werden gevonden lijkt het aannemelijk dat Oost Afrika, waar bepaalde dieren mogelijk als bronnen optreden, het geografische centrum is van deze infecties.^{1,22}

In tegenstelling tot *M. tuberculosis* en *M. africanum*, welke met name tuberculose veroorzaken bij primaten, heeft *M. bovis* een breed gastheerbereik. Stammen van dit subspecies infecteren vele soorten huisdieren en wilde dieren. *M. bovis*-infecties bij de mens worden meestal veroorzaakt door het drinken van rauwe melk van met *M. bovis* geïnfecteerde koeien. *M. bovis* veroorzaakt meestal extrapulmonale tuberculose. IS6110-RFLP-typering is niet de meest geschikte methode om *M. bovis* te typeren, omdat het aantal kopieën van IS6110 meestal laag is. In *M. bovis*-stammen geïsoleerd uit koeien is normaal gesproken maar één kopie van IS6110 aanwezig. Vaak wordt daarom een subtypering met spoligotypering, PGRS, RFLP, of VNTR-typering uitgevoerd.^{1,16} Het levende BCG-vaccin stamt af van een vertwakte *M. bovis*-stam. Karakteristieke IS6110- en IS1081-patronen maken het mogelijk om deze bacteriën met zekerheid te identificeren, wat moeilijk was in het pre-fingerprinting-tijdperk. Deze verbeterde herkenning van BCG heeft het inzicht gegeven dat BCG in staat is om gedissemineerde vormen van tuberculose te veroorzaken in patiënten met een verminderde immun-respons.¹

Tot enkele jaren geleden werd ervan uitgegaan dat *M. microti* alleen tuberculose bij muizen kon veroorzaken, en incidenteel bij andere dieren. In 1998 werd voor het eerst *M. microti* als oorzakelijk agens van tuberculose bij vier Nederlandse patiënten geïdentificeerd. Deze infecties konden worden gediagnosticeerd dankzij de karakteristieke IS6110-RFLP- en spoligopatronen van *M. microti*.²³ Later werden in Duitsland en Zwitserland nog vier patiënten gediagnosticeerd met *M. microti*. Meer dan de helft van deze gevallen betrof immunocompetente patiënten en alle *M. microti*-infecties veroorzaakten ofwel reguliere longtuberculose ofwel gedissemineerde infecties.^{1,23} Omdat de primaire isolatie van *M. microti* 6 tot 12 weken duurt, en primaire kweken over het algemeen niet zo lang worden geïncubeerd, is het mogelijk dat de tot nu toe gevonden gevallen slechts het topje van de ijsberg vormen.

Recente ontwikkelingen in het typeren van *M. tuberculosis*-complexisolaten

Het grootste nadeel van de DNA-fingerprinttechnieken die gedurende de jaren negentig zijn ontwikkeld is dat met deze technieken slechts één of soms twee specifieke, meestal repeterende, sequenties worden gedetecteerd. Omdat recentelijk de hele genoomsequentie van *M. tuberculosis*-stam H37Rv is gepubliceerd²⁴, is het mogelijk geworden om DNA-fingerprinttechnieken te ontwikkelen waarin de evolutionaire divergentie op diverse niveaus wordt aangetoond. Idealiter zou de detectie van de genetische gerelateerdheid van *M. tuberculosis*-isolaten op verschillende niveaus in één test moeten worden gecombineerd, om onderscheid te kunnen maken tussen transmissie uit primaire, secundaire, en verdere bronnen in een transmissieketen van tuberculose. De halfwaardetijd van de huidige IS6110-RFLP-typering, die op drie tot vier jaar wordt geschat, is daarvoor te lang. In Nederland zijn al transmissieketens gevonden die meer dan zeven jaar bestrijken, daarom zijn er nieuwe genetische markers nodig die snellere evolutionaire veranderingen in *M. tuberculosis* aan kunnen tonen. Om de fylogenie van *M. tuberculosis* te bestuderen zijn daarentegen geconserveerdere markers nodig.

Een belangrijke nieuwe ontwikkeling op het gebied van DNA-onderzoek is de introductie van de DNA-microarray-analyse of de DNA-chiptechnologie. Hiermee kan de gerelateerdheid op basis van de hele genomesequentie worden onderzocht. Deze technieken detecteren genetische variatie door analyse van hybridisatie van mycobacterieel DNA op arrays met hoge dichtheid van oligonucleotiden op een klein oppervlak.²⁵ Deze techniek werd bijvoorbeeld al toegepast om *M. bovis* BCG-vaccindochterstammen te vergelijken. Ook werd een DNA-chip ontwikkeld waarmee identificatie van mycobacteriën en gevoeligheid voor antibiotica in een assay worden gecombineerd. In een studie waarin het genoom van 16 *M. tuberculosis*-patiëntenisolaten werden vergeleken met H37Rv, bleek dat gemiddeld 0,3 procent van het genoom van deze isolaten was gedeleteerd.²⁶ Deze observatie suggereert dat genomische deleties een veel voorkomende bron van genetische variabiliteit zijn en dat het genoom van *M. tuberculosis*-complexbacteriën veel minder geconserveerd is dan tot nu toe werd aangenomen.

Literatuur

- van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *J Intern Med* 2001;249:1-26.
- van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 1993;31:406-9.
- van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, van Embden JDA. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol* 1994;235:196-205.
- Heersma HF, Kremer K, van Embden JDA. Computer analysis of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Mol Biol* 1998;101:395-422.
- van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis* 1999;180:726-36.
- Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J Clin Microbiol* 1992;30:942-6.
- van Soolingen D, de Haas PEW, Hermans PWM, Groenen PM, van Embden JDA. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 1993;31:1987-95.
- de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PEW, Nagelkerke NJ, van Embden JDA, van Soolingen D. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patient isolates. *J Infect Dis* 1999; 180:238-44.
- Yeh RW, Ponce dL, Agasino CB, et al. Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA genotypes. *J Infect Dis* 1998;177:1107-11.
- de Boer AS, Kremer K, Borgdorff MW, de Haas PEW, Heersma HF, van Soolingen D. Genetic heterogeneity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates reflected IS6110 restriction fragment length polymorphism patterns as low-intensity bands. *J of Clin Microbiol* 2000;38:4478-84.
- Sebek M. DNA fingerprinting and contact investigation. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000;4:545-8.
- Kiers A, Drost AP, van Soolingen D, Veen J. Use of DNA fingerprinting in international source case finding during a large outbreak of tuberculosis in The Netherlands. *Int J Tuberc Lung Dis* 1997;1:239-45.
- van Soolingen D, de Haas PEW, van Doorn HR, Kuijper E, Rinder H, Borgdorff MW. Mutations at amino acid position 315 of the *katG* gene are associated with high-level resistance to isoniazid, other drug resistance, and successful transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in The Netherlands. *J Infect Dis* 2000;182:1788-90.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 1999;37:2607-18.
- Haas WH, Butler WR, Woodley CL, Crawford JT. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Clin Microbiol* 1993;31:1293-8.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997;35:907-14.
- van Soolingen D, Qian L, de Haas PEW, et al. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J Clin Microbiol* 1995;33:3234-8.
- Hermans PWM, Messadi F, Guebregabher H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia, and The Netherlands: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. *J Infect Dis* 1995;171:1504-13.
- Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 2000;6:302-5.
- Chan MY, Borgdorff MW, Yip CW, et al. Seventy percent of the *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Hong Kong represent the Beijing genotype. *J Clin Microbiol* 2001;127:169-71.
- van Crevel R, Danusantoso H, de Lenne W, et al. Indonesian experience in diagnosis and treatment of tuberculosis: a prospective study in an outpatient tuberculosis clinic in Jakarta. *Emerg Infect Dis* 2001;7:880-3.
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PEW, et al. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997;47:1236-45.
- van Soolingen D, van der Zanden AGM, de Haas PEW, et al. Diagnosis of *Mycobacterium microti* infections among humans by using novel genetic markers. *J Clin Microbiol* 1998;36:1840-5.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998;393:537-44.
- Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, et al. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 1995;19:442-7.
- Kato MM, Rhee JT, Gingers TR, et al. Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 2001;11:547-54.

Summary

Since the early 1990s, several repetitive DNA sequences have been disclosed in *Mycobacterium tuberculosis*, associated with different levels of DNA polymorphism. The application of DNA fingerprinting has led to significant findings in molecular epidemiology and also improved identification of mycobacteria belonging to other sub-species within the *M. tuberculosis* complex. This article aims to describe the state of the art regarding DNA fingerprinting of mycobacteria and also the most important findings in the application of this technique.

Dr. D. van Soolingen, hoofd Afdeling Mycobacteriën,

Ing. K. Kremer, onderzoeksmedewerkster,

**beiden Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieu (RIVM),
Afd. Mycobacteriën (LIS, pb 22), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven**

Immunologie en immunogenetica van tuberculose: op weg naar nieuwe effectieve vaccins?

T.H.M. OTTENHOFF

Recentelijk hebben zich diverse ontwikkelingen voorgedaan op het gebied van de immunologie en immunogenetica van mycobacteriële infectieziekten, in het bijzonder tuberculose. In detail wordt ingegaan op de celtypen en cytokinen die betrokken zijn bij de afweer tegen mycobacteriën, inclusief hun belangrijkste functies. De implicaties van deze kennis voor het ontwikkelen van verbeterde vaccins tegen tuberculose krijgen aandacht. Genetische gastheerfactoren kunnen mede de gevoeligheid voor mycobacteriële infectieziekten bepalen, en de kennis van het humane genoom kan worden gebruikt om genen die gerelateerd zijn aan gevoeligheid voor ziekte, op te sporen.

Trefwoorden: genetica, T-cellen, tuberculosevaccin, tuberculose-immunogenetica, type-1-cytokinen

Tuberculose: Verleden en heden

Aan het eind van de 19e eeuw, toen Robert Koch *Mycobacterium tuberculosis* had ontdekt als de verwekker van tuberculose en zijn postulaten had opgesteld, bestond er groot optimisme omtrent de mogelijkheid tuberculose te elimineren. "Sinds men zich gerealiseerd heeft dat tuberculose kan worden voorkómen, en men weet hoe infectie kan worden voorkómen, is het aantal sterfgevallen als gevolg van tuberculose afgenomen in de geïndustrialiseerde landen en lijkt het erop dat tuberculose kan worden geëlimineerd. Dit is de tijd om tuberculose te bestrijden", zo sprak Koch meer dan 100 jaar geleden.¹ Anno 2001, echter, is ongeveer éénderde van de wereldbevolking besmet met *M. tuberculosis*, komen er jaarlijks 7 tot 10 miljoen nieuwe gevallen van tuberculose bij, en sterven er jaarlijks 2 tot 2,5 miljoen mensen aan deze ziekte. De situatie wordt verder verergerd door het toenemend aantal meervoudig resistente en virulente bacteriestammen, het fatale beloop van tuberculose bij aidspatiënten (in ontwikkelingslanden) en de toenemende migratie vanuit endemische gebieden met als gevolg toenemende verspreiding van de ziekte.²

Immunitet tegen mycobacteriën

Mycobacteriën zijn intracellulaire pathogenen die vooral macrofagen en dendritische cellen infecteren. Om deze reden is cellulaire (en niet humorale) afweer van primair belang bij *M. tuberculosis*-infectie: antistoffen zijn immers niet in staat efficiënt door te dringen in de intracellulaire compartimenten waar de bacterie zich bevindt. Het cellulaire afweersysteem is daarentegen bij uitstek in staat dat wat zich in de cel bevindt te detecteren. Dit gebeurt door de herkenning van kleine eiwitfragmenten (peptiden) van de bacterie die op de oppervlakte van de geïnfecteerde cel worden gebracht, gebonden aan HLA-moleculen (gecodeerd door het zogenaamde Major Histocompatibility Complex) zodat deze door T-cellen kunnen worden herkend (zie verder onder 'Cellulaire immunitet').³

Er zijn aanwijzingen dat het cellulaire immuunsysteem een belangrijke rol speelt bij de afweer tegen *M. tuberculosis* en andere mycobacteriën bij de mens. Zo is de incidentie van tuberculose sterk verhoogd bij aidspatiënten, en is de ernst van de ziekte geassocieerd met een verlaging van het aantal CD4⁺-T-cellen. Bij individuen met aangeboren defecten in genen die een cruciale rol spelen in de cellulaire afweer, zoals de receptoren voor type-1-cytokinen, kunnen atypische mycobacteriën of zelfs de geattenueerde vaccinstammen *M. bovis* BCG ernstige en soms fatale infecties veroorzaken.⁴ Bij de klassieke lepromateuze lepra is sprake van een afwezige of sterk verlaagde cellulaire immuunrespons tegen de leprabacil, gepaard gaande met grote aantallen *M. leprae*-bacteriën in de laesies en een progressief ziektebeloop. Een dergelijk patroon is ook aanwezig bij tuberculose: individuen met verlaagde cellulaire immunitet *in vitro* of *in vivo* (negatieve Mantoux-test) hebben vaak ernstigere en uitgebreidere vormen van de ziekte dan individuen met een sterke cellulaire respons.

Verdere ondersteuning voor de rol van de cellulaire immuunrespons bij mycobacteriële infecties komt uit experimenteel geïnduceerde tuberculose in muizenstammen met deleties in genen die betrokken zijn bij de cellulaire immuunrespons. Hoewel uiteraard voorzichtigheid in acht moet worden genomen bij het extrapoleren van bevindingen in muizenmodellen naar de mens, correleren de gegevens uit humane- en muizen-gendeficiënties in veel gevallen nauwkeurig, zodat voor wat betreft immunologische mechanismen vergelijkingen kunnen worden gemaakt.

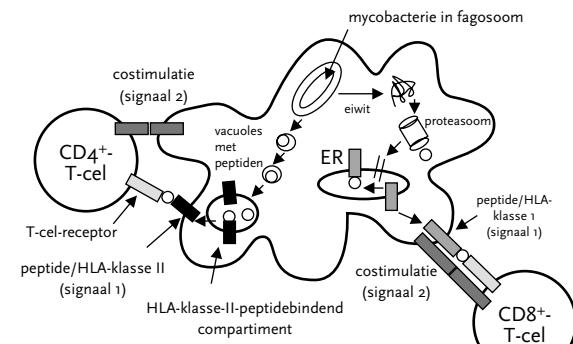
Cellulaire immunitet

CD4⁺-T-cellen

De verworven antigeenspecifieke cellulaire immuunrespons hangt af van respectievelijk CD4⁺- en CD8⁺-T-cellen. CD4⁺-T-cellen herkennen eiwitantigenen nadat deze door proteolytische enzymen in endosomale/lysosomale compartimenten van daartoe gespecialiseerde antigeenpresenterende cellen

(APC) zijn geknipt tot kleine eiwit-fragmenten (peptiden). Tot deze APC behoren onder andere monocyt, weefsel-macrophagen (de voornaamste habitat van *M. tuberculosis*) en dendritische cellen. De door proteolyse gevormde peptiden binden vervolgens aan de HLA-klasse-II-presentatiemoleculen. Omdat deze peptiden worden gevormd in het vacuolaire systeem van de gastheercel, kan worden gesteld dat CD4⁺-T-cellen antigenen herkennen die via de 'exogene' route de cel zijn binnengekomen (Figuur 1).

Figuur 1. CD4⁺- en CD8⁺-T-cellen herkennen peptiden afkomstig van mycobacteriën. De vorming van peptide-HLA-klasse-II-complexen vindt plaats in endosomale compartimenten die topografisch continu zijn met het bacteriële fagosoom. De vorming van peptide-HLA-klasse-I-complexen volgt waarschijnlijk een andere route, waarbij antigenen uit het fagosoom in het cytoplasma terecht komen aldaar worden afgebroken door het proteasoom (cilindervormige structuur), en dan worden getransporteerd naar het endoplasmatisch reticulum, alwaar deze peptiden binden aan nieuw gevormde HLA-klasse-I-moleculen.

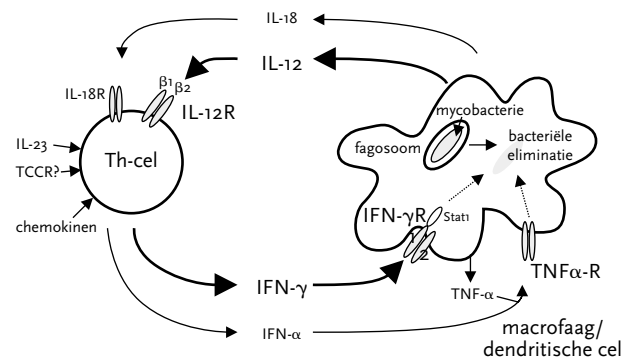


Door herkenning van peptide/HLA-klasse-II-complexen op de APC (signaal 1), in samenhang met de juiste costimuloire signalen (onder andere CD28 en CD40L) (signaal 2) worden CD4⁺-T-cellen geactiveerd, en kunnen zij gaan differentiëren tot functioneel verschillende groepen, afhankelijk van de omgeving waarin de CD4⁺-T-cellen in eerste instantie worden geactiveerd. Het betreft hier een spectrum van verschillende T-helper-subgroepen, variërend van Th1-cellen tot Th2-cellen (Tabel 1).

Deze T-cel-subgroepen verschillen met name in hun cytokine-productiepatronen.⁵ Th1-cellen produceren met name het type-1-cytokine interferon-gamma (IFN-γ), een belangrijk signaleiwit dat bindt aan de IFN-γ-receptor op macrofagen en deze activeert tot efficiëntere antigeenpresentatie en eliminatie van bacteriën (Figuur 2). Daarnaast wordt ook TNF-α geproduceerd door Th1-cellen, zij het dat dit cytokine vooral door macrofagen wordt uitgescheiden. De inductie van een

adequate Th1-respons wordt behalve door peptide/HLA-klasse-II-presentatie en co-stimulatie, in sterke mate bepaald door een ander cytokine, interleukine-12 (IL-12), dat weer wordt geproduceerd door geïnfecteerde macrofagen en dendritische cellen. Met name mycobacteriën zijn in staat hoge IL-12-productie door geïnfecteerde gastheercellen te induceren. IL-12 bindt aan de IL-12-receptor (IL-12 R) op de T-cel en activeert deze vervolgens tot differentiatie, proliferatie en productie van IFN-γ. Deze cascade verklaart waarom de Th1-respons zo sterk domineert bij mycobacteriële infecties (Figuur 2). De IL-12/IL-12R/IFN-γ/IFN-γ-R-cascade is cruciaal voor de afweer tegen intracellulaire pathogenen, zoals mycobacteriën en salmonellae. Dit blijkt duidelijk uit recent onderzoek aan individuen met ernstige infecties veroorzaakt door doorgaans weinig virulente mycobacteriën zoals *M. bovis* BCG, *M. avium* of salmonellae. Bij deze individuen werden opvallend vaak specifieke genetische mutaties of deleties gevonden in de receptoren voor IL-12 of IFN-γ, die de verhoogde gevoeligheid konden verklaren.⁴

Figuur 2. Type-1 cytokinecascade. Zie tekst voor details.



In tegenstelling tot Th1-cellen produceren Th2-cellen de karakteristieke type-2-cytokinen IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 en soms IL-10. Th2-cellen spelen een belangrijke rol bij humorale immuniteit, allergieën en bij de afweer tegen parasieten en wormen. Daarnaast oefenen type-2-cytokinen een remmende invloed uit op de Th1-respons, met name via IL-4 en IL-10. Th2-immuniteit speelt niet direct een rol bij de afweer tegen mycobacteriën, maar verhoogde type-2-cytokineproductie is gevonden bij tuberculosepatiënten in associatie met een ernstiger beloop van de ziekte (ref 6, Subronto et al, submitted) hetgeen mogelijk samenhangt met het remmende effect van type-2-cytokinen op type-1-immuniteit.

Tabel 1. T-cel-subgroepen: hoofdfuncties, cytokine productie en rol bij immunopathologische ziekten

T-CEL-SUBGROEP	CYTOKINEN	HOOFDFUNCTIES	INDUCTIE DOOR:	DISREGULATIE
Th1	IL-2, IFN-γ, TNF-α	Cellulaire immuniteit (o.a. tegen intracellulaire micro-organismen)	IL-12, IL-18, IL-23	auto-immuniteit
Th2	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13	Humorale immuniteit (via IgE en IgG4)	IL-4	allergie, atopie

CD8⁺-T-cellen

CD8⁺-T-cellen herkennen, evenals CD4⁺-T-cellen, antigenen als peptiden afkomstig van eiwitten, maar nu gepresenteerd door HLA-klasse-I-moleculen. Deze moleculen komen op vrijwel elke gastheercel voor, zodat CD8⁺-T-cellen in principe het complete intracellulaire milieu van de gastheer kunnen bewaken, hetgeen van groot belang is bij bijvoorbeeld immuniteit tegen tumoren en virussen. De peptiden die worden herkend door CD8⁺-T-cellen zijn doorgaans afkomstig uit het cytoplasma van de gastheercel en niet uit endosomale of lysosomale compartimenten (Figuur 1). De CD4⁺- en CD8⁺-T-celsystemen zijn daardoor sterk complementair: het eerste bewaakt de "buitenwereld" (namelijk dat wat zich topografisch in een continuüm bevindt met het extracellulaire milieu zoals de inhoud van endosomen, lysosomen en fagosomen), het CD8⁺-systeem daarentegen de binnenwereld (dat wat topografisch continu is met het cytoplasmatisch milieu in de cel).

CD8⁺-T-cellen kunnen, evenals CD4⁺-T-cellen, onderscheiden worden in type-1- en type-2-cellen op basis van hun cytokine-productieprofielen. De belangrijkste subset is de type-1-CD8⁺-cel, die IFN-γ en TNF-α kan produceren. Type-1-CD8⁺-cellen kunnen bovendien uiterst efficiënt antigeendragende doelwitcellen doden door een scala aan mechanismen. De twee belangrijkste daarvan zijn: (i) de activatie van apoptose (zelfdood)-receptoren op de doelwitcel (bijvoorbeeld het Fas-eiwit), en (ii) de degranulatie van in de CD8⁺-T-cel opgeslagen blaasjes, waardoor de sterk cytotoxische inhoud van deze blaasjes vrijkomt in de synaps tussen de T-cel en de doelwitcel. Deze laatste cytotoxische moleculen omvatten onder andere perforine, een complementachtig molecuul dat de permeabiliteit van de doelwitcelwand kan vergroten; granzymes, die proteolytische activiteit bezitten; en een recent ontdekt eiwit, granulysin, dat een direct microbicide effect kan hebben op intracellulaire pathogenen, waaronder mycobacteriën.⁷ Een mogelijk scenario is dat perforine eerst kleine poriën maakt in de geïnfecteerde macrofaagcelwand waardoor de cel beschadigd wordt, waarna granulysin de cel binnen dringt en de bacterie doodt.

Terwijl het belang van CD4⁺-T-cellen en type-1-cytokines bij mycobacteriële infecties algemeen aanvaard wordt (zie boven), is er omtrent de rol van CD8⁺-T-cellen minder consensus. Dit is deels een gevolg van het feit dat de technieken om CD8⁺-T-cellen, die specifiek zijn voor mycobacteriën aan te tonen bij de mens pas vrij recent beschikbaar zijn, zoals zeer gevoelige Elispot-cytokine bepalingen en fluorescerende tetramere constructen van HLA-klasse-I-moleculen beladen met een enkel type peptide.⁸ Depletie van CD8⁺-T-cellen in met *M. tuberculosis* geïnfecteerde muizen liet zien dat dit vroeg in de infectie geen effect had, terwijl dit in een latere fase van de infectie leidde tot verminderde bescherming.⁹ Dit suggereert dat CD8⁺-T-cellen wellicht een rol zouden kunnen spelen bij de controle van de late fase van de infectie in de muis.

Het is echter mogelijk dat bij de mens antigeenspecifieke CD8⁺-T-cellen belangrijker zijn dan bij de muis: recent werk heeft laten zien dat, in tegenstelling tot het klassieke dogma dat *M. tuberculosis* alleen voorkomt in macrofagen,

de bacterie ook kan voorkomen in andere cellen in de luchtwegen zoals pneumocyten, endotheelcellen en fibroblasten.¹⁰ Belangrijk in dit verband is dat deze cellen normaal gesproken géén HLA-klasse-II- maar wél HLA-klasse-I-moleculen tot expressie brengen op hun oppervlak. Dit betekent dat deze cellen alleen herkend kunnen worden op infectie met *M. tuberculosis* door CD8⁺-T-cellen. Bij de ontwikkeling van nieuwe vaccins dient met deze potentieel belangrijke rol van CD8⁺-T-cellen rekening te worden gehouden.^{11,12}

Naast de 'klassieke' HLA-klasse-II-gerestricteerde CD4⁺-Th1-cellen en HLA-klasse-I-gerestricteerde CD8⁺-T-cellen zijn er diverse 'niet-klassieke' T-cel-subgroepen.⁹ Interessant genoeg zijn deze subgroepen veelal ontdekt in relatie met mycobacteriële infecties. Zonder in detail op deze T-cel-populaties in te gaan (aangezien vooralsnog niet geheel vaststaat wat de rol van deze cellen is in de afweer tegen mycobacteriën), wordt hier slechts vermeld dat het betreft: (i) T-cellen die een alternatieve T-celreceptor voor antigeen dragen (niet de klassieke T-cel-αβ-receptor maar de T-cel-γδ-receptor), en die veelal non-peptidestructuren herkennen, zoals mycobacteriële fosfolipiden. (ii) CD1-gerestricteerde T-cellen. Deze kunnen zowel CD4⁺8⁺, CD4⁺8⁻ als CD4⁻8⁺ (dubbel negatief) zijn, en herkennen eveneens non-peptidestructuren, waaronder mycolozuren, ganglioside-fosfatidyl-inositol-mannosiden, fosfo-isoprenoiden en glycolipide structuren, gepresenteerd door non-polymorfe, MHC-I-achtige presentatie moleculen behorende tot de CD1-familie (CD1a, CD1b, CD1c). Het feit dat mycobacteriën een uitzonderlijke celwand bezitten die zeer rijk is aan lipiden en glycosylerde structuren doet vermoeden dat cellulaire immuniteit tegen deze componenten kan bijdragen aan de inductie van optimale immuniteit tegen mycobacteriële ziekteverwekkers.

Zoals hiervoor reeds genoemd, wordt het bewijs dat bepaalde T-celsubgroepen of cytokinen een rol spelen bij beschermende immuniteit tegen tuberculose veelal ontleend aan experimenten in proefdieren waarbij specifieke genen zijn geïnactiveerd (zogenoemde 'knockout'-muizen). Hoewel er immunologisch grote overeenkomsten zijn tussen muis en mens, verschillen deze species echter in gevoeligheid voor *M. tuberculosis*-infectie en in 'klinisch' beloop van de ziekte. De muis is relatief resistent tegen tuberculose en ontwikkelt niet de klassieke longtuberculose zoals die bij de mens wordt gezien. Deze laatste wordt gekarakteriseerd door – waarschijnlijk immunologisch gemedieerde – centrale necrose in de gevormde granulomata, wat leidt tot 'verkazing', en door de vorming van cavernes als gevolg van verder voortschrijdende weefseldestructie. Ten slotte leiden deze processen tot de rupturering van infectieus materiaal in de bronchiën waardoor open longtuberculose ontstaat: bacteriën worden opgehoest, en de besmettingscyclus is rond. Het muismodel lijkt derhalve adequaat wanneer het gaat om het vaststellen van de immunologische mechanismen die betrokken zijn bij bescherming tegen acute infectie, maar minder informatief wanneer het gaat om het chronisch beloop van de infectie. Uit deze modellen is gebleken dat in elk geval de volgende moleculen en cellen onmisbaar zijn (zie o.a. ref 3, 9, 13 en Figuur 1 en 2).

- CD4 ⁺	} duidend op een belangrijke rol voor CD4 ⁺ -T-cellen en type-1-cytokinen
- IL-12 Rβ1	
- MHC-II	
- TCRαβ	
- IFN-γ	} duidend op een belangrijke rol voor macrofagen en type-1-cytokinen
- TNF-α-R	
- IFN-γ-R1	
- IL-12	
- MHC I	} duidend op een waarschijnlijke rol voor CD8 ⁺ -T-celimmunititeit
- β ₂ -microglobuline	
- TAP (Transporter of Antigenic Peptides)	

Bestaat beschermende immuniteit tegen tuberculose?

Het antwoord op deze belangrijke vraag hangt uiteraard af van wat men definieert als bescherming. Bekend is dat infectie met *M. tuberculosis* in slechts 5 tot 10 procent van de gevallen leidt tot klinisch manifeste ziekte, veelal na een eerdere fase van latente infectie. Klinisch actieve tuberculose kan zich soms pas decennia na initiële infectie ontwikkelen onder invloed van endogene of exogene, immunocompromiterende factoren. Omdat *M. tuberculosis* langdurig latent in de menselijke gastheer aanwezig kan blijven, leidt tuberculose-infectie en de daarop volgende immunorespons dus veelal niet tot 'steriele' immuniteit, dat wil zeggen eliminatie van de bacterie uit het lichaam. Recent is ook aangetoond dat natuurlijke infectie niet noodzakelijkerwijs beschermt tegen exogene reïnfectie met andere *M. tuberculosis*-isolaten:⁴ met behulp van DNA-fingerprinting kon worden bewezen dat de *M. tuberculosis*-stam die reïnfectie veroorzaakte verschilde van de primaire verwekker.¹⁴

Infectie met *M. tuberculosis* leidt derhalve waarschijnlijk niet tot optimale immuniteit. Het is niet duidelijk of dit in het algemeen geldt, of alleen voor de genoemde 5 tot 10 procent van de geïnfecteerde individuen die verhoogd gevoelig zijn voor het ontwikkelen van klinisch manifeste tuberculose. De pas zeer recent beschikbaar gekomen kwantitatieve parameters voor het bepalen van T-celafhankelijke immuniteit, zoals bijvoorbeeld peptide/HLA-tetrameren⁸ en Elispot-technieken, zullen mogelijk helpen onderscheid te maken tussen zulke 'gevoelige' en 'resistente' individuen. In het ideale geval kunnen daarbij correlaten van beschermende immuniteit gevonden worden die als markers kunnen dienen voor het vaststellen van effectieve, beschermende immuniteit.

Traditionele en nieuwe vaccinstrategieën

Van *M. tuberculosis* is bekend dat het micro-organisme zich ophoudt in fagosomale compartimenten in de geïnfecteerde gastheercel, en aldaar diverse immunologisch relevante processen actief beïnvloedt, om op die manier te ontkomen aan immunologische herkenning. Zo is *M. tuberculosis* in staat de maturatie van fagosomen tot fagolysosomen te voorkomen zodat de bacterie niet wordt blootgesteld aan lage pH, proteasen en ander toxische componenten. Ook remt de bacterie de presentatie van peptiden via HLA-klasse-II-moleculen en interfereert de bacterie met IFN-γ-R-sigtaaltransductie en macrofaagactivatie. Het enige beschikbare vaccin, *M. bovis* BCG, dat door Calmette en

Guérin in de twintiger jaren in Frankrijk werd ontwikkeld, leidt wellicht aan hetzelfde euvel: hoewel BCG-vaccinatie miliaire en meningeale tuberculose in kinderen helpt voorkomen, is het niet voldoende effectief in het induceren van bescherming tegen longtuberculose bij volwassenen, de meest frequente vorm van tuberculose.^{15,16}

Vele andere factoren zijn reeds in verband gebracht met het geringe succes van BCG-vaccinatiecampagnes, waaronder de remmende invloed van eerdere infectie met atypische mycobacteriën uit de omgeving. Voorafgaande expositie aan bijvoorbeeld *M. avium* zou een antimycobacteriële immunorespons kunnen induceren die leidt tot snelle eliminatie van *M. bovis* BCG, zodat BCG niet de kans krijgt optimale immuniteit tegen tuberculose op te wekken (P. Andersen et al, persoonlijke comm.). Een andere verklaring zou kunnen zijn dat de door mycobacteriën uit de omgeving opgewekte respons reeds zo krachtig is dat BCG geen additief effect zou sorteren. Dit valt minder goed te rijmen met de waarneming dat in dezelfde gebieden BCG wél beschermt tegen lepra.¹⁶

Op dit moment wordt in Europa in het kader van een groot EU-tuberculose Vaccine cluster, maar ook in de Verenigde Staten, intensief onderzoek gedaan naar mogelijkheden om vaccins te ontwikkelen die effectiever zijn dan BCG. Hoewel het nog te vroeg is hierover te kunnen rapporteren, is het goed denkbaar dat met behulp van efficiënte toedienings-systemen en adjuvantia, in combinatie met de juiste antigenen van de bacterie, langdurige immuniteit kan worden opgewekt. In Tabel 2 wordt een overzicht gegeven van een aantal van zulke vaccinkandidaten.

Zonder uitvoerig in te gaan op de verschillende vaccins die momenteel in proefdiermodellen worden getest^{11,12} lijkt momenteel het gebruik van subunitvaccins kansrijk. Ook vaccinatie met alternatieve stammen, zoals recombinant BCG of genetisch verzwakte *M. tuberculosis*-stammen is een optie: één rBCG-stam die het 30kD-eiwit van *M. tuberculosis* overmatig tot expressie brengt induceert duidelijk betere bescherming in proefdieren dan BCG zelf.¹⁷ Diverse subunitstrategieën, onder andere gebaseerd op DNA-vaccinatie met Ag85 of hsp60, twee dominante antigenen van de bacterie, worden eveneens intensief bestudeerd. Opvallend is dat sommige van deze vaccins wel de gemiddelde overleving van de gastheer kunnen verhogen, maar weinig effect hebben op reductie van het aantal bacteriën. Het is waarschijnlijk dat nieuwe ontwikkelingen ook spoedig zullen plaatsvinden naar aanleiding van 'prime-boost'-strategieën: hierbij wordt via een eerste immunisatie (bijvoorbeeld met behulp van DNA-immunisatie of BCG) een primaire respons opgewekt, terwijl bij de boost het antigeen op een andere wijze wordt toegediend, bijvoorbeeld via een virale vector, om op deze wijze krachtige en langdurige immuniteit op te wekken. In enkele diermodellen werkt deze aanpak al efficiënt.¹⁸

Immunogenetica van tuberculose

Reeds eeuwenlang is bekend dat tuberculose familiair voorkomt en dat het klinisch beloop in verschillende individuen zeer verschillend kan zijn, ondanks een vergelijkbare infectiedruk. Naast exogene oorzaken zoals voedingsstatus, algemene gezondheidstoestand, etc. spelen ook erfelijk bepaalde gastheerfactoren hierbij een rol. Identieke tweelingen zijn significant vaker concordant voor tuberculose dan twee-eiige tweelingen.¹⁹

Tabel 2.

TYPE VACCIN	RATIO	VOOR- EN NADELEN
1. <i>M. vaccae</i> <i>M. microti</i>	avirulente mycobacteriën die effectiever zouden kunnen werken dan BCG	• weinig bewijs voor deze aanname, maar eenvoudig te vervaardigen
2. Recombinant-BCG, dat expresseert: a) cytokinen (IFN-γ, TNF-α, IL-12) b) listeriolytine	rationeel verbeterd BCG a) versterkte inductie type-1-immuniteit b) translocatie uit fagosoom naar cytoplasma, t.b.v. efficiëntere klasse-I-processing	• veiligheidsaspecten: leidend aan zelfde manco als BCG zelf?, overall tot nog toe even goed als BCG, maar niet duidelijk beter m.u.v. het: • recombinant 30kD-BCG: beter dan BCG?
c) recombinant 30kD van <i>M. tuberculosis</i>	c) overexpressie immuno dominant antigeen	
3. Geattentueerde (veelal auxotrofe) <i>M. tuberculosis</i> -stammen	optimale inductie immuniteit zonder gevaar voor disseminerende infectie	• veiligheidsaspecten, m.n. de acquisitie van nieuwe virulentiegenen • in het algemeen tot nog toe niet duidelijk beter dan BCG
4. Subunit vaccinkandidaten Typen:		• eenvoudig en veilig te vervaardigen en toe te dienen, ook bij de immuungecompromiteerde gastheer, ontwikkelingen in efficiëntere 'delivery systems'
a) recombinant eiwitten	• selectie mogelijk van dominante en relevante eiwitten voor vaccinatie	• protectie
b) fusie-eiwitten	• selectie immunologisch relevante gedeelten van eiwit	• goede / zeer goede protectie
c) DNA-vaccins	• goede priming van CD4 ⁺ en CD8 ⁺ -T-cel type-1-immuniteit	• goede / zeer goede protectie
d) heterologe prime-boost subunit-vaccinatiestrategieën	• combinatiestrategie van bv BCG/ virale vector, of DNA/virale vector	• veelbelovende resultaten

Diverse genen of loci zijn in verband gebracht met verhoogde gevoeligheid voor tuberculose. Enkele kandidaatgenen zijn:

- (i) NRAMP¹
dit codeert voor een macrofaag/fagosoom eiwit, N-ramp-1, dat Fe²⁺ en Mg²⁺-transport reguleert¹⁹ en in muizen gevoeligheid voor diverse intracellulaire pathogenen bepaalt. Bij de mens zijn associaties gevonden tussen tuberculose en vier N-ramp-polymorfismen.¹⁹
- (ii) vitamine-D-receptor (VDR)
de receptor op macrofagen voor vitamine D₃, dat samen met IFN-γ de uitgroei van *M. tuberculosis* in de gastheercel kan remmen.²⁰
- (iii) HLA-klasse II, vooral HLA-DR2
dit is betrokken bij antigeenpresentatie aan CD4⁺-T-cellen, en kan op die manier waarschijnlijk T-celimmunitet moduleren.^{19,21}

Het valt op dat elk van deze genen invloed lijkt uit te oefenen op macrofagen, T-cellen, of beide, hetgeen in overeenstemming is met de belangrijke rol van de cellulaire afweer bij mycobacteriële infecties. De gevonden associaties zijn echter doorgaans relatief zwak, en suggereren dat genetisch bepaalde gevoeligheid voor tuberculose door andere dominante genen, of door interacties tussen meerdere gensystemen, bepaald wordt. De ernstig verhoogde gevoeligheid voor mycobacteriële infectieziekten bij deficiënties in de type-1-cytokinecascade, zoals de genoemde IL-12R of IFN-γR, doet vermoeden dat subtielere genetische variaties in deze zwakke plaats van de cellulaire afweer een rol kunnen spelen in gevoeligheid voor tuberculose of lepra, zeker gezien de kwantitatieve relatie tussen de ernst van de genetisch bepaalde storing en het klinisch beloop.⁴ Ook het vóórkomen van tuberculose bij reumapatiënten gedurende behandeling met anti-TNF

past in dit beeld.²² De beschikbaarheid van de gehele humane genomesequentie alsmede die van zeer grote aantallen single-nucleotide-polymorfismen (SNP) zal de identificatie van gevoeligheid- c.q. weerstand-markers en -genen en hun functie versneld helpen vaststellen. Dit zal niet alleen belangrijk zijn bij het identificeren van risicogroepen maar ook bij het ontwikkelen van meer effectieve vaccins voor de (gevoelige) humane populatie, op basis van fundamentele inzichten in de immunologie en immunogenetica van de interactie tussen de menselijke gastheer en de tuberkelbacil.

Summary

This review describes recent developments in the immunology and immunogenetics of mycobacterial infectious diseases, particularly tuberculosis. A detailed overview of the cell types and cytokines involved in host defence against mycobacteria is presented, including their major functions. Implications for the design of improved vaccines against tuberculosis are discussed. Genetic host factors may control susceptibility to mycobacterial infectious diseases, and the availability of the information following completion of sequencing the human genome may help to define genes governing susceptibility to disease.

Prof. dr. T.H.M. Ottenhoff, arts-immunoloog, Leids Universitair Medisch Centrum Afd. Immunohematologie en Bloedtransfusie, Gebouw 1, E3-Q, Postbus 9600, 2300 RC Leiden

Dankbetuiging

De steun van de Nederlandse Lepra Stichting (NSL), NWO/ZON-MW, KNAW en EU wordt met dank vermeld.

Literatuur

1. Kaufmann SHE. Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nat Med* 2000;6:955-60.
2. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a global epidemic. *JAMA* 1995;273:220-6.
3. Hess J, Schaible U, Raupach B, Kaufmann SHE. Exploiting the immune system: toward new vaccines against intracellular bacteria. *Adv in Immunol* 2000;75:1-88.
4. Ottenhoff THM, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-1 cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Immunol Today* 1998;19:491-4.
5. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996;383:787-93.
6. Van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg B-J, Nelwan RHH, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 2000;181:1194-7.
7. Stenger S, Rosat J-P, Bloom BR, Krensky AM, Modlin RL. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* 1999;20:390-4.
8. Geluk A, Meijgaarden KE van, Franken KLMC, Drijfhout JW, D'Souza S, Necker A, et al. Identification of major epitopes of mycobacterium tuberculosis AG85B that is recognized by HLA-A*0201 restricted CD8⁺ T cells in HLA transgenic mice and humans. *J Immunol* 2000;165:6463-71.
9. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
10. Hernández-Pando R, Jeyanathan M, Mengistu G, Aguilar D, Orozco H, Harboe M, et al. Persistence of DNA from *Mycobacterium tuberculosis* in superficially normal lung tissue during latent infection. *Lancet* 2000;356:2133-7.
11. Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* 2001;22:160-8.
12. Orme IM, McMurray DN, Belisle JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol* 2001;9:115-8.
13. Mogues T, Goodrich ME, Ryan L, LaCourse R, North RJ. The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Exp Med* 2001;193:271-80.
14. Rie A van, Warren R, Richardson M, Victor TC, Gie RP, Enarson DA, et al. Exogenous reinfection as a cause of recurrent tuberculosis after curative treatment. *N Engl J Med* 1999;341:1174-9.
15. Colditz GA, Brewer RF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, et al. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta-analysis of the published literature. *JAMA* 1994;271:698-702.
16. Fine PEM. Variation in protection by BCG - Implications of and for heterologous immunity. *Lancet* 1995;346:1339-45.
17. Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Masle_a-Galiç. Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30-kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *PNAS* 2000;97:13853-8.
18. McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AVS. Enhanced immunogenicity of CD4⁺ T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infect Immun.* 2001; 69: 681-6.
19. Hill AVS. The immunogenetics of human infectious diseases. *Ann Rev Immunol* 1998;16:593-617.
20. Rook GA. The role of vitamin D in tuberculosis. *Ann Rev Respir Dis* 1988;138:768-70.
21. Ottenhoff THM, De Vries RRP. HLA class II immune response and suppression genes in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1987;55:521-34.
22. Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol* 2001;19:163-96.

Nieuwe inzichten in de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties

S.A.J. ZAAT, J.J. BOELENS, J. DANKERT

Biomateriaal-gerelateerde infecties, meestal veroorzaakt door *Staphylococcus epidermidis* of andere coagulase-negatieve stafylokokken, zijn een groot probleem. Aangenomen wordt dat hechting van de bacteriën aan het oppervlak van het biomateriaal de eerste stap is in de pathogenese van deze infecties. Om infectie te voorkómen worden dan ook biomaterialen met antimicrobiële eigenschappen ontwikkeld. Wij gebruiken hiervoor zogeheten thrombocidines: antimicrobiële eiwitten gezuiverd uit bloedplaatjes, die uit speciaal daarvoor ontworpen polymeren op gecontroleerde wijze worden afgegeven van het biomateriaaloppervlak.

De aanwezigheid van een biomateriaal in weefsel veroorzaakt een ontstekingsreactie, de zogenoemde vreemd-lichaamsreactie. In onze onderzoeken naar infectiegevoeligheid van verschillende typen subcutaan aangebrachte biomaterialen in een muismodel bleek, dat de aanwezigheid van lage aantallen *S. epidermidis* of van geringe hoeveelheden bacteriële componenten als peptidoglycaan of lipopolysaccharide de vreemd-lichaamsreactie sterk moduleerden. De aard van deze modulatie was bovendien afhankelijk van het type biomateriaal. Rond silicon-elastomeer met een polyvinylpyrrolidonehydrogelcoating trad een sterk pro-inflammatoire reactie op, met onder andere langdurig verhoogde interleukine-1 (IL-1)-spiegels, en persisteerde de geïnoculeerde *S. epidermidis* in het weefsel. In IL-1-receptor knock-out-mutantmuizen trad noch de sterke pro-inflammatoire respons, noch bacteriële persistentie op. Rond pvp-gecoat polyamide had de reactie een meer anti-inflammatoir karakter, en persisteerden grote aantallen *S. epidermidis* intracellulair in macrofagen rond het biomateriaal. Intracellulaire persistentie kon door toediening van het macrofaag-activerend cytokine interferon gamma worden voorkomen. Deze resultaten geven aan, dat immuunmodulatie mogelijk een belangrijke bijdrage kan leveren aan het voorkomen en behandelen van biomateriaal-gerelateerde infecties.

Trefwoorden: biomateriaal, CNS, CoNS, defensin

Inleiding

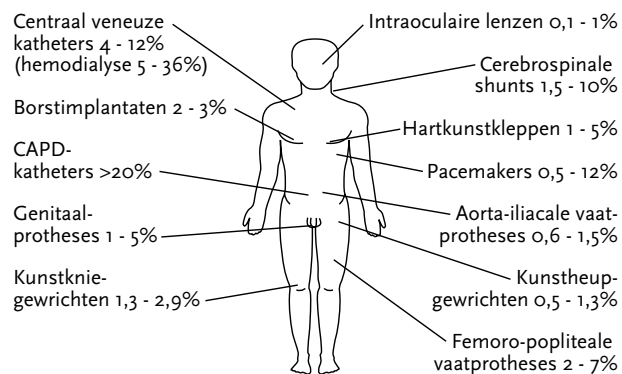
In de huidige medische praktijk is het gebruik van kunststof- en metalen hulpmiddelen niet meer weg te denken. Dankzij implanteerbare functievervangende en -ondersteunende hulpmiddelen als hartkunstkleppen, vaatprothesen, pacemakers en kunstgewrichten is de levensverwachting en kwaliteit van leven van een grote groep patiënten de laatste decennia sterk verbeterd. Daarnaast is een groot aantal verschillende intravasale- en urinewegkatheters voorhanden. Deze hulpmiddelen worden vervaardigd uit diverse kunststoffen en metalen die worden aangeduid als 'biomaterialen'. De term biomaterialen wordt echter ook vaak gebruikt om de van deze biomaterialen vervaardigde hulpmiddelen aan te duiden. In dit overzicht zal dit kortheidshalve ook worden gedaan.

Het gebruik van biomaterialen heeft een hoge vlucht genomen. Ieder jaar worden wereldwijd circa drie miljoen centraal veneuze katheters gebruikt^{1,2}, en worden in de V.S. 150-200 miljoen perifere intravasale katheters toegepast.³ Ook het aantal permanente implantaten is indrukwekkend: alleen al in de V.S. worden jaarlijks 222.000 kunstheupgewrichten,

110.000 kunstkniegewrichten, meer dan 100.000 hartkunstkleppen en 115.000 tot 130.000 pacemakers geïmplanteed.³ Met de toenemende vergrijzing is de verwachting dat het gebruik van biomaterialen alleen maar zal toenemen.

Ondanks dat in verreweg de meeste gevallen biomaterialen met succes worden toegepast, is het optreden van infecties nog steeds een groot probleem. Afhankelijk van het type hulpmiddel worden infectiepercentages gerapporteerd tussen de 0,1 procent en meer dan 20 procent^{2,4,5} (Figuur 1). Deze infecties zijn in de regel moeilijk te behandelen met antibiotica alleen, en afhankelijk van het type hulpmiddel moet het biomateriaal in een groot aantal gevallen verwijderd worden om genezing te bewerkstelligen. Met name bij implantaten als hartkunstkleppen, vaatprothesen en kunstgewrichten, is vervanging zeer belastend voor de patiënt, en niet zonder risico. Biomateriaal-gerelateerde infecties leiden dan ook tot verhoogde morbiditeit en mortaliteit, en daarnaast tot een sterke kostenstijging. De jaarlijkse kosten voor de verzorging van intensive-carepatiënten met centraal veneuze katheter-gerelateerde infecties in de V.S. bedragen 0,3 - 2,3 miljard US dollar.⁶

Figuur 1. Frequenties van infecties bij diverse biomaterialen.^{1,2,4}



Het is daarom van groot belang de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties te ontrafelen, om enerzijds deze infecties te voorkomen en anderzijds de optredende infecties beter te kunnen behandelen.

Epidemiologie en pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties

De belangrijkste verwekkers van biomateriaal-gerelateerde infecties zijn coagulase-negatieve stafylokokken (CNS of CoNS), met name *Staphylococcus epidermidis*.^{1,4} Deze commensale huidbacteriën veroorzaken bij de gezonde mens vrijwel nooit infecties, maar blijken in aanwezigheid van een biomateriaal te overleven, te persisteren, en infecties te veroorzaken. Naast CoNS zijn *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* en Enterobacteriaceae belangrijke verwekkers van biomateriaal-gerelateerde infecties. Een toenemend aantal infecties wordt door antibioticaresistente bacteriën veroorzaakt.⁴

Bij de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties is er een belangrijk verschil tussen biomaterialen die worden geïmplantatoerd en katheters die intravasaal of in de urineweg worden aangebracht. Meestal is er bij implantaten na de operatie geen 'porte d'entrée'. Micro-organismen moeten derhalve tijdens de operatie op het biomateriaal of in de wond terecht zijn gekomen. Voor intravasale- en urinewegkatheters is er wel altijd een porte d'entrée, en kunnen micro-organismen ook na de insertie het biomateriaal bereiken. Bij intravasale katheters kan ook de infusievloeistof, meestal na secundaire besmetting, de bron van de besmetting zijn.^{1,5}

Bij implantaten worden vaak drie categorieën infecties onderscheiden, (i) vroege infecties, (ii) late implantatie-gerelateerde infecties, en (iii) late hematogene infecties, waarbij de bron zich elders in het lichaam bevindt. De periode waarbinnen gesproken wordt van vroege infecties is per type implantaat verschillend.^{1,4} In de eerste twee categorieën treedt bijvoorbeeld bij orthopedische implantaten de besmetting tijdens of kort na de operatie op. Vroege infecties worden relatief vaak veroorzaakt door sterk pathogene micro-organismen als *S. aureus*, terwijl late implantatie-gerelateerde infecties vaak een minder virulente verwekker hebben zoals *S. epidermidis*.⁴ Late infecties van bijvoorbeeld hartkunstkleppen zijn zelden het gevolg van per-operatieve besmetting van biomateriaal of wond; het zijn overwegend late hematogene infecties veroorzaakt door micro-organismen uit infecties elders in het lichaam of uit de endogene flora.

Biomaterialen verhogen de gevoeligheid voor infecties

Reeds lang is bekend dat de aanwezigheid van een biomateriaal in weefsel de gevoeligheid voor infecties sterk verhoogt. Klassiek is het onderzoek van Elek en Cohnen uit 1957, waarin het optreden van een *S. aureus*-infectie rond zijden hecht draad werd onderzocht.⁷ Bij gezonde vrijwilligers werden hecht draaden die waren besmet met *S. aureus* ofwel door de huid heen getrokken, waarbij 80 procent van het inoculum achterbleef, ofwel in de huid achtergelaten. In aanwezigheid van de hecht draad ontwikkelden zich bij een inoculum van 10^2 tot 10^3 KVE na 48 uur laesies die, ondanks penicilline-therapie en verwijderen van de hecht draad, uitgroeiden tot "abscesses the size of oranges". In afwezigheid van de hecht draad waren zeker 10.000 maal meer bacteriën nodig om een laesie te veroorzaken. De auteurs kwamen tot de slotsom dat: "This experiment convincingly demonstrated the enhancing effect of the stitch, but led to great difficulty in finding further volunteers". Dit onderzoek is dan ook gevolgd door een aantal dierstudies, waarin ook steeds het infectiepotentiërend effect van lichaamvreemd (bio)materiaal werd vastgesteld.⁸⁻¹⁰ Tot op heden is nog verre van duidelijk waarom de aanwezigheid van een biomateriaal de gevoeligheid voor infectie zo sterk verhoogt. De gangbare hypothesen over de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties spitsen zich toe op hechting van de micro-organismen op het biomateriaaloppervlak, direct dan wel via gastheer-eiwitten die kort na insertie of implantatie op het biomateriaaloppervlak aanwezig zijn, en op het verlagen van de effectiviteit van de polymorfkernige neutrofiële granulocyten (PMN).

Hechting van micro-organismen aan het biomateriaaloppervlak

De microbiële hechting als onderdeel van de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties is recentelijk uitgebreid in dit tijdschrift behandeld⁶, en zal daarom hier slechts op hoofdlijnen worden besproken. Het oppervlak van biomaterialen die verwijderd zijn uit patiënten vanwege infectie, vertoont bij (elektronen)microscopisch onderzoek vaak een zogenoemde 'biofilm'.¹¹ Zo'n biofilm bestaat uit aan het biomateriaaloppervlak gehechte gastheer-eiwitten, micro-organismen, en door de micro-organismen geproduceerde polysacchariden en eiwitten. *S. epidermidis* maakt voor de initiële hechting aan kunststofoppervlakken en de vorming van de biofilm door onder andere intercellulaire hechting gebruik van verschillende adhesiefactoren, waarvan het kapselpolysaccharide adhesin (PS/A), het polysaccharide intercellular adhesin (PAI) en het autolysine AtlE de bekendste zijn.¹² Ook kan hechting optreden aan op het biomateriaal gehechte gastheer-eiwitten¹³ en bloedplaatjes.^{14,15} De gehechte *S. epidermidis* vormen een extracellulair polysaccharide, vaak aangeduid als 'slime'^{16,17} (Figuur 2), dat bijdraagt tot de biofilmvorming en dat *in vitro* de functionaliteit van leukocyten verlaagt.^{18,19}

Preventie van microbiële hechting aan biomaterialen

Veel onderzoek is verricht naar de fysisch-chemische karakteristieken van zowel micro-organismen als biomateriaaloppervlakken en hun invloed op de hechting.²⁰⁻²³ Een belangrijke doelstelling van dit type onderzoek is het ontwikkelen van oppervlakken waar micro-organismen slecht op hechten. Een andere benadering voor de preventie van biomateriaal-gerelateerde infecties is het voorzien van biomaterialen van een

Figuur 2. Op kunststof gehechte *S. epidermidis*-bacteriën met het begin van een "slime" laag.



antimicrobiële laag. Deze kan onder andere bestaan uit een metaal, zoals bij met zilver bedekte katheters en hartkunstkleppen, of uit aan het oppervlak gekoppelde desinfectantia of antibiotica.^{6,23} Uit klinische onderzoeken blijkt dat met chloorhexidine/zilversulfadiazine²⁴ en met rifampine/minocycline bedekte centraal veneuze katheters²⁵ bacteriëmie en infecties van de insteekopening voorkomen. Voor veel andere antimicrobiële biomaterialen is een dergelijke effectiviteit echter nog niet aangetoond.⁶ Biomaterialen kunnen ook antimicrobiële eigenschappen verkrijgen door het aanbrengen van elektrische lading.^{26,27} Deze technologie bevindt zich nog in de ontwikkelingsfase; er zijn nog geen klinische onderzoeken met dergelijke katheters gerapporteerd.⁶

Een derde strategie om biomaterialen antimicrobiële eigenschappen te verlenen, is het gebruik van specifieke polymeren voor de gecontroleerde afgifte van antimicrobiële agentia. Recentelijk is binnen ons onderzoek voor de dacron hechtring van kunstkleppen een dergelijk systeem ontwikkeld. Hierbij worden thrombocidines, cationische antimicrobiële eiwitten die wij hebben geïsoleerd uit humane bloedplaatjes²⁸, op gecontroleerde wijze afgegeven uit een daarvoor specifiek ontworpen, biologisch afbreekbare gelatine-chondroitine-sulfaatpolymeer.^{29,31} Een volgende stap zal zijn de werkzaamheid van het systeem in diermodellen te onderzoeken. Naar verwachting bieden dergelijke systemen met een vertraagde afgifte mogelijkheden om infectieresistente biomaterialen te ontwikkelen, waarbij de dosis en afgiftesnelheid van het antimicrobiële agens nauwkeurig kunnen worden afgestemd op de specifieke toepassing.

Hechting van bacteriën is niet het hele verhaal

Ondanks dat hechting en biofilmvorming op het biomateriaal van belang is in de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties, spelen andere factoren vermoedelijk een belangrijkere rol. Zo is aangetoond dat de mate van biofilmvorming op intravasculaire katheters geen directe relatie heeft met het krijgen van een katheter-gerelateerde infectie.^{6,3} Bij ons dierexperimenteel onderzoek vonden we een discrepantie tussen de mate van hechting van *S. epidermidis* aan twee biomaterialen *in vitro*, en de frequentie van infecties in een muismodel voor biomateriaal-gerelateerde infecties. Het betrof hier materialen voor hydrocefalus-shunts: siliconelastomeer (SE) en polyvinylpyrrolidone (pvp)-bedekt silicon elastomeer (SEpvp). De pvp-laag vormt een hydrogel, die *in vitro* de hechting van *S.*

epidermidis tienvoudig verminderde.³² Geheel in tegenstelling met de verwachting hadden muizen met het subcutaan geïmplantatoerde SEpvp juist het hoogste aantal infecties.³³

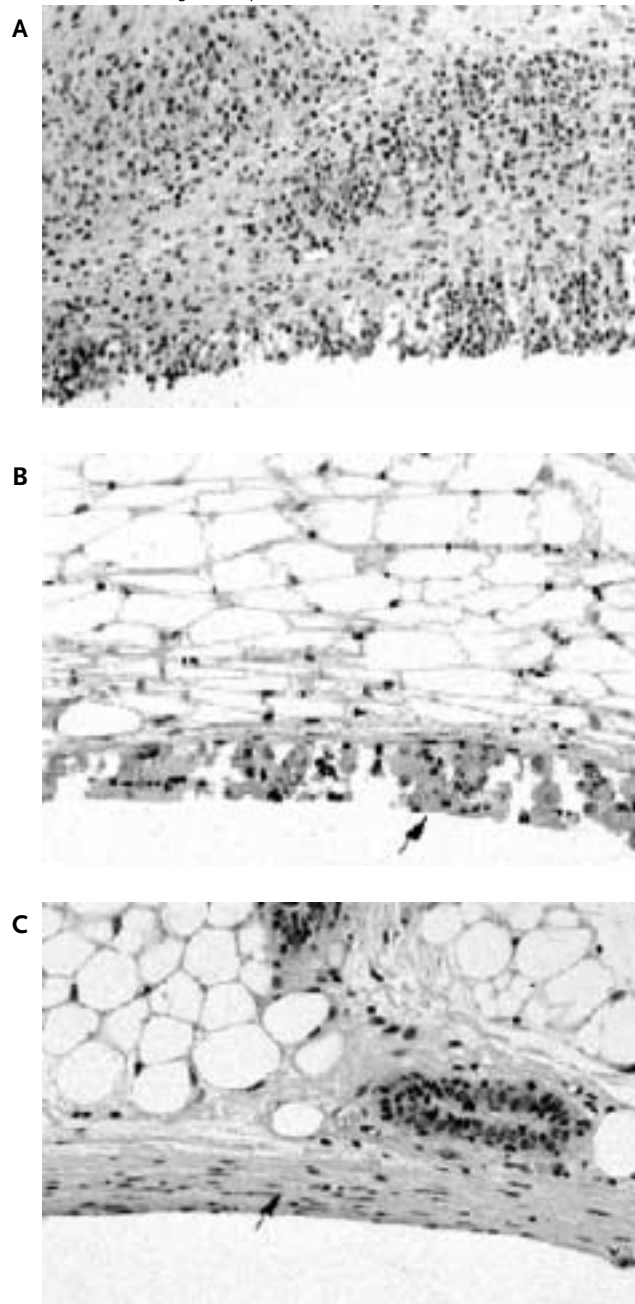
Invloed van een biomateriaal op de functionaliteit van de PMN

Al ongeveer 20 jaar geleden rapporteerden Zimmerli et al. dat biomaterialen de fagocytair en bactericide activiteit van PMN's beïnvloedden. In hun onderzoek kregen cavia's een subcutane *tissue cage* (een 'kooitje' van roestvrijstaal gaas) met daarin een stukje biomateriaal, waaruit 14 dagen na implantatie weefselvocht werd geaspireerd.^{10,34} Wanneer de PMN's uit dit aspiraet *in vitro* werden getest, bleken zij sterk verlaagde fagocytair en bactericide activiteit te hebben. Overigens leidde inoculatie met *Staphylococcus aureus* in de tissue cage tot rekrutering van PMN's, die ondanks de aanwezigheid van het biomateriaal vrijwel dezelfde activiteit hadden als PMN's uit de bloedbaan.³⁴ Alleen in afwezigheid van bacteriën neemt de activiteit van de PMN's rond het biomateriaal na langere tijd dus zichtbaar af. In het licht van de uiteindelijke acceptatie van het biomateriaal door het weefsel is dit ook een gewenste ontwikkeling. Na deze onderzoeken hebben meerdere, voornamelijk *in-vitro*-onderzoeken, bevestigd dat de fagocytair en bactericide activiteit van PMN's wordt verminderd door blootstelling aan een steriel biomateriaal.^{35,36} Dat kan onder andere worden veroorzaakt door defensins, die door de PMN's zelf worden uitgescheiden als gevolg van activatie door contact met het biomateriaal.³⁷ Dit is echter slechts één aspect van de effecten in het weefsel van de gastheer die optreden als gevolg van de aanwezigheid van biomateriaal.

De 'vreemd-lichaamsreactie' rond een biomateriaal

Na insertie of implantatie van het steriele biomateriaal treedt een zogenaamde vreemd-lichaamsreactie op.^{20,38} Deze lijkt in eerste instantie vooral op een acute ontstekingsreactie, met een sterke influx van PMN's (Figuur 3A), een verhoogde doorbloeding, en inductie van de expressie van vooral pro-inflammatoire cytokines als tumornecrosefactor- α (TNF- α), interleukine (IL)-1 β , IL-6, en IFN- γ . De influx van PMN's wordt gevolgd door een toename van het aantal mononucleaire cellen. De acute fase gaat geleidelijk over in een meer chronische ontstekingsreactie, waarbij de belangrijkste ontstekingscellen macrofagen zijn, en de PMN's verdwijnen. De macrofagen doen een ultieme poging om het veel te grote 'partikel', het biomateriaal, te fagocyteren. Daarbij fuseren zij tot veelkernige vreemd-lichaamsreuscellen, die dan ook duidelijk zichtbaar zijn op het grensvlak tussen biomateriaal en weefsel (Figuur 3B). Deze reuscelvorming rond biomaterialen wordt voornamelijk geïnduceerd door de anti-inflammatoire cytokines IL-4 en/of IL-13,³⁹ en duidt erop dat het lichaam in feite het biomateriaal zo goed mogelijk 'accepteert'. Het vervolg op deze fase is dan ook de vorming van nieuw bindweefsel rond het implantaat, waardoor dit ingekapseld wordt (Figuur 3C). Bij het ontwikkelen van biomaterialen wordt gestreefd naar een zo hoog mogelijke biocompatibiliteit, gedefinieerd als "the ability of a biomaterial to perform with an appropriate host response in a specific application".⁴⁰ In praktijk wordt vaak gestreefd naar het minimaliseren van de pro-inflammatoire fase van de vreemd-lichaamsreactie, en een zo snel mogelijke acceptatie van het ingebrachte vreemde lichaam.

Figuur 3. Enkele fasen van het verloop van de vreemd-lichaamsreactie in weefsel grenzend aan subcutaan geïmplanteerd biomateriaal in muis (hematoxyline-eosinekleuring). A: Infiltratie van voornamelijk PMN's 2-5 dagen na implantatie. B: Vreemd-lichaam-reuscellen op het grensvlak van weefsel met het biomateriaal 14 dagen na implantatie. C: Inkapseling, nieuw gevormd bindweefsel en fibroblasten, 60 dagen na implantatie.



Invloed van bacteriële componenten op het verloop van de vreemd-lichaamsreactie

De biocompatibiliteit van biomaterialen wordt vastgesteld aan de hand van een aantal testen, volgens specifieke richtlijnen van de United States Food and Drug Administration (FDA) en de International Organization for Standardization (ISO 10993).⁴¹ De materialen worden getest op cytotoxiciteit voor humane cellen *in vitro*, en weefselreacties in diermodellen worden histologisch onderzocht. In onderzoek naar nieuwe biomaterialen wordt vaak bepaald in welke mate de materialen *in vitro* de productie van pro-inflammatoire cytokines door monocytair cellen kunnen induceren. In tegenstelling tot bij het testen van de biocompatibiliteit van reeds ontwikkelde biomaterialen, wordt bij dit type onderzoek vaak bacterieel lipopolysaccharide (LPS, endotoxine) toegevoegd, aangezien zonder LPS in de regel geen verschillen meetbaar zijn in de

response op verschillende materialen.⁴²⁻⁴⁴ Niet alleen LPS, maar ook fragmenten van peptidoglycaan (PG) kunnen monocytair cellen, via de Toll-like receptoren (TLR)-2 en TLR-4, en de LPS-receptor CD14,⁴⁵ activeren tot onder andere uitscheiding van pro-inflammatoire cytokines.⁴⁶⁻⁴⁸ Dit geeft al aan dat wanneer micro-organismen rond een biomateriaal aanwezig zijn, de ontstekingsreactie sterk kan afwijken van de vreemd-lichaamsreactie rond het steriele materiaal. Aangezien bij het vaststellen van de biocompatibiliteit in de standaardtesten nooit de reacties in aanwezigheid van bacteriële producten worden geëvalueerd, kunnen ook goedgekeurde materialen een onverwacht heftige inflammatoire respons geven wanneer bacteriën rond het biomateriaal aanwezig zijn.^{49,50}

Biomateriaaltype-afhankelijke modulatie van de vreemd-lichaamsreactie in aanwezigheid van bacteriën, en de relatie hiervan tot infectiegevoeligheid

In de hiervoor genoemde *in-vitro*-onderzoeken aan nieuwe biomaterialen kwam al naar voren, dat in aanwezigheid van bacteriën de modulatie van cytokineresponsen afhankelijk kan zijn van de aard van het biomateriaal. Uit onderzoeken in ons muismodel bleek, dat *in vivo* de vreemd-lichaamsreactie rond verschillende biomaterialen in aanwezigheid van bacteriën of bacteriële componenten als LPS of PG zeer grote verschillen vertoont. Rond steriele segmenten van silicon elastomeer (SE) en SEpvp hydrocephalus-shunts die subcutaan in muizen waren geïmplanteerd, waren histologisch geen significante verschillen waarneembaar^{49,50} hoewel de concentraties van de in het weefsel aanwezige cytokines wel verschilden. Twee en vijf dagen na implantatie waren de weefselspiegels van de pro-inflammatoire cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 en IFN- γ zowel rond SE als SEpvp verhoogd. De IL-1 β -concentratie rond SEpvp was op de tweede dag echter significant hoger dan rond SE.⁵¹ Bij injectie van 10^2 tot 10^4 KVE *S. epidermidis* rond SEpvp ontstonden subcutane abscessen, terwijl dit rond SE pas bij 10^{10} KVE het geval was. Na injectie van hittegedode *S. epidermidis*, LPS of PG (equivalent aan 10^3 KVE of meer), ontstonden uitsluitend rond SEpvp steriele abscessen. Met een inoculum van 10^6 KVE *S. epidermidis* of hoger werd na 14 dagen uit het weefsel rondom SEpvp nog *S. epidermidis* gekweekt, terwijl dit rond SE alleen bij een inoculum van 10^{10} KVE het geval was.⁴⁹ Opmerkelijk genoeg werd van de SEpvp-implantaten zelf na explantatie geen *S. epidermidis* gekweekt, behalve na inoculatie met 10^{10} KVE. Dit betekent dat de bacteriën in het weefsel rond het biomateriaal langer persisteerden dan op het biomateriaal.

In aanwezigheid van *S. epidermidis* werden rond SEpvp hogere IL-1 β -spiegels gemeten dan rond SE, en was de ontwikkeling van de vreemd-lichaamsreactie vertraagd, met een later optredende reuscelvorming en inkapseling.⁵⁰ Deze vertraging van de vreemd-lichaamsreactie en de toename van de persistentie van *S. epidermidis* bleken een directe relatie te hebben met de verhoogde IL-1 β -spiegels, aangezien in muizen met een IL-1 type 1-receptordeficiëntie (IL-1R $^{-/-}$) de vreemd-lichaamsreactie niet vertraagd was, en er geen persistentie van *S. epidermidis* optrad.⁵² SEpvp induceerde dus een verhoogde productie van IL-1 β . In afwezigheid van bacteriën had dit geen merkbare gevolgen. In aanwezigheid van *S. epidermidis* leidde dit tot een zeer sterke pro-inflammatoire respons, een vertraging in de ontwikkeling van de vreemd-lichaamsreactie, en een verhoging van het

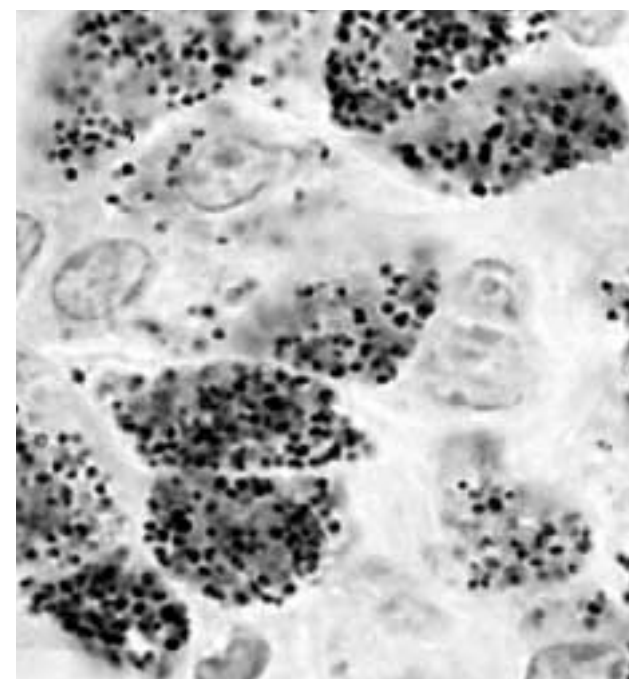
aantal infecties.^{49,50} Rond SEpvp zou vermindering van de pro-inflammatoire respons dus een mogelijkheid kunnen zijn om de gevoeligheid voor infectie te verlagen.

Intracellulaire overleving van *S. epidermidis* in macrofagen rond biomaterialen

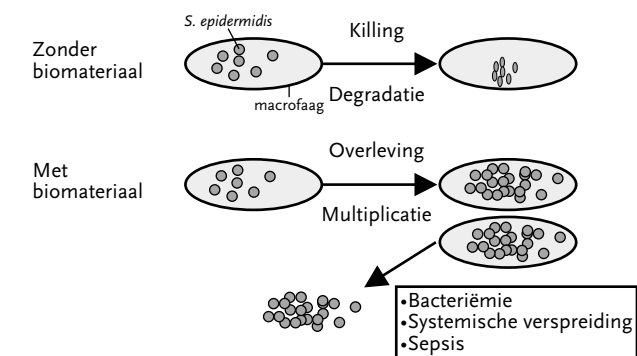
Rond een derde biomateriaal, polyamide gecoat met pvp (PApvp), werden zowel in afwezigheid als in aanwezigheid van *S. epidermidis* cytokineniveaus gemeten die sterk verschilden van de niveaus rond zowel SE als SEpvp. Na implantatie van steriel PApvp trad geen stijging op van de TNF- α , IL-1 β , IL-6 en IFN- γ weefselspiegels. In muizen met PApvp, die met *S. epidermidis* werden geïnjecteerd, werd alleen een stijging van IL-1 β gemeten, en na negen dagen een stijging van IL-10.⁵¹ Deze muizen vertoonden macroscopisch geen tekenen van infectie, maar zowel van het geïmplanteerde PApvp-segment, als uit het weefsel rondom dit segment werden grote aantallen *S. epidermidis* gekweekt. Blijkbaar had PApvp een zodanig ontstekingsremmend effect, dat ook in aanwezigheid van *S. epidermidis* geen adequate pro-inflammatoire respons optrad, waardoor de bacteriën konden persisteren.

Een belangrijke vraag was, wat nu de niche voor de bacteriën bij deze PApvp-gerelateerde infectie vormde. Uit (elektronen-)microscopisch en immunohistochemisch onderzoek bleek dat zeer grote aantallen bacteriën zich in macrofagen in het weefsel rond PApvp bevonden (Figuur 4), en dat het aantal intracellulaire bacteriën ook toenam in de tijd.⁵¹ Blijkbaar leidde in dit muismodel de aanwezigheid van PApvp tot een anti-inflammatoire situatie in het weefsel, waardoor de intracellulaire killing van *S. epidermidis* door macrofagen onderdrukt werd. Uiteindelijk leidde dit in de muizen tot biomateriaal-gerelateerde sepsis (Figuur 5).⁵¹ Ook andere bacteriën die normaal gesproken door macrofagen worden gedood, kunnen, althans *in vitro*, overleven in macrofagen indien anti-inflammatoire cytokines als bijvoorbeeld IL-4 en/of IL-10 worden toegevoegd.^{53,54} De intracellulaire overleving

Figuur 4. Grote aantallen intracellulair overlevende *S. epidermidis* in macrofagen in subcutaan muizenweefsel rond een PApvp-implantaat, 14 dagen na implantatie en injectie van de bacteriën⁵¹ (gramkleuring).



Figuur 5. Schematische weergave van de rol van intracellulaire overleving van *S. epidermidis* in macrofagen in de pathogenese van biomateriaal-gerelateerde infecties.



van *S. epidermidis* rond het biomateriaal kon teniet worden gedaan door gelijktijdig met het injecteren van de bacteriën te beginnen met het lokaal toedienen van IFN- γ .⁵⁵ IFN- γ heeft vele biologische activiteiten, waaronder activering van macrofagen en opregulatie van MHC-klasse II.⁵⁶

Een belangrijk punt van het onderzoek is, om vast te stellen hoe algemeen nu deze biomateriaal-gerelateerde intracellulaire bacteriële overleving is, zowel met betrekking tot het type biomateriaal als tot de aard van het micro-organisme. In ieder geval werden ook rondom SEpvp en SE macrofagen met veel intracellulaire *S. epidermidis* aangetroffen (bij hoge inocula), ondanks het veel meer pro-inflammatoire karakter van de immuunrespons rond deze biomaterialen, met name rond SEpvp.⁵¹ Dat zeer hoge concentraties pro-inflammatoire stimuli met intracellulaire overleving van bacteriën gerelateerd kunnen zijn, werd ook gerapporteerd door Kanangat et al.⁵⁷ Zij constateerden dat *S. aureus*, *P. aeruginosa* en *Acinetobacter* sp. in hoge mate overleefden in monocyten blootgesteld aan zeer hoge concentraties TNF- α , IL-1 β , IL-6 en LPS. Het is daarom ook van groot belang te onderzoeken hoe de intracellulaire overleving, en dus de macrofaag-deactivatie, rond de biomaterialen precies gereguleerd wordt, en welke biomateriaal-karakteristieken en ontstekingsmediatoren hiervoor bepalend zijn. Het voorhanden zijn van transgene muizen met gedefinieerde mutaties in cytokineproductie- en receptorgenen maakt het mogelijk deze regulatie tot in detail te onderzoeken.

Mogelijke rol voor immunomodulators bij preventie en behandeling van biomateriaal-gerelateerde infecties

Het aantal onderzoeken waarin ontstekingsmediatoren zijn toegepast om biomateriaal-gerelateerde infecties te bestrijden of te voorkomen is op dit moment nog beperkt. Henke et al. vonden dat subcutane implantatie van dacron, gebruikt voor vasculaire protheses, in muizen een lokale suppressie van MHC-klasse-II-expressie op monocyten tot gevolg had.⁵⁸ De expressie van MHC II wordt gezien als een maat voor de immunofunctie, en wordt negatief gereguleerd door prostaglandine E₂ (PGE₂). Door de vorming van PGE₂ met indomethacine te onderdrukken, kon de MHC II-expressie van monocyten rond het implantaat worden hersteld, en verminderde ook het aantal bacteriën op het implantaat.⁵⁸

Rozalksa et al. vergeleken de kolonisatie door *S. epidermidis* en *S. aureus* van gehepariniseerd polyethyleen, al dan niet gepreincubeerd met granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF), na peritoneale implantatie bij muizen. De muizen met het GM-CSF-behandelde biomateriaal hadden

lagere aantallen bacteriën in de peritoneale vloeistof, en minder bacteriën gehecht op het biomateriaal.⁵⁹ GM-CSF verlaagde ook de bacteriële proliferatie in biomateriaal-gerelateerde abscessen in een neutropeen muismodel.⁶⁰ Deze onderzoeken, en onze onderzoeken met SEpvp in IL-1 R-/- muizen⁵² en de toediening van IFN- γ rond PAPvp⁵⁵ geven aan, dat immunomodulatie zeker perspectief biedt voor de preventie en behandeling van biomateriaal-gerelateerde infecties.

Ook in recent onderzoek aan de biocompatibiliteit van biomaterialen worden immunomodulatoren toegepast, met name om de pro-inflammatoire respons te verlagen. Met antilichamen tegen IFN- γ kon in ratten de pro-inflammatoire respons tegen subcutaan geïmplanteerd gecross-linked schapencollageen worden verminderd, werd de MHC II-expressie op macrofagen sterk verlaagd, en werd de fagocytose van het biodegradeerbare biomateriaal vertraagd.⁶¹ Infectiegevoeligheid werd in dit onderzoek niet onderzocht, maar gezien de beschreven weefselrespons is het zeer wel mogelijk dat deze door de anti-IFN- γ toeneemt. Zoals reeds vermeld, was rond dacron-implantaten verlaging van de MHC II-expressie juist gerelateerd met verhoogde infectiegevoeligheid⁶², en was rond PAPvp juist suppletie van IFN- γ noodzakelijk om persisterende infectie te voorkomen.⁵⁵ Dit geeft aan dat bij toepassing van immunomodulatoren de effecten zowel op biocompatibiliteit als op de gevoeligheid voor infectie moeten worden bestudeerd, om een optimale combinatie van biocompatibiliteit en infectieresistentie van een biomateriaal te bereiken.

Conclusies

Biomaterialen verhogen de gevoeligheid van weefsel voor infecties, deels doordat er een oppervlak is waaraan micro-organismen kunnen hechten, deels doordat de effectiviteit van de lokale immuunrespons wordt verlaagd. Factoren die bijdragen tot het ontstaan van biomateriaal-gerelateerde infecties staan samengevat in *tabel 1*. Door biomaterialen te voorzien van een antimicrobiële laag lijkt een deel van de infecties voorkomen te kunnen worden. Hiervoor kan het gebruik van systemen voor gecontroleerde afgifte, en nieuwe klassen antimicrobiële middelen zoals thrombocidines een belangrijke rol gaan spelen.

De infectiegevoeligheid rond biomaterialen wordt in grote mate bepaald door de aard van vreemd-lichaamsreactie tegen het biomateriaal, die met name in aanwezigheid van bacteriën sterk kan verschillen bij verschillende materialen. De fysisch-chemische karakteristieken van het biomateriaal zijn blijkbaar bepalend voor de aard van de inflammatoire respons in aanwezigheid van *S. epidermidis*. In onze onderzoeken in muizen varieerde deze respons van zeer sterk pro-inflammatoir rond SEpvp, tot overwegend anti-inflammatoir rond PAPvp. Met name in het laatste geval bleek *S. epidermidis* intracellulair te overleven in macrofagen. Deze intracellulaire overleving in macrofagen kon met IFN- γ teniet worden gedaan. In muizen deficient voor de IL-1-receptor was rond SEpvp de pro-inflammatoire respons zwak, en persisteerden de bacteriën niet. Verlaging van de pro-inflammatoire respons zou rond SEpvp derhalve de infectiegevoeligheid kunnen verlagen. Hoewel het gebruik van immunomodulatoren in het onderzoek van biomaterialen zich nog in een pril stadium bevindt, is de verwachting dat zij een belangrijke rol kunnen spelen bij het voorkomen of het behandelen van biomateriaal-gerelateerde infecties. Hierbij dient een goede balans te

Tabel 1. Factoren die bijdragen tot het ontstaan van biomateriaal-gerelateerde infecties. De bacteriële factoren hebben betrekking op *S. epidermidis*, de meest voorkomende verwekker.

BACTERIEËLE FACTOREN
• Adhesie aan biomateriaal oppervlak: - <i>S. epidermidis</i> polysaccharide adhesin, PS/A - <i>S. epidermidis</i> autolysine, AtlE
• Onderlinge adhesie / biofilmvorming: - <i>S. epidermidis</i> polysaccharide intercellular adhesin, PIA - <i>S. epidermidis</i> extracellulair polysaccharide, "slime"
• Verlaging effectiviteit van PMN's door bacteriële producten als slime
BIOMATERIAALEIGENSCHAPPEN
Fysisch-chemische eigenschappen als textuur, hydrofobiciteit en lading bepalen: • Conformatie van hechting gastheereiwitten. • Hechting van bloedplaatjes. • Hechting van micro-organismen, direct of aan op biomateriaal gebonden gastheereiwitten of bloedplaatjes. • Biocompatibiliteit: aard en ontwikkeling van de vreemd-lichaamsreactie. • Infectiegevoeligheid: biomateriaal-specifieke modulatie van de ontstekingsreactie in aanwezigheid van bacteriën.
GASTHEERFACTOREN
• Verlaagde effectiviteit van PMN's door directe interactie met het biomateriaal. • Verlaagde effectiviteit van PMN's door een combinatie van bacteriële componenten, lokale ontstekingsmediatoren en defensins, uitgescheiden in reactie op de aanwezigheid van het biomateriaal. • Defectieve intracellulaire killing van door macrofagen gefagocyteerde bacteriën, geïnduceerd door aanwezigheid van biomateriaal.

worden gevonden tussen de effecten op biocompatibiliteit en infectieresistentie, en moet er rekening mee worden gehouden dat de aard van het biomateriaal de aard van de inflammatoire respons bepaalt.

Summary

Biomaterial-associated infections, predominantly caused by *Staphylococcus epidermidis* or other coagulase-negative staphylococci, are a major problem in modern health care. Adherence to the biomaterial surface is considered the first step in the pathogenesis of these infections. Therefore, biomaterials with antimicrobial properties are being developed. In our research we are employing thrombocidins, antimicrobial cationic proteins isolated from human blood platelets, in combination with specifically designed polymers, allowing the controlled release of thrombocidins from a biomaterial surface.

The presence of a biomaterial in tissue induces an inflammatory response, the so-called foreign body reaction. Our studies on biomaterial-associated infection in a mouse model revealed that the presence of small numbers of *S. epidermidis* or small amounts of the bacterial components

peptidoglycan or LPS strongly modulated the foreign body response. Moreover, the nature of this modulation was biomaterial-type dependent. Around polyvinylpyrrolidone-grafted silicon elastomer a strong pro-inflammatory reaction was induced, with a.o. strongly increased levels of IL-1 beta for a prolonged period. *S. epidermidis* persisted in the peri-implant tissue. In IL-1 receptor knock-out mice no excessive pro-inflammatory response was induced, and *S. epidermidis* did not persist. In tissue surrounding pvp-coated polyamide implants a more anti-inflammatory response was observed, and large numbers of *S. epidermidis* persisted intracellularly inside macrophages. This intracellular persistence could be prohibited by the macrophage-activating cytokine interferon-

Literatuur

- Mayhall CG (ed). Hospital epidemiology and infection control. 2de editie. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- Seifert H, Jansen B, Farr B (eds). Catheter-related infections. New York: Marcel Dekker Press, 1997.
- Anderson JM, Marchant RE. Biomaterials: factors favoring colonization and infection. In: Waldvogel FA, Bisno AL, eds. Infections associated with indwelling medical devices. 3de edition. Washington, D.C.: ASM Press, 2000: 89-109.
- Waldvogel FA, Bisno AL, eds. Infections associated with indwelling medical devices. 3de edition. Washington, D.C.: ASM Press, 2000.
- Henderson DK. Infections due to percutaneous intravascular devices. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin RD, eds. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000: 3005-20.
- Mermel LA. Preventive strategies for intravascular catheter-related infections. In: Waldvogel FA, Bisno AL, eds. Infections associated with indwelling medical devices. 3de editie. Washington, D.C.: ASM Press, 2000: 407-25.
- Elek SD, Conen PE. The virulence of *Staphylococcus pyogenes* for man. A study of the problems of wound infection. Br J Exp Pathol 1957;38:573.
- James RC, MacLeod CM. Induction of staphylococcal infections in mice with small inocula introduced on sutures. Br J Exp Pathol 1961;42:266-77.
- Noble WC. Production of subcutaneous staphylococcal skin lesions in mice. Br J Exp Pathol 1965;46:254-62.
- Zimmerli W, Lew PD, Waldvogel FA. Pathogenesis of foreign body infection. Evidence for a local granulocyte defect. J Clin Invest 1984;73:1191-200.
- Peters G, Locci R, Pulverer G. Microbial colonization of prosthetic devices. II. Scanning electron microscopy of naturally infected intravenous catheters. Zentralbl Bakteriologie Mikrobiol Hyg [B] 1981;173:293-9.
- Götz F, Peters G. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: Waldvogel FA, Peters G, eds. Infections associated with indwelling medical devices. 3de edition. Washington, D.C.: ASM Press, 2000: 55-88.
- Brokke P, Dankert J, Carball J, Feijen J. Adherence of coagulase-negative staphylococci onto polyethylene catheters in vitro and in vivo: a study on the influence of various plasma proteins. J Biomat Appl 1991;5:204-26.
- Chugh TD, Burns GJ, Shuhaiber HJ, Bahr GM. Adherence of *Staphylococcus epidermidis* to fibrin-platelet clots in vitro mediated by lipoteichoic acid. Infect Immun 1990;58:315-9.
- Herrmann M, Lai QJ, Albrecht RM, Mosher DF, Proctor RA. Adhesion of *Staphylococcus aureus* to surface-bound platelets: role of fibrinogen/fibrin and platelet integrins. J Infect Dis 1993;167:312-22.
- Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. Infect Immun 1982;37:318-26.
- Christensen GD, Baldassarri L, Simpson WA. Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci. In: Bisno AL, Waldvogel FA, eds. Infections associated with indwelling medical devices. 2nd edition. Washington, D.C.: ASM Press, 1994: 45-78.
- Heinzlmann M, Herzog DO, Swain B, Mercer-Jones MA, Bergamini TM, Polk HC Jr. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. Clin Diagn Lab Immunol 1997;4:705-10.
- Shiau AL, Wu CL. The inhibitory effect of *Staphylococcus epidermidis* slime on the phagocytosis of murine peritoneal macrophages is interferon-independent. Microbiol Immunol 1998;42:33-40.
- Dankert J, Hogt AH, Feijen J. Biomedical polymers: Bacterial adhesion, colonization and infection. CRC Crit Rev Biocomp 1986;2:219-301.
- Hogt AH, Dankert J, Feijen J. Adhesion of coagulase-negative staphylococci onto methacrylate polymers and copolymers. J Biomed Mater Res 1985;20:533-45.
- Hogt AH, Dankert J, Hulstaert CE, Feijen J. Cell surface characteristics of coagulase-negative staphylococci and their adherence to fluorinated poly(ethylene-propylene). Infect Immun 1986;51:294-301.
- Kohnen W, Jansen B. Polymer materials for the prevention of catheter-related infections. Zentralbl Bakteriologie 1995;283:175-86.
- Veenstra DL, Saint S, Saha S, Lumley T, Sullivan SD. Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheters in preventing catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. JAMA 1999;281:261-7.
- Darouiche RO, Raad I, Heard SO, et al. A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters. Catheter Study Group. N Engl J Med 1999;340:1-8.
- Liu WK, Tebbs SE, Byrne PO, Elliott TS. The effects of electric current on bacteria colonising intravenous catheters. J Infect 1993;27:261-9.
- Raad I, Darouiche R, Hachem R, Mansouri M, Bodey GP. The broad-spectrum activity and efficacy of catheters coated with minocycline and rifampin. J Infect Dis 1996;173:418-24.
- Krijgsveld J, Zaat SAJ, Van Veelen PA, et al. Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC-chemokines. J Biol Chem 2000;275:20374-81.
- Kuijpers AJ, van Wachem PB, Van Luyn MJA, et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of gelatin-chondroitin sulphate hydrogels for controlled release of antibacterial proteins. Biomat 2000;21:1763-72.
- Kuijpers AJ, Engbers GHM, Meyvis TKL, et al. Combined gelatin-chondroitin sulphate hydrogels for controlled release of cationic antibacterial proteins. Macromol 2000;33:3705-13.
- Kuijpers AJ, van Wachem PB, Van Luyn MJA, et al. *In vivo* and *in vitro* lysozyme release from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. J Control Rel 2000;67:323-36.
- Boelens JJ, Tan WF, Dankert J, Zaat SAJ. Antibacterial activity of antibiotic-soaked polyvinylpyrrolidone-grafted silicon elastomer hydrocephalus shunts. J Antimicrob Chemother 2000;45:221-4.
- Boelens JJ, Zaat SAJ, Meeldijk J, Dankert J. In vitro adherence of *Staphylococcus epidermidis* to polyvinylpyrrolidone-grafted and conventional silicon elastomer catheters is not predictive for colonization in a mouse model of catheter-associated infection. North Sea Biomaterials Conference, Abstract 12. 1998. The Hague.
- Zimmerli W, Waldvogel FA, Vaudaux P, Nydegger HE. Pathogenesis of foreign body infection: description and characteristics of an animal model. J Infect Dis 1982;146:487.
- Vaudaux P, Francois P, Lew DP, Waldvogel FA. Host factors predisposing to and influencing therapy of foreign body infections. In: Waldvogel FA, Bisno AL, eds. Infections associated with indwelling medical devices. 3de editie. Washington, D.C.: ASM Press, 2000: 1-26.
- Kaplan SS, Basford RE, Mora E, Jeong MH, Simmons RL. Biomaterial-induced alterations of neutrophil superoxide production. J Biomed Mater Res 1992;26:1039-51.
- Kaplan SS, Heine RP, Simmons RL. Defensins impair phagocytic killing by neutrophils in biomaterial-related infection. Infect Immun 1999;67:1640-5.
- Anderson JM. Inflammatory response to implants. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1988;34:101-7.
- Anderson JM. Multinucleated giant cells. Curr Opin Hematol 2000;7:40-7.
- Williams DF. The Williams Dictionary of Biomaterials. Liverpool: Liverpool University Press, 1999.
- Kirkpatrick CJ, Bittering F, Wagner M, Kohler H, Van Kooten TGKCL, Otto M. Current trends in biocompatibility testing. Proc Institute Mechanical Engineers Part H - J Engineer Med 1998;212:75-84.
- Bonfield TL, Colton E, Marchant RE, Anderson JM. Cytokine and growth factor production by monocytes/macrophages on protein preadsorbed polymers. J Biomed Mater Res 1992;26:837-50.
- Cardona MA, Simmons RL, Kaplan SS. TNF and IL-1 generation by human monocytes in response to biomaterials. J Biomed Mater Res 1992;26:851-9.
- Daniels AU, Barnes FH, Charlebois SJ, Smith RA. Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro. J Biomed Mater Res 2000;49:469-78.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. J Immunol 1999;163:1-5.

Infectieuze complicaties van continue peritoneale dialyse

C.W.H. DE FIJTER, H.A. VERBRUGH

Continue peritoneale dialyse wordt in toenemende mate toegepast als nierfunctievervangende behandeling. De kans op infectieuze complicaties als peritonitis en huidpoortinfecties is te beschouwen als de Achilleshiel van deze therapie. In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de incidentie, etiologie, risicofactoren, diagnostiek, behandeling, uitkomst en preventie van deze complicaties.

Trefwoorden: huidpoortinfectie, peritoneale dialyse, peritonitis, tunnelinfectie

Introductie

Continue peritoneale dialyse (CPD) wordt in toenemende mate toegepast als nierfunctievervangende therapie. In Nederland wordt circa 35 procent van de patiënten met terminale nierinsufficiëntie behandeld met een vorm van CPD.¹ Bij CPD wordt gebruik gemaakt van het peritoneum als dialyse-membraan. Via een intraperitoneaal geplaatste katheter wordt dialysevloeistof in de buikholte gebracht. Aldus kan een uitwisseling van stoffen plaatsvinden tussen de bloedbaan en de dialysevloeistof. Om vocht aan het lichaam te kunnen onttrekken bevat de dialysevloeistof een osmotisch agens (gewoonlijk glucose). De meest bekende vorm van CPD is continue ambulante peritoneale dialyse (CAPD), waarbij de wisselingen van dialysevloeistof vier tot zes keer per dag door de patiënt manueel worden verricht. Hiernaast staan verschillende vormen van geautomatiseerde CPD ter beschikking, waarbij de wisselingen van dialysevloeistof plaatsvinden met behulp van een dialyseapparaat ("cyclor"), zoals bijvoorbeeld continue cyclische peritoneale dialyse (CCPD).

In de afgelopen jaren zijn de systemen en vloeistoffen significant verbeterd, desalniettemin vormen infectieuze complicaties als peritonitis en huidpoortinfecties een belangrijk probleem bij CPD.

Peritonitis

Peritonitis wordt gedefinieerd als de aanwezigheid van twee van de volgende drie criteria:²

1. aanwezigheid van micro-organismen in Gram-preparaat of kweek van de dialysevloeistof;
2. troebele vloeistof (>100 leukocyten/mm³ met voornamelijk (>50 procent) polymorfonucleaire cellen);
3. tekenen van peritoneale inflammatie.

Gewoonlijk wordt CPD-gerelateerde peritonitis in een vroege fase gediagnosticeerd, aangezien de patiënt zichtbare veranderingen van het dialysaat of buikpijn bemerkt. De symptomen waarmee een peritonitis zich openbaart kunnen variëren van mild (troebele vloeistof zonder klinische symptomen) tot ernstig (extreme buikpijn, koorts). De presentatie is enigszins gerelateerd aan de verwekker en de etiologie van de peritonitisepisode.

Peritonitis is nog steeds de belangrijkste oorzaak van morbiditeit en falen van de CPD-techniek met overschakeling op hemodialyse als gevolg.³ In de beginjaren van CAPD was een incidentie van vijf tot zes peritonitisepisoden per

patiëntenjaar geen uitzondering^{4,5}, inmiddels bedraagt deze ongeveer 0,5 episoden per patiëntenjaar.³ Het feit dat elk dialysecentrum ook patiënten heeft met frequente episoden van peritonitis komt uiteraard in zo'n gemiddelde incidentie niet naar voren.

Van veel peritonitisepisoden is de oorzaak voor de ontwikkeling van de infectie niet bekend.⁶ De herhaalde introductie van dialysevloeistof in de peritoneale holte houdt telkens weer een contaminatierisico en dus de kans op peritonitis in. Bovendien verandert CPD de normale defensiemechanismen van het peritoneum. De functie van mesothelcellen en macrofagen wordt significant beïnvloed door de lage pH, hyperosmolariteit en de hoge glucose(afbraakproducten)- en lactaatconcentraties van het dialysaat.⁷ Humorele en cellulaire factoren van belang voor de normale regeneratie van het peritoneum worden door de dialysevloeistof verdund en uitgewassen. Voor een overzicht van het belang van deze afweermechanismen wordt verwezen naar genoemde referenties.⁷⁻⁹

Etiologie

De meest voorkomende veroorzakers van CPD-gerelateerde peritonitis (Tabel 1) zijn Gram-positief. Schimmelinfecties (voornamelijk *Candida*-species) komen weinig frequent voor, maar zijn moeilijk te behandelen en hebben in het algemeen ernstige gevolgen. Bij polymicrobiële infecties met ten minste een Gram-negatief micro-organisme of anaëroben moet darmperforatie uitgesloten worden.

Aangezien de veroorzakende micro-organismen meestal deel uitmaken van de Gram-positieve huidflora van patiënten, lijkt externe contaminatie – hetzij langs, hetzij via de katheter – de meest frequente oorzaak. Penetratie van bacteriën langs het buitenoppervlak van de katheter is waarschijnlijk wanneer peritonitisepisoden voorafgegaan worden door een huidpoort- of tunnelinfectie. Een relatie met huidpoort- of tunnelinfecties wordt in 10 tot 25 procent van de peritonitisepisoden beschreven.³ Contaminatie van dialysevloeistof met bacteriën tijdens de wisselprocedure is waarschijnlijk de meest voorkomende oorzaak van peritonitis. Verschillende technische hulpmiddelen ter voorkoming van contaminatie tijdens de wisseling van dialysevloeistof zijn effectief gebleken bij de reductie van de incidentie van peritonitis, met name de Y-set (Figuur 1) en CCPD met de 'flush before fill'-techniek.¹¹⁻¹⁵ Zowel bij CAPD met Y-set als bij CCPD vindt na het maken van de verbinding tussen dialyseset en katheter eerst een

46. Rietschel ET, Schletter J, Weidemann B, et al. Lipopolysaccharide and peptidoglycan: CD14-dependent bacterial inducers of inflammation. *Microb Drug Resist* 1998;4:37-44.

47. Majcherczyk PA, Langen H, Heumann D, Fountoulakis M, Glauser MP, Moreillon P. Digestion of *Streptococcus pneumoniae* cell walls with its major peptidoglycan hydrolase releases branched stem peptides carrying proinflammatory activity. *J Biol Chem* 1999;274:12537-43.

48. Timmerman CP, Mattsson E, Martinez-Martinez L, et al. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. *Infect Immun* 1993;61:4167-72.

49. Boelens JJ, Zaat SAJ, Meeldijk J, Dankert J. Subcutaneous abscess formation around catheters induced by viable and nonviable *Staphylococcus epidermidis* as well as by small amounts of bacterial cell wall components. *J Biomed Mater Res* 2000;50:546-56.

50. Boelens JJ, Zaat SAJ, Murk JL, Weening JJ, Van der Poll T, Dankert J. Enhanced susceptibility to subcutaneous abscess formation and persistent infection around catheters is associated with sustained interleukin-1 beta levels. *Infect Immun* 2000;68:1692-5.

51. Boelens JJ, Dankert J, Murk JLAN, et al. Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J Infect Dis* 2000;181:1337-49.

52. Boelens JJ, Van der Poll T, Zaat SAJ, Murk JL, Weening JJ, Dankert J. Interleukin-1 Receptor Type I Gene-Deficient Mice Are Less Susceptible to *Staphylococcus epidermidis* Biomaterial-Associated Infection than Are Wild-Type Mice. *Infect Immun* 2000;68:6924-31.

53. Schoedon G, Goldenberger D, Forrer R, Gunz A, Dutly F, Hochli M, Altwegg M, Schaffner A. Deactivation of macrophages with interleukin-4 is the key to the isolation of *Tropheryma whippelii*. *J Infect Dis* 1997;176:672-7.

54. Nakane A, Nishikawa S, Sasaki S, et al. Endogenous interleukin-4, but not interleukin-10, is involved in suppression of host resistance against *Listeria monocytogenes* infection in interferon-depleted mice. *Infect Immun* 1996;64:1252-8.

55. Boelens JJ, Van der Poll T, Dankert J, Zaat SAJ. Interferon-gamma protects against biomaterial-associated infection in mice. *J Infect Dis* 2000;181:1167-71.

56. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Ann Rev Immunol* 1997;15:749-95.

57. Kanangat S, Meduri GU, Tolley EA, Patterson DR, Meduri, CU, Pak C, Griffin JP, Bronze MS, Schaberg DR. Effects of cytokines and endotoxin on the intracellular growth of bacteria. *Infect Immun* 1999;67:2834-40.

58. Henke PK, Bergamini TM, Brittan KR, Polk HC, Jr. Prostaglandin E2 modulates monocyte MHC-II (Ia) suppression in biomaterial infection. *J Surg Res* 1997;69:372-8.

59. Rozalska B, Ljungh A, Paziak-Domanska B, Rudnicka W. Effects of granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) on biomaterial-associated staphylococcal infection in mice. *Microbiol Immunol* 1996;40:931-9.

60. Rozalska B, Sadowska B, Ljungh A, Rudnicka W. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-coated implants and their potential for reducing biomaterial-associated infection in neutropenic hosts. *Zentralbl Bakteriol* 1998;288:237-51.

61. Khouw IM, van Wachem PB, de Leij LF, van Luyn MJ. Inhibition of the tissue reaction to a biodegradable biomaterial by monoclonal antibodies to IFN-gamma. *J Biomed Mater Res* 1998;41:202-10.

62. Henke PK, Bergamini TM, Garrison JR, Brittan KR, Peyton JC, Lam TM. *Staphylococcus epidermidis* graft infection is associated with locally suppressed major histocompatibility complex class II and elevated MAC-1 expression. *Arch Surg* 1997;132:894-902.

63. Fleer A. Biologie van hechting van bacteriën aan biomaterialen. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2001;3:70-5.

Tabel 1. Distributie micro-organismen bij CPD-gerelateerde peritonitisepisoden¹⁰

SOORT MICRO-ORGANISME	GEMIDDELD PERCENTAGE (BEREIK) VAN TOTAAL AANTAL ISOLATEN (1.661 EPISODEN)
Gram-positief	74 (46-84)
Coagulasenegatieve stafylokokken	46 (19-56)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14 (5-21)
<i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> spp.	10 (1-20)
<i>Corynebacterium</i> spp.	3 (0-7)
Overig ^a	1 (0-5)
Gram-negatief	23 (14-36)
Enterobacteriaceae ^b	14 (7-25)
Glucose-nonfermenting ^c	13 (5-26)
Anaërobe micro-organismen	<1 (0-1)
Fungi (vnl. <i>Candida</i> spp.)	2 (0-9)
Overigen ^d	1 (0-11)
Gemengde infecties	<1 (0-5)

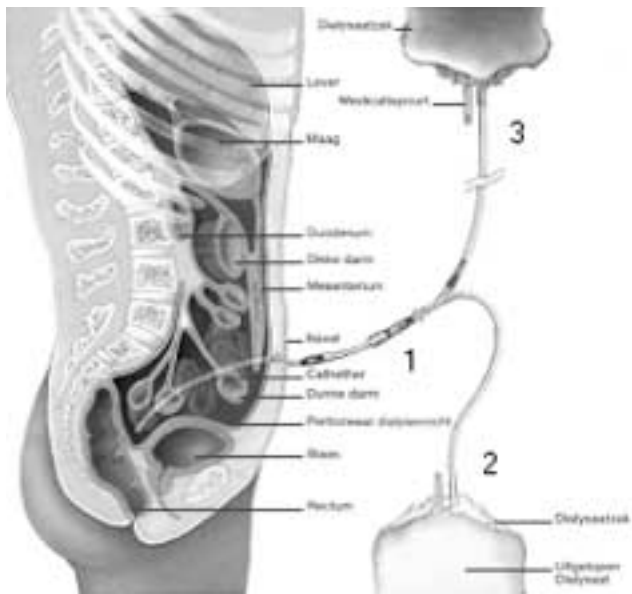
^a voornamelijk *Bacillus* spp.

^b met name *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* en *Serratia* spp.

^c vooral *Acinetobacter* en *Pseudomonas* spp.

^d *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pasteurella*, *Agrobacterium*, *Chlamydia*, *Flavobacterium* spp., mycobacteriën en niet-geïdentificeerde micro-organismen.

Figuur 1. Illustratie van CAPD met Y-set. Na het maken van de verbinding tussen dialysetest en katheter (1) vindt eerst een uitloop van dialysevloeistof plaats (via 1 → 2), en wordt het systeem gespoeld met steriel dialysaat (3 → 2) alvorens dialysevloeistof inloopt van 3 → 1 ("flush before fill").



uitloop van dialysevloeistof plaats, en wordt het systeem gespoeld met steriel dialysaat alvorens dialysevloeistof inloopt ('flush before fill'). Ook Gram-negatieven kunnen de huid koloniseren en via deze weg tot peritonitis leiden. Migratie van bacteriën door de darmwand is een andere potentiële route van contaminatie bij peritonitisepisoden veroorzaakt door Enterobacteriaceae. Indien er sprake is van multipale aërobe Gram-negatieve micro-organismen of anaëroben moet een perforatie uitgesloten te worden.

Bacteriëmie is een zeldzame oorzaak van peritonitis³, maar hematogene verspreiding moet worden overwogen bij peritonitisepisoden ten gevolge van streptokokken en *Mycobacterium tuberculosis*.^{2,16} Sporadisch worden gynaecologische infecties gezien leidend tot een peritonitis met vaginale flora.³

Risicofactoren

De incidentie van CPD-gerelateerde peritonitis bij kinderen is beduidend hoger dan bij volwassenen.³ Voorts zijn een lagere socio-economische status, immunosuppressie, HIV-positiviteit en *S. aureus*-dragerschap als risicofactoren naar voren gekomen.³

S. aureus-dragerschap verhoogt de kans op zowel huidpoortinfecties als peritonitis. Door cyclische toepassing van mupirocine intranasaal of rifampicine per os is de incidentie van *S. aureus*-infecties flink afgenomen.^{17,18}

In een prospectief onderzoek bij CAPD-patiënten vonden Wu et al. een hogere incidentie van fecale peritonitis bij patiënten met diverticulose dan bij patiënten zonder diverticulose.¹⁹ Radiologisch onderzoek bij CAPD-patiënten door Tranaeus et al. daarentegen identificeerde noch diverticulose van het sigmoid, noch diverticulitis als risicofactor. Diverticulair lijden van het colon (exclusief het sigmoid) was wel geassocieerd met peritonitis van enterale origine.²⁰

Diagnostiek

Optimale therapie van CPD-gerelateerde peritonitis vereist adequate diagnostiek. De incidentie van peritonitisepisoden waarbij de kweek geen micro-organismen oplevert varieert van 0 tot 40 procent, afhankelijk van de gebruikte kweektechniek.^{2,13,16,21} In een vergelijkende studie vonden Luce et al. een negatief kweekresultaat in vier procent bij gebruik van Bactec[®]-flesjes en in 22 procent bij gebruik van standaardkweekplaten.²²

Slechts zelden is de oorzaak van een negatief kweekresultaat het peritoneale eosinofiele syndroom, dat sporadisch in de beginperiode van de CPD-behandeling optreedt en wordt toegeschreven aan een reactie op katheter- of dialysemateriaal.²³ Een optimaal kweekresultaat vereist aseptische bemonstering van grote volumina (50-200 ml), concentratie van het dialysaat door centrifugering of filtratie en kweken onder zowel aërobe als anaërobe omstandigheden.¹⁶ Lyseren van de leukocyten²⁴ kan de kweekopbrengst nog verder verbeteren. Het belang van het Gram-preparaat is vooral gelegen in de vroege diagnostiek van fungale peritonitiden.^{3,16} Het antibiotisch beleid dient derhalve niet alleen op de uitslag van het Gram-preparaat te worden gebaseerd.³

Behandeling

Veel vragen betreffende de optimale behandeling van CPD-gerelateerde peritonitis zijn nog onbeantwoord. Gezien de distributie van de veroorzakende micro-organismen dienen zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën te worden gedekt. Er worden verschillende empirische regimes toegepast; intraperitoneale toediening van antibiotica heeft in het algemeen de voorkeur qua effectiviteit en de realisatie van hoge lokale spiegels.²⁵ Millikin et al. beschreven in een overzichtsartikel de gepubliceerde onderzoeken naar toegepaste therapeutische regimes bij de behandeling van CPD-gerelateerde peritonitis.²⁶ Het hoogste genezingspercentage werd gerapporteerd bij toepassing van de combinatie van vancomycine met ceftazidime of een aminoglycoside als

initiële antibiotica. Gebaseerd op deze gegevens adviseerde de ad-hoc-adviescommissie van de International Society for Peritoneal Dialysis (ISPD) de combinatie vancomycine met ceftazidime of vancomycine met aminoglycoside als eerstelijnsbehandeling.²⁷ Een nadeel van veelvuldig gebruik van vancomycine is echter de ontwikkeling van resistentie. Vancomycineresistente enterokokken (VRE) vormen in de VS inmiddels een ernstig probleem²⁸, ook episoden van CPD-gerelateerde peritonitis met VRE zijn beschreven.²⁹ VRE zijn vooralsnog zeldzaam in Europese landen.³⁰ De ontwikkeling van resistentie was dan ook het belangrijkste motief voor de revisie van de therapierichtlijnen van de ISPD in 1996, waarin het gebruik van vancomycine werd ontmoedigd en een combinatie van een eerste-generatie cefalosporine met een aminoglycoside werd aanbevolen als empirische therapie.¹⁶ Bij het gebruik van aminoglycosiden voor de behandeling van CPD-peritonitis dient echter de potentiële otovestibulaire toxiciteit³¹ en afname van de resterende nierfunctie³² overwogen te worden. Dosering van aminoglycosiden dient tenminste op geleide van spiegels te gebeuren. In de nieuwste richtlijnen van de ISPD³³ wordt een combinatie van een cefalosporine met ceftazidime als initiële therapie van CPD-peritonitis geadviseerd. De adviezen van de ad-hoc-commissie van de ISPD worden ook in de VS niet universeel gevolgd, voornamelijk ten gevolge van de afwezigheid van grote prospectieve onderzoeken.³⁴ Bovendien zullen locale verschillen in epidemiologie van de veroorzakende micro-organismen en het bijbehorende resistentiepatroon beperkingen opleggen aan het volgen van algemene richtlijnen. Voor een overzicht van doseringen van (intra-peritoneaal toegepaste) antibiotica wordt verwezen naar de recentste richtlijnen van de ISPD.³³ Zodra de kweekuitslag bekend is dient het beleid op geleide van de resistentie aangepast te worden. Gewoonlijk is er een klinische respons binnen drie tot vijf dagen, waarbij de peritoneale leukocytose verdwijnt. Bij een goede klinische respons wordt geadviseerd de antibiotische therapie gedurende één week te continueren nadat een heldere uitloop (leukocyten minder dan 100 per mm³) en een negatieve kweek van het dialysaat is verkregen. In het algemeen zal dus een behandeling gedurende 10 tot 14 dagen volstaan. Indien sprake is van een peritonitis ten gevolge van *S. aureus* of Gram-negatieven (met name *Pseudomonas/Stenotrophomonas*) wordt een behandeling van ten minste 21 dagen geadviseerd en bij een goed op medicatie reagerende episode ten gevolge van *Candida* spp. een behandeling van ten minste vier weken.³³ Wanneer een respons uitblijft is her-evaluatie van belang. Katheterverwijdering is geïndiceerd indien klinische symptomen verergeren of kweken positief blijven ondanks adequate antibiotische therapie, met name bij peritonitisepisoden ten gevolge van *S. aureus* en Gram-negatieven komt dit voor. Bij recidiverende peritonitis, subcutane tunnelinfectie, intra-abdominale pathologie en schimmelinfecties zal vaak ook verwijdering van de katheter nodig zijn. Soms is een recidiverende peritonitis secundair aan in biofilm gevatte bacteriën. Intra-peritoneale toediening van urokinase kan zinvol zijn bij geselecteerde CPD-patiënten met recidiverende peritonitisepisoden, waarbij geen andere oorzaak evident is en waarbij de kweek hetzij steriel blijft, hetzij dezelfde coagulasenegatieve stafylokokken oplevert als in de voorafgaande episode(n).³⁵ Zoals bekend bevinden bacteriën in een katheter-gerelateerde infectie zich vaak in een stationaire fase, waarbij het toedienen van rifampicine in combi-

natie met één of twee andere middelen zinvol kan zijn. Circa 60 tot 90 procent van de peritonitisepisoden reageert adequaat op antibiotische therapie, abscessvorming treedt in minder dan één procent van de gevallen op.³

Mortaliteit

De mortaliteit van CPD-peritonitis varieert van één tot zes procent (voornamelijk Gram-negatieve en schimmelinfecties)³, waarbij opgemerkt zij dat de doodsoorzaak niet steeds de infectie zelf is, maar ook gelegen kan zijn in een complicatie die optreedt gedurende de peritonitisepisode. Peritonitis als gevolg van een gastrointestinale perforatie is berucht om de hoge mortaliteit (ca. 50 procent^{36,37}), terwijl de mortaliteit ten gevolge van peritonitis door coagulasenegatieve stafylokokken minder dan één procent bedraagt.³

Preventie

Peritonitis kan als de Achilleshiel van CPD beschouwd worden en daarom is preventie van peritonitis nog steeds een van de belangrijkste onderzoekslijnen in de CPD. Verbetering in de techniek en in patiëntentraining resulteerde in een significante afname van de peritonitisincidentie tot 0,5 episoden per patiëntjaar.³ De ontwikkeling van de Y-connectorset en van CCPD heeft hierin een belangrijke rol gespeeld.^{11,13,15} Momenteel wordt een variant op de Y-set, de zogenaamde Twinbag (hierbij zijn de zakken reeds aan het systeem verbonden), het meest toegepast en dit heeft de peritonitisincidentie nog verder doen afnemen.³⁸ In ons centrum wordt een neuskweek (*S. aureus* dragerschap) verricht in de 48-72 uur voor katheterimplantatie en indien zich een huidpoortinfectie of peritonitisepisode met *S. aureus* voordoet. Bij dragerschap wordt gestart met cyclische toepassing van mupirocine intranasaal (vijf dagen per maand). Profylactische toediening van een eerstegeneratiecefalosporine één uur voor de katheterimplantatie is zinvol gebleken ter vermindering van het infectierisico.³³

Huidpoort- en tunnelinfecties

Met de significante afname van de incidentie van peritonitis zijn huidpoort- en tunnelinfecties relatief belangrijker geworden in de afgelopen jaren. Gebaseerd op langdurige ervaring ontwikkelde Twardowski een classificeringssysteem³⁹ dat hopelijk een eind maakt aan de variabel toegepaste definities van een huidpoortinfectie (van ongespecificeerde klinische tekenen van infectie met een positieve kweek tot een beschrijving van uitgesproken roodheid van de huidpoort met pijn, induratie, uitvloed of granulatieweefsel).⁴⁰ Ongeveer zes weken na de katheterimplantatie is de huidpoort genezen en gewoonlijk droog. Een geringe korstvorming rond de katheter is in het algemeen geen teken van infectie. Een positieve kweek van een huidpoort zonder tekenen van ontsteking wijst op kolonisatie en is evenmin een ontsteking. Er is sprake van een tunnelinfectie bij roodheid, oedeem of pijn van het subcutane kathetertraject.⁴⁰ Meestal is er purulente uitvloed bij de huidpoort zichtbaar (te maken door voorzichtige massage van het traject). Soms is aanvullend echo-onderzoek van diagnostische waarde.⁴¹ Indien de diepgelegen kathetermanchet bij de infectie betrokken is, is verwijdering van de katheter over het algemeen onvermijdelijk. De meeste huidpoortinfecties worden veroorzaakt door *S. aureus*.^{39,40,42} Huidpoortinfecties veroorzaakt door *Pseudomonas*-species zijn berucht en resulteren nogal eens in verlies van de katheter.³³

Behandeling

Behandeling van huidpoortinfecties bestaat gewoonlijk uit antibiotica per os (penicillinase-resistente penicillinen of eerste-generatie-cefalosporinen).¹⁶ Bij Gram-negatieve infecties wordt ciprofloxacine gebruikt, waaraan in geval van *Pseudomonas*-infecties bijvoorbeeld ceftazidime wordt toegevoegd.

Preventie

Naast een optimale katheterimplantatietechniek is een belangrijke preventieve rol weggelegd voor de verzorging van de huidpoort met een adequate immobilisatie van de katheter in de huidpoort.⁴³ Bij *S. aureus*-dragerschap heeft intranasale toepassing van mupirocinezalf zijn nut bewezen.¹⁶

Conclusie

Ondanks technische verbeteringen in de afgelopen jaren blijven peritonitis en huidpoortinfecties de belangrijkste complicaties van CPD. Continu epidemiologisch onderzoek door de afdeling nefrologie in samenwerking met de afdeling microbiologie naar de (locale) incidentie van deze infecties is van essentieel belang om de resultaten van infectiebestrijding

en -behandeling te optimaliseren. Daarnaast is het van belang om het antibiotica-resistentiespectrum in de lokale populatie in kaart te brengen en te vervolgen om zo tot een centrumspecifiek behandelingsprotocol te komen.

Summary

Continuous peritoneal dialysis is increasingly being applied as renal replacement therapy.

The chance for infectious complications as peritonitis and exit-site or tunnel infections can still be considered the Achilles heel of this therapy. The present article reviews the incidence, aetiology, risk factors, diagnostics, treatment, outcome and prevention of these infectious complications.

Mw. dr. C.W.H. de Fijter, internist-nefroloog, Onze Lieve Vrouwe Gasthuis, Afd. Interne Geneeskunde / Nefrologie, Postbus 9550, 1091 HA Amsterdam

Prof. dr. H.A. Verbrugh, arts-microbioloog, Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam, Dr Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam

Literatuur

- De Stichting Registratie Nierfunctievervangende Nederland. De ontwikkeling van het nierfunctievervangingsprogramma in Nederland 1983-1996. Renine, Rotterdam, 1998.
- Vas SI. Peritonitis. In: Nolph KD, ed. Peritoneal Dialysis. Dordrecht: Kluwer, 1989, pp 261-288.
- Fried L, Piraino B. Peritonitis. In: Textbook of Peritoneal Dialysis. 2nd edition. Gokal R, Khanna R, Krediet R, Nolph K (eds), Kluwer Academic Publishers, pp 545-564.
- Popovich RP, Moncrief JW, Nolph KD, et al. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann Intern Med 1978;88:449-56.
- Rubin J, Rogers WA, Taylor HM, et al. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann Intern Med 1980;92:7-13.
- Tranaeus A, Heimbürger O, Lindholm B. Peritonitis during continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD): risk factors, clinical severity, and pathogenetic aspects. Perit Dial Int 1988;8:253-63.
- De Fijter CWH, Verbrugh HA. Immunological response to different peritoneal dialysis solutions and schedules. In: LaGreca G, Ronco C, Feriani M, et al. (eds). Peritoneal Dialysis. Wichtig Editore, Milano, 1991, pp 179-184.
- Lewis S, Holmes C. Host defense mechanisms in the peritoneal cavity of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. First of two parts. Perit Dial Int 1991;11:14-21.
- Holmes C, Lewis S. Host defense mechanisms in the peritoneal cavity of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. Second of two parts. Perit Dial Int 1991;11:112-7.
- Verbrugh HA. Infections associated with chronic peritoneal dialysis. In: Seifert H, Jansen B, Farr BM (eds). Katheter-related infections. Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, pp 353-369.
- Maiorca R, Cantaluppi A, Cancarini GC, et al. Prospective controlled trial of a Y-connector and disinfectant to prevent peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Lancet 1983;2:642-4.
- Bernardini J, Holley JL, Johnston JR, et al. Analysis in ten year trends in infections in adults on continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Nephrol 1991;36:29-34.
- Port FK, Held PJ, Nolph KD, et al. Risk of peritonitis and technique failure by CAPD connection technique: a national study. Kidney Int 1992;42:967-74.
- Canadian CAPD Clinical Trials Group. Peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis: a multicenter randomised clinical trial comparing the Y connector disinfectant system to standard systems. Perit Dial Int 1989;9:159-63.
- De Fijter CWH, Oe PL, Nauta JJP, et al. Clinical efficacy and morbidity associated with continuous cyclic compared with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Ann Intern Med 1994;120:264-71.
- Keane WF, Alexander SR, Bailie GR, et al. Peritoneal dialysis-related peritonitis treatment recommendations: 1996 update. Perit Dial Int 1996;16:557-73.
- Zimmerman SW, Ahrens E, Johnson CA, et al. Randomized controlled trial of prophylactic rifampin for peritoneal dialysis-related infections. Am J Kidney Dis 1991;18:225-31.
- Bernardini J, Piraino B, Holley J, Johnston JR, Lutes R. A randomised trial of Staphylococcus aureus prophylaxis in peritoneal dialysis patients: mupirocin calcium ointment 2 percent applied to the exit site versus cyclic oral rifampin. Am J Kidney Dis 1996;27:695-700.
- Wu G, Khanna R, Vas S, et al. Is extensive diverticulosis of the colon a contraindication to CAPD? Perit Dial Bull 1983;3:180-3.
- Tranaeus A, Heimbürger O, Granqvist S. Diverticular disease of the colon: a risk factor for peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Nephrol Dial Transplant 1990;5:141-7.
- Vas SI. Microbiological aspects of chronic ambulatory peritoneal dialysis. Kidney Int 1983;23:83-92.
- Luce E, Nakagawa D, Lovell J, et al. Improvement in the bacteriologic diagnosis of peritonitis with the use of blood culture media. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1982;28:259-62.
- Gokal R, Ramos JM, Ward MK, et al. "Eosinophilic" peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Nephrol 1981;15:328-30.
- Forbes BA, Frymoyer PA, Kopecky RT, Wojtaszek JM, Pettit DJ. Evaluation of lysis-centrifugation system for culturing dialysates from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients with peritonitis. Am J Kidney Dis 1988;11:176-9.
- Bennett-Jones D, Wass V, Mawson P, et al. A comparison of intraperitoneal and intravenous/oral antibiotics in CAPD peritonitis. Perit Dial Bull 1987;7:31-3.
- Millikin SP, Matzke GR, Keane WF. Antimicrobial treatment of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Perit Dial Int 1991;11:252-60.
- The ad hoc advisory committee on peritonitis management. Peritoneal dialysis-related peritonitis treatment recommendations. 1993 update. Perit Dial Int 1993;13:14-28.
- Bonten MJM, Hayden MK, Nathan C, et al. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. Lancet 1996;348:1615-9.
- Troidle L, Klinger HS, Gorban-Brennan N, et al. Nine episodes of CPD-associated peritonitis with vancomycin resistant enterococci. Kidney Int 1996;50:1368-72.
- Lameire N, Vogelaers D, Verschraegen G, et al. Vancomycin-resistant enterococci - a threat to the nephrologist on the horizon? Nephrol Dial Transplant 1996;11:2402-6.
- Moore RD, Smith CR, Lietman PS. Risk factors for the development of auditory toxicity in patients receiving aminoglycosides. J Infect Dis 1984;149:23-30.
- Shemin D, Maaz D, St. Pierre D, Kahn SI, Chazan JA. Effect of aminoglycoside use on residual renal function in peritoneal dialysis patients. Am J Kidney Dis 1999;34:14-20.
- Keane WF, Bailie GR, Boeschoten E, et al. Adult peritoneal dialysis-related peritonitis treatment recommendations: 2000 update. Perit Dial Int 2000;20:396-411.
- Vas SI. Treatment of peritonitis. How are we doing? Perit Dial Int 1995;15:201-2.
- Dasgupta MK. Use of streptokinase or urokinase in recurrent CAPD peritonitis. Adv Perit Dial 1991;7:169-72.
- Tzamaloukas AH, Obermiller LE, Gibel LJ, et al. Peritonitis associated with intra-abdominal pathology in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Perit Dial Int 1993;13:5335-7.
- Harwell CM, Newman LN, Cacho CP, et al. Abdominal catastrophe: visceral injury as a cause of peritonitis in patients treated by peritoneal dialysis. Perit Dial Int 1997;17:586-94.
- Harris DCH, Yuill EJ, Byth K, Chapman JR, Hunt C. Twin- versus single-bag disconnect systems: infection rates and cost of continuous ambulatory peritoneal dialysis. J Am Soc Nephrol 1996;7:2392-8.
- Twardowski ZJ (ed.) Peritoneal catheter exit-site morphology and pathology. Perit Dial Int 1996;16:(suppl.) 3.
- Gokal R, Ash SR, Helfrich GB, et al. Peritoneal catheters and exit-site practices: toward optimum peritoneal access. Perit Dial Int 1993;13:29-39.
- Plum J, Sudkamp S, Grabensee B. Results of ultrasound-assisted diagnosis of tunnel infections in continuous ambulatory peritoneal dialysis. Am J Kidney Dis 1994;23:99-104.
- Burkhardt JM. Significance, epidemiology and prevention of peritoneal dialysis catheter infections. Perit Dial Int 1996;16:S340-6.
- Khanna R, Twardowski ZJ. Peritoneal catheter exit-site (editorial). Perit Dial Int 1988;8:119-23.

Diagnostiek en behandeling van antistofdeficiënties

E. DE VRIES, A. FLEER

Patiënten met antistofdeficiëntie presenteren zich doorgaans met recidiverende infecties van de luchtwegen en het KNO-gebied, die ontstaan door gestoorde fagocytose van micro-organismen bij ontbreken van adequate opsonisatie. Soms staan obstructieve klachten meer op de voorgrond (hoesten, piepen, slijm), of presenteert de patiënt zich met recidiverende ernstige infecties zoals osteomyelitis of meningitis. Antistofdeficiëntie kan zowel congenitaal als verworven optreden. Bij agammaglobulinemie ontbreken de immuunglobulinen geheel, bij hypogammaglobulinemie zijn ze verlaagd ten opzichte van de normaalwaarde voor de leeftijd. In beide gevallen is substitutie van immuunglobuline nodig. In geval van een mildere antistofdeficiëntie bij normale IgG-spiegels, zoals selectieve IgA-deficiëntie, IgG-subklassedeficiëntie, antipolysaccharide-antistofdeficiëntie of een combinatie van deze, is antibiotische behandeling, al dan niet profylactisch, meestal afdoende. Tegenwoordig worden steeds meer patiënten gezien met een secundaire antistofdeficiëntie. Dit wordt veroorzaakt door het toenemend gebruik van agressieve chemotherapie en/of immuunsuppressiva in de oncologie, bij de behandeling van auto-immuunziekten, en na orgaantransplantatie.

Trefwoorden: antistofdeficiëntie, immuunglobulinesubstitutie, immuunsuppressieve therapie, luchtweginfecties, KNO-infecties

Patiënten met een antistofdeficiëntie presenteren zich meestal met problemen van de luchtwegen en het KNO-gebied.¹ Doorgaans betreft dit een te vaak optreden van 'gewone' infecties met bekende verwekkers, soms staan obstructieve klachten meer op de voorgrond (hoesten, piepen, slijm). Een enkele keer komt een patiënt met een antistofdeficiëntie onder medische aandacht door het herhaald optreden van ernstiger infecties zoals osteomyelitis of meningitis, of door bacteriëmie met een ongewoon micro-organisme. Behandeling is met de huidige antibiotische middelen en preparaten voor immuunglobulinesubstitutie heel goed mogelijk. Snelle herkenning is van belang; dit kan het optreden van irreversibele schade in de vorm van bijvoorbeeld bronchiëctasieën voorkomen.

Pathofysiologie

Bij de verdediging tegen extracellulaire bacteriën spelen antistoffen een cruciale rol.² Specifiek secretorisch IgA helpt adherentie van micro-organismen aan de oppervlaktelasma-vliezen te voorkomen. Treedt toch adherentie en aansluitend penetratie van het slijmvlies op, dan veroorzaken bacteriële oppervlaktestructuren complementactivatie via de alternatieve route, en daarmee opsonisatie (met complement). Als specifiek IgG aanwezig is, leidt dit eveneens tot opsonisatie (met IgG) en daarmee tot activatie van complement via de klassieke route, en toename van opsonisatie (met complement). Daarbij komen ook allerlei chemotactische factoren vrij die granulocyten en monoccyten/macrofagen aantrekken. Zij treden de ontstekingshaard binnen, hechten zich met behulp van hun immuunglobuline- en complementreceptoren aan de geopsoniseerde micro-organismen, en fagocyteren en doden ze. Met name bij kapselvormende bacteriën is dit proces van opsonisatie essentieel voor een efficiënt verloopende fagocytose.

B-lymfocyten kunnen zonder hulp van T-lymfocyten specifieke antistoffen maken tegen polysaccharide-antigenen zoals aanwezig in het kapsel van pneumokokken. Deze antistofreactie wordt daarom T-cel-onafhankelijk genoemd. Polysaccharide-antigenen bestaan uit repeterende eenheden, waardoor multiple antigeen-antilichaamreacties de immuunglobuline-receptoren op het oppervlak van de B-lymfocyt bij elkaar brengen, wat leidt tot effectieve signaaltransductie en activatie van de betrokken B-lymfocyt.

Eiwitten zijn complexe moleculen die veel verschillende epitopen bevatten, waarvan er slechts één per B-lymfocyt wordt herkend na gerichte presentatie door een antigeen-presenterende cel. De macrofagen (en andere antigeen-presenterende cellen) breken namelijk de eiwitantigenen uit de micro-organismen af tot peptiden, en nemen deze peptiden mee naar de lymfeklieren voor presentatie aan T- en B-lymfocyten. Activatie van de B-lymfocyt is afhankelijk van gelijktijdige productie van cytokinen door een helper-T-lymfocyt die op zijn beurt werd geactiveerd door het hiervoor beschreven proces van fagocytose, intracellulaire degradatie en presentatie van peptiden door antigeen-presenterende cellen. De antistofvorming tegen eiwitantigenen zoals tetanus-toxoid wordt daarom T-cel-afhankelijk genoemd.³

Bij de geboorte is het immuunsysteem goed in staat op eiwitantigenen te reageren. De T-cel-onafhankelijke immuunrespons op polysaccharide-antigenen ontwikkelt zich echter pas in de loop van het tweede levensjaar. Dit betekent dat zuigelingen en jonge peuters zich nog onvoldoende kunnen verdedigen tegen infecties met kapselvormende extracellulaire bacteriën zoals pneumokokken, *Haemophilus influenzae* type b en meningokokken. Ook zullen zij geen respons vertonen op polysaccharidevaccins. Wanneer het polysaccharide-antigeen in

samenhang met een eiwitantigeen aan het immuunsysteem wordt gepresenteerd, kan wel een goede immuunrespons ontstaan; de T-lymfocyten die door de reactie op het eiwitantigeen worden gerekruteerd produceren voldoende cytokinen om de B-lymfocyten in staat te stellen alsnog op het polysaccharide-antigeen te reageren. Op dit principe zijn de eiwitconjugaat-vaccins gebaseerd.⁴

De presentatie van de patiënt

Patiënten met antistofdeficiëntie presenteren zich met name met recidiverende bacteriële infecties van de luchtwegen en het KNO-gebied.¹ Dit betreft meestal 'gewone' infecties met bekende verwekkers, vooral extracellulaire gekapselde bacteriën zoals pneumokokken, die echter te vaak, te lang en te hardnekkig optreden. Bij enkele patiënten worden ook recidiverende ernstigere infecties gezien zoals osteomyelitis, artritis en meningitis, of bacteriëmie met ongewone verwekkers zoals *Campylobacter jejuni* of *Ureaplasma urealyticum*.⁵ Ook deze meer bijzondere infecties treden vaak recidiverend op, en ze zijn moeilijk te genezen. Dit patroon past bij het uitblijven van adequate fagocytose van bacteriën door het ontbreken van opsoniserende antistoffen.² Soms staan de infecties minder op de voorgrond, en presenteert de patiënt zich met onbegrepen bronchiëctasieën, of met moeilijk te bestrijden obstructieve klachten (hoesten, piepen, slijm). Deze luchtwegproblemen zijn, als de diagnose eenmaal is gesteld, meestal goed te bestrijden met adequate immuunglobulinensubstitutie.

Gastro-intestinale infecties met *Giardia lamblia* en *Campylobacter jejuni* blijven vaak een probleem, ondanks immuunglobulinensubstitutie-therapie. Dat heeft waarschijnlijk te maken met het blijven ontbreken van secretoir IgA in de darm: de substitutiepreparaten bevatten alleen IgG, dat niet aan de oppervlakten van de slijmvliezen terecht komt.⁶ Daarnaast is meningo-encefalitis door enterovirussen een specifiek probleem van patiënten met agammaglobulinemie, vooral bij inadequate immuunglobulinensubstitutie. Dit verloopt vaak fataal.⁷ Het achterliggende pathogenetische mechanisme van deze soortspecifieke gevoeligheid is nog onvoldoende begrepen. Overigens wordt deze complicatie niet vaak meer gezien sinds adequate immuunglobulinensubstitutie mogelijk is, en bij de meeste patiënten normale IgG-spiegels worden bereikt.

Een overzicht van de verwekkers die bij patiënten met antistofdeficiëntie worden gevonden is opgenomen in *Tabel 1*.

Het is niet eenvoudig uit de grote groep patiënten met recidiverende luchtweg- en KNO-infecties juist die patiënten te selecteren die een antistofdeficiëntie zouden kunnen hebben. Onlangs werden hiervoor handzame beslisbomen gepubliceerd in het Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, die uitgaan van de klinische presentatie van de patiënt (symptomen en ziekteverwekkers).^{8,9} Daarnaast worden secundaire stoornissen in de afweer steeds frequenter gezien door het toenemend gebruik van immuunsuppressiva en agressieve chemotherapie in de oncologie, bij de behandeling van auto-immuunziekten en na orgaantransplantatie. Daardoor kunnen antistofdeficiënties worden geïnduceerd die tot klinische problemen kunnen leiden die specifieke therapie noodzakelijk maken.

Tabel 1. Voornaamste verwekkers bij patiënten met antistofdeficiënties

LUCHTWEGINFECTIE, PNEUMONIE	
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Pneumocystis carinii</i>	(als ook T-lymfocytaire stoornis aanwezig is, zoals bij X-gebonden hyper-IgM-syndroom of CVID)
ARTRITIS / OSTEOMYELITIS	
<i>Haemophilus influenzae type b</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	
MENINGITIS / ENCEFALITIS	
Enteroviridae (echovirus / poliovirus)	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i>	
GASTRO-INTESTINALE INFECTIES	
<i>Giardia lamblia</i>	
<i>Campylobacter jejuni</i>	
<i>Salmonella</i>	
<i>Shigella</i>	
Rotavirus	
<i>Cryptosporidium</i> -cholangitis (specifiek bij X-gebonden hyper-IgM syndroom)	

Twee cases ter illustratie

Patiënt 1 is een meisje van drie jaar, dat onder controle is bij de kinderarts in verband met een succesvolle cardiologische correctie van een tetralogie van Fallot. Opvallend is dat haar moeder haar altijd als moe en hangerig beschrijft; zij heeft een slecht uithoudingsvermogen. De cardioloog is ervan overtuigd dat dit niets te maken kan hebben met de cardiale situatie. Nader doorvragen leert dat zij al langere tijd bekend is bij de KNO-arts in verband met recidiverende infecties in het KNO-gebied. Bacteriële kweken werden niet verricht. Adenotomie en inbrengen van trommelvliesbuisjes hebben geen soelaas gebracht. De kinderarts vindt bij laboratoriumonderzoek het volgende: IgG 3 g/l, IgA 0,12 g/l, IgM 0,5 g/l, IgG₁ 2,6 g/l, IgG₂ < 0,03 g/l, IgG₃ 0,23 g/l, IgG₄ < 0,03 g/l, difterie 0,05 IU/ml en tetanus 0,12 IU/ml vóór, en respectievelijk 0,38 en 1,31 IU/ml ná DTP-booster, pneumokokken type 3, 4 en 9 respectievelijk 1, 1 en < 1 U/ml vóór en 4, 2 en 1 U/ml ná Pneumovax®. Concluderend is sprake van hypogammaglobulinemie met matige anti-eiwitrespons, en uitblijvende anti-polysacchariderespons, passend bij de diagnose "Common Variable Immuno Deficiency" (CVID). Zij wordt met goed resultaat behandeld met immuunglobulinensubstitutie: de infectiefrequentie neemt af, en de algemene conditie verbetert. Een oudere broer en zus blijken ook te lijden aan recidiverende KNO-infecties. Bij hen wordt alleen een IgG₂-deficiëntie gevonden; er wordt voorlopig afgewacht.

Patiënt 2 is een vrouw van 17 jaar die op de zuigelingenleeftijd werd behandeld met cytostatica en dubbelzijdige nefrectomie in verband met Wilms-tumoren. Na enkele jaren van peritoneaaldialyse en aansluitend hemodialyse werd zij getransplanteerd met een nier van haar vader. In verband met herhaalde episodes van rejectie is een toenemend krachtige immuunsuppressie nodig geweest, die zij inmiddels al meer dan tien jaar gebruikt. Zij presenteert zich bij de longarts met recidiverende lagere-luchtweginfecties, chronisch purulent hoesten en bronchiëctasieën. Sputumkweken tonen *H. influenzae*. Laboratoriumonderzoek toont het volgende: IgG 5 g/l, IgA 0,54 g/l, IgM 0,8 g/l, IgG₁ 4,1 g/l, IgG₂ 0,7 g/l, IgG₃ 0,34 g/l, IgG₄ < 0,05 g/l, difterie 0,03 IU/ml en tetanus 0,18 IU/ml vóór, en respectievelijk 0,02 en 0,28 IU/ml ná DTP-booster, pneumokokken type 3, 4 en 9 respectievelijk 5, 2 en 1 U/ml vóór en 12, 5 en 2 U/ml ná Pneumovax®. CD3⁺-T-lymfocyten zijn 1,1 x 10⁹/l (referentiewaarden voor volwassenen 0,7-1,9 x 10⁹/l), CD19⁺-B-lymfocyten 0,02 x 10⁹/l (sterk verlaagd; referentiewaarden voor volwassenen 0,1-0,4 x 10⁹/l). Concluderend is sprake van vrijwel afwezige specifieke antistofproductie op zowel eiwit- als polysaccharide-antigenen, bij milde hypogammaglobulinemie, laag-normale aantallen T-lymfocyten en sterk verlaagde aantallen B-lymfocyten. Deze afwijkingen zijn secundair aan de krachtige en zeer langdurige immuunsuppressieve therapie. Aangezien deze therapie niet gestaakt of verminderd kan worden, en bronchiëctasieën reeds aanwezig zijn, wordt gestart met immuunglobulinensubstitutie.

Agammaglobulinemie

Bij een rijpingsstop die vroeg in de B-celontwikkeling ligt, zullen B-lymfocyten ontbreken in het perifere bloed, en wordt weinig tot geen immuunglobuline gevormd (agammaglobulinemie; IgG < 2 g/l, IgM < 0,5 g/l en IgA < 0,05 g/l).¹⁰ Secundair lymfoïdweefsel (lymfklieren, tonsillen) is dan nauwelijks aanwezig. Agammaglobulinemie zonder B-lymfocyten wordt gevonden bij X-gebonden agammaglobulinemie (XLA) veroorzaakt door deficiëntie van het Bruton-tyrosinekinase (Btk; incidentie 1:200.000), maar bijvoorbeeld ook bij de recent beschreven Igμ-deficiëntie en CD79-deficiëntie, die eveneens leiden tot een vroege stop in de B-celontwikkeling. Hoewel de diagnose XLA meestal op jonge leeftijd wordt gesteld, zijn er patiënten beschreven bij wie de aandoening pas op latere leeftijd werd vastgesteld.

Hypogammaglobulinemie

Er is sprake van hypogammaglobulinemie als er wel immuunglobulinen aanwezig zijn, maar de plasmaspiegels ruim onder de normaalwaarden liggen. In verband met de veranderingen die het immuunsysteem in de loop van het leven doormaakt, is het essentieel voor de beoordeling hiervan gebruik te maken van leeftijdsgerelateerde normaalwaarden.⁸

CVID of 'late onset'-hypogammaglobulinemie is een waarschijnlijk heterogene groep van soms familiair voorkomende aandoeningen waarbij geleidelijk een immuundeficiëntie ontstaat.¹¹ Secundair lymfoïdweefsel is wel aanwezig, vaak is er zelfs een lymfadenopathie door reactieve folliculaire hyperplasie. De oorzaak is nog niet duidelijk. Er lijkt sprake te zijn van immuundisregulatie, waarbij auto-immuunziekten en maligniteiten in verhoogde frequentie voorkomen. In de loop van de tijd ontwikkelen zich een IgA-deficiëntie, een IgG-subklassedeficiëntie en een antipolysaccharide-antistof-

deficiëntie. Later kan dit uitbreiden tot een hypogammaglobulinemie, gestoorde responsen op eiwitantigenen, en eventueel een T-lymfopenie met gestoorde T-cellulaire immuniteit. De prevalentie van CVID neemt toe met de leeftijd, er ligt een piek in de incidentie rond de leeftijd van drie tot vijf jaar, een tweede piek tussen 12 en 16 jaar, en nog één op de volwassen leeftijd. In de praktijk van zowel kinderarts, internist als longarts wordt dit beeld met enige regelmaat gezien.

Bij hypogammaglobulinemie met normale of zelfs verhoogde waarden van IgM is sprake van het vrij zeldzame hyper-IgM-syndroom, meestal veroorzaakt door CD40-liganddeficiëntie op geactiveerde T-lymfocyten (X-gebonden hyper-IgM-syndroom, XHIM),¹² soms door een mutatie in het 'activation induced cytidine deaminase'-gen dat tot expressie komt in B-lymfocyten in de secundaire lymfoïde organen (autosomaal recessief hyper-IgM-syndroom).¹³ B-lymfocyten zijn normaal aanwezig in het perifere bloed, zij zijn alleen niet in staat over te schakelen van de productie van IgM naar de productie van IgA, IgG en IgE. XHIM-patiënten hebben ook last van hun T-lymfocytaire stoornis. Dit uit zich in opportunistische infecties zoals *Pneumocystis carinii*-pneumonie en chronische diarree met progressief leverfalen door *Cryptosporidium*-cholangitis.

Selectieve IgA-deficiëntie

Selectieve IgA-deficiëntie (< 0,05 g/l; kinderen < -2 SD voor de leeftijd) is de meest voorkomende afweerstoornis: 1:400 à 800 individuen is aangedaan.¹⁰ IgA-deficiëntie is meestal sporadisch, soms familiair, met name in families met CVID. Een geïsoleerde IgA-deficiëntie heeft meestal geen klinische consequenties. Wellicht heeft dit te maken met het feit dat secretoir IgM de rol van secretoir IgA gedeeltelijk kan overnemen.¹⁴ IgA-deficiëntie is vaak (in 20 tot 50 procent van de gevallen) geassocieerd met IgG-subklassedeficiëntie en/of antipolysaccharide-antistofdeficiëntie. Indien deze combinaties aanwezig zijn, heeft dit doorgaans wel klinische consequenties.³

IgG-subklassedeficiëntie

Het totale serum IgG bestaat uit de vier subklassen IgG₁ (60-70 procent), IgG₂ (20-30 procent), IgG₃ (5-10 procent) en IgG₄ (1-5 procent). Bij een normaal totaal serum IgG kan toch een deficiëntie van één of meer van de IgG-subklassen bestaan.¹⁵ Antistoffen tegen eiwitantigenen, en sommige antipolysaccharide-antistoffen zijn gelokaliseerd in het IgG₁. Een IgG₁-deficiëntie resulteert in een verlaagd totaal serum IgG, en dus in hypogammaglobulinemie met klinische consequenties. De IgG₂-subklasse bevat belangrijke polysaccharide-antistoffen. IgG₂-deficiëntie is klinisch vaak geassocieerd met een verhoogde infectiegevoeligheid voor gekapselde bacteriën zoals pneumokokken. IgG₂-deficiëntie is de meest voorkomende IgG-subklassedeficiëntie op de kinderleeftijd. Antistoffen tegen eiwitantigenen kunnen gelokaliseerd zijn in de IgG₃-subklasse. Patiënten met IgG₃-deficiëntie hebben doorgaans klinische verschijnselen. Over het algemeen heeft een solitaire IgG₄-deficiëntie geen klinische betekenis.

Antipolysaccharide-antistofdeficiëntie

Een antipolysaccharide-antistofdeficiëntie is het selectieve onvermogen van B-lymfocyten om op polysaccharide-antigenen te reageren. De respons op eiwitantigenen is wel

intact. Dit resulteert doorgaans in klinische verschijnselen, die echter sterk kunnen variëren in ernst, van recidiverende bacteriële bovenste luchtweginfecties tot recidiverende pneumonieën met bronchiëctasieën en levensbedreigende invasieve infecties.³ Dit laatste wordt met name gezien als de respons op meerdere pneumokokkenserotypen na vaccinatie met Pneumovax[®] lager is dan tien procent van normaal.

Secundaire antistofdeficiënties

De verworven immuundeficiëntie bij uitstek is het door het humaan immunodeficiëntievirus (HIV) veroorzaakte 'acquired immunodeficiency syndrome' (AIDS). Hierbij staan opportunistische infecties door de falende T-lymfocyttaire immuniteit op de voorgrond. Kinderen kunnen zich echter in eerste instantie presenteren met een beeld van recidiverende luchtweg- en KNO-infecties. Vaak is een stoornis in de specifieke antistofvorming aantoonbaar, ondanks de aanwezigheid van meestal zelfs hoge immuunglobulinespiegels. Kinderen met deze problematiek doen het aantoonbaar beter met immuunglobulinensubstitutie.¹⁶ De cotrimoxazol die in verband met *P. carinii*-profylaxe wordt gebruikt heeft overigens ook vaak een gunstig effect op de frequentie van de luchtweginfecties.

Patiënten die langdurig met cytostatica en/of immuunsuppressiva worden behandeld, kunnen op den duur een secundaire antistofdeficiëntie ontwikkelen waarbij recidiverende luchtweginfecties tot grote problemen kunnen leiden, met bijvoorbeeld bronchiëctasieën tot gevolg.¹⁷ Dit kan zich uiten in lage immuunglobuline spiegels in het bloed, maar ook in min of meer ernstige antipolysaccharide-antistofdeficiëntie bij overigens normale immuunglobuline spiegels. Ook na staken van de therapie duurt het nog geruime tijd voor de antistofdeficiëntie zich heeft hersteld. Bij veel patiënten, bijvoorbeeld na orgaantransplantatie, is staken of verminderen van de immuunsuppressie niet mogelijk. Ondersteunende behandeling met immuunglobulinensubstitutie kan dan nodig zijn.

Therapie

De behandeling van antistofdeficiëntie bij een patiënt is sterk afhankelijk van zowel de ernst van de laboratoriumbevindingen, als van de klinische situatie.¹⁶ Zo moet agammaglobulinemie altijd worden behandeld met immuunglobulinensubstitutie.

Literatuur

- Stiehm ER, Chin TW, Haas A, Peerless AG. Infectious complications of the primary immunodeficiencies. *Clin Immunol Immunopathol* 1986;40:69-86.
- Basic concepts in immunology. In: Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD (eds). *Immunobiology. The immune system in health and disease*. New York: Churchill Livingstone 1999; 1-31.
- Rijkers GT, Sanders LA, Zegers BJ. Anti-capsular polysaccharide antibody deficiency states. *Immunodeficiency* 1993;5:1-21.
- Goldblatt D. Recent developments in bacterial conjugate vaccines. *J Med Microbiol* 1998;47:563-7.
- Van der Meer JWM, Mouton RP, Daha MR, Schuurman KB. *Campylobacter jejuni* bacteremia as a cause of recurrent fever in a patient with hypogammaglobulinaemia. *J Infect* 1986;12:235-9.
- Zinneman HH, Kaplan AP. The association of giardiasis with reduced intestinal secretory immunoglobulin A. *Dig Dis Sci* 1975;125:207-13.
- McKinney RE Jr, Katz SL, Wilfert CM. Chronic enteroviral meningoencephalitis in agammaglobulinemic patients. *Rev Infect Dis* 1987;9:334-56.
- De Vries E, Kuijpers TW, van Tol MJD, van der Meer JWM, Weemaes CMR, van Dongen JJM. Immunologie in de medische praktijk. XXXIV. Diagnostiek bij vermoeden van een afweerstoornis: inleiding. *Ned Tijdschr Geneesk* 2000;144:2192-6.
- De Vries E, Kuijpers TW, van Tol MJD, van der Meer JWM, Weemaes CMR, van Dongen JJM. Immunologie in de medische praktijk. XXXV. Diagnostiek bij vermoeden van een afweerstoornis: onderzoeksprotocollen voor patiënten met opportunistische of recidiverende ernstige infecties, sterke vermagering en niet-gedijen ('failure to thrive'). *Ned Tijdschr Geneesk* 2000;144:2197-203.
- Primary immunodeficiency diseases. Report of an IUIS Scientific Committee. International Union of Immunological societies. *Clin Exp Immunol* 1999;118(S1):1-28.
- Cunningham-Rundles C. Clinical and immunological analyses of 103 patients with common variable immunodeficiency. *J Clin Immunol* 1989;9:22-33.
- Kroczeck RA, Graf D, Brugnani D, et al. Defective expression of CD40 ligand on T cells causes "X-linked immunodeficiency with hyper-IgM (HIGM1)". *Immunol Rev* 1994;138:39-59.
- Revy P, Muto T, Levy Y, et al. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM Syndrome. *Cell* 2000;102:565-75.
- Van Waarde WM, Van der Heyden AJ. IgA deficiency: klinische en immunologische evaluatie van 28 patiënten. *Tijdschr Kindergeneesk* 1992;60:31-5.
- Herrod HG. Clinical significance of IgG subclasses. *Curr Opin Pediatr* 1993;5:696-9.
- Stiehm ER. Human intravenous immunoglobulin in primary and secondary antibody deficiencies. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:696-707.
- Mustafa MM, Buchanan GR, Winick NJ, et al. Immune recovery in children with malignancy after cessation of chemotherapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20:451-7.

In geval van IgA-deficiëntie, IgG-subklassedeficiëntie, antipolysaccharide-antistofdeficiëntie of combinaties daarvan, hangt het af van de klinische situatie van de patiënt of wordt gekozen voor snelle antibiotische behandeling van vermoedelijke infecties, antibiotische profylaxe met bijvoorbeeld cotrimoxazol, of – in uitzonderlijke gevallen – immuunglobulinensubstitutie. Als er geen klinische verschijnselen zijn hoeft er zelfs helemaal niet behandeld te worden! Patiënten met hypogammaglobulinemie blijven doorgaans problemen houden als niet met immuunglobulinensubstitutie wordt gestart, vooral als sprake is van gestoorde specifieke antistofresponsen op polysaccharide en/of eiwitantigenen.

Summary

Generally, patients with antibody deficiency present with recurrent respiratory infections, caused by disturbed phagocytosis due to inadequate opsonisation of micro-organisms. Sometimes, obstructive respiratory disease is the presenting symptom (cough, wheezing, sputum). Patients may also present with recurrent severe infections like osteomyelitis or meningitis. Antibody deficiency can be congenital or acquired in origin. In case of agammaglobulinemia, immunoglobulins are absent. In hypogammaglobulinemia, immunoglobulin levels are lower than the age-matched reference values. In both cases, immunoglobulin substitution is necessary. In milder antibody deficiencies like selective IgA-deficiency, IgG-subclass deficiency, antipolysaccharide antibody deficiency or a combination thereof, IgG levels are normal. Generally, in these patients prompt treatment with antibiotics, or antibiotic prophylaxis is sufficient therapy. Nowadays, more and more patients are being seen with secondary antibody deficiency, due to an increasing use of aggressive chemotherapy and/or immune suppression in the treatment of malignancies, auto-immune diseases, and after organ transplantation.

Mw. dr. E. de Vries, kinderarts-immunoloog, Jeroen Bosch Ziekenhuis, locatie Groot Ziekengasthuis, Postbus 90153, 5200 ME 's-Hertogenbosch (correspondentie)

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

De fluorescentiemicroscop

Naast HIV en AIDS is tuberculose een groot volksgezondheidsprobleem in Ethiopië. Het aantal (her)infecties en opvlammende oude infecties met *M. tuberculosis* is met het voortschrijden van de HIV-epidemie enorm toegenomen. Geschat wordt dat 50 procent van de tuberculosepatiënten seropositief is voor HIV. Daarmee dreigt de diagnose tuberculose al bijna even stigmatiserend te zijn als het vonnis HIV-infectie zelf. Omdat er bij iedere patiënt die aanhoudend hoest, overigens niet ten onrechte, aan tuberculose wordt gedacht, is de werkdruk op het laboratorium waar de sputumuitstrijkjes op zuurvaste staven worden gescreend, hoog. Per patiënt moeten drie sputa beoordeeld worden, voordat een negatieve uitslag mag worden afgegeven. Desondanks worden toch nog veel mensen met een diagnose 'smear-negatieve pulmonaire TB' op tuberculosebehandeling gezet. Routinekweken voor *M. tuberculosis* is er in dit land, waar zelfs op de bacteriologie afdeling van het universiteitsziekenhuis in Addis Ababa geen mycobacteriën worden gekweekt, al helemaal niet bij; slechts als er een sterke verdenking is op "multi drug resistant TB", worden sputa ingestuurd voor kweek. Om het leven van de analisten op de tb-afdeling wat te ver-aangenamen, en natuurlijk afgaande op de gerapporteerde hogere gevoeligheid, zijn we begonnen met naast de ZN-kleuring, auraminekleuring in te voeren. Daarvoor is een fluorescentiemicroscop nodig en jawel, er blijkt een exemplaar op het instituut aanwezig te zijn! Deze microscop wordt gebruikt om coupes van hersenweefsel van hondsdolle honden te onderzoeken op aanwezigheid van rabiesvirus.

Als ik 's ochtends de lange oprijlaan van het voormalig Pasteur-instituut oprijd, word ik verwelkomd door het gebelaf van potentieel rabies-geïnfecteerde honden, die in hokken worden vastgehouden totdat ze ofwel inderdaad aan de rabies bezwijken, of weer gezond en wel door hun baas worden meegenomen. Ethiopiërs zijn bang voor honden, hetgeen te begrijpen is aangezien in Addis alleen al zo'n 300.000 zwerfhonden rondlopen (hoewel het gerucht gaat dat sinds de Chinezen een ringweg rond de hoofdstad aan het aanleggen zijn, dit aantal drastisch is gedaald). Of al deze zwerfexemplaren door de periodieke 'rabies-vaccinatie-campagne' (er rijdt een geluidswagen door de wijk die oproept tot het laten vaccineren van je hond) bereikt worden, is maar zeer de vraag. De betrouwbaarheid van de statistieken 'aangifteplichtige infectieziekten' blijkt zeer beperkt: humane rabies is de afgelopen jaren in Ethiopië niet geregistreerd. Op het instituut komen echter met regelmaat mensen na een beet door een verdachte hond, hun post-expositievaccinatie halen: een procedure die mij de rillingen over de rug doet lopen: een lokaal vaccin geproduceerd op schapenhersenen, dat intraperitoneaal wordt toegediend... Terug naar de fluorescentiemicroscop: in de routinescreening hebben we met de auramine al een klein succesje geboekt: vijf (van 50) in de ZN gemiste, positieve sputa gevonden: nu nog de bijbehorende kweekresultaten afwachten!

Mw. dr. J.W. Dorigo-Zetsma, Expatriate Laboratory Manager ENARP, P.O. Box 1242, Addis Abeba, Ethiopië

Nederlandse Vereniging voor Medische Mycologie

De oorsprong van de Vereniging gaat terug tot 1988 toen geïnteresseerden in de medische mycologie bijeenkwamen tijdens informele 'Mycologenavonden' waar, naast het leggen van informele contacten, voordrachten werden gehouden over eigen onderzoek, en casuïstische mededelingen werden gedaan. Vijf jaar later, op 12 mei 1993, is de Nederlandse Vereniging voor Humane en Veterinaire Mycologie (NVMY) opgericht met als eerste voorzitter Rob Wintermans, de drijvende kracht achter deze groep. Om de Vereniging een duidelijk en aansprekend profiel te geven is op de voorjaarsvergadering in 1998 besloten om de naam te wijzigen in Nederlandse Vereniging voor Medische Mycologie. De leden worden tweemaal per jaar op de hoogte gehouden van activiteiten en nieuwe ontwikkelingen via een Verenigingsbulletin. Wetenschappelijke vergaderingen worden jaarlijks gehouden tijdens de Voorjaarsvergadering van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie en in het najaar op wisselende locaties (2000, Nijmegen; 2001, Utrecht). Na de Duitse, Engelse, Franse, Italiaanse en Belgische verenigingen horen wij, met 150 leden, in de European Confederation of Medical Mycology tot de grote verenigingen voor medische mycologie. Dat Nederland serieus wordt

genomen in internationaal verband blijkt uit het feit dat onze Vereniging uitgenodigd is om in het najaar van 2003 het negende European Confederation of Medical Mycology (ECMM) congres te organiseren. Na intensief overleg met de organisatoren van een ander groot Europees mycologiecongres (Trends in Invasive Fungal Infections, TIFI) is besloten om van 29 september tot en met 1 oktober 2003 in Amsterdam voor de eerste maal een joint meeting van beide congressen te laten plaats vinden.

Nederlandse mycologen stonden aan het begin van de vorige eeuw aan de bakermat van het aandachtsgebied (medische) mycologie met name door de Delftse school en later door het internationaal referentiecentrum voor fungi, het Centraalbureau voor Schimmelcultures. De Vereniging blijft in de toekomst haar best doen om, naast de andere aandachtsgebieden van de medische microbiologie, kwalitatief hoogstaande medische mycologie in Nederland te consolideren en zo mogelijk uit te breiden.

Dr. J.F.G.M. Meis, Voorzitter NVMY, Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Afd. Medische Microbiologie en Infectieziekten, Postbus 9015, 6500 GS Nijmegen

PERSONALIA

Nieuwe aanmeldingen NVMM

- N.L.A. Arents, Academisch Ziekenhuis Groningen, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 30 001, 9700 RB Groningen
- Mw. F. Bosma, Kluzeweg 280, 6815 EK Arnhem
- Mw. dr. ing. N. van den Braak, Erasmus Medisch Centrum Rotterdam, Afd. Medische Microbiologie & Infectieziekten, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam
- Dr. J. Gooskens, Leids Universitair Medisch Centrum, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden
- Dr. B.L. Haagmans, Erasmus Medisch Centrum Rotterdam, Afd. Virologie, Dr. Molewaterplein 50, 3015 GE Rotterdam
- Mw. A. Riezebos-Brilman, Westersingel 35 A, 9718 CC Groningen
- Mw. J.A. Severin, Pelikaanhof 147, 2312 EH Leiden
- Dr. J.J. de Soet, VU-ACTA, Afd. Orale Microbiologie, v.d. Boechorststraat 7, 1018 BT Amsterdam
- S.J.C. Stevens, Het Laagt 103, 1025 GE Amsterdam

Adreswijzigingen

- Mw. H.A. van Dessel, Gelre Ziekenhuizen, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 9014, 7300 DS Apeldoorn (voorheen Universitair Medisch Centrum Utrecht)

- Dr. W.L. Manson, Academisch Ziekenhuis Groningen, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 30001, 9700 RB Groningen (voorheen Streeklaboratorium, Groningen)
- B. Maraha, Regionaal Lab. Medische Microbiologie Dordrecht/Gorinchem, Postbus 899, 3300 AW Dordrecht (voorheen Streeklaboratorium, Tilburg)
- Dr. B.P. Overbeek, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Postbus 30039, 9700 RM Groningen (voorheen Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland)
- Dr. Ph.H. Rothbarth, Rijnland Ziekenhuis, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 4220, 2350 CC Leiden (voorheen Streeklaboratorium, Enschede)
- J.E. van Steenberg, LCI, Postbus 85300, 3508 AH Utrecht (voorheen LCI Den Haag)
- Dr. H.T. Tjhie, Stichting PAMM, Postbus 2, 5500 AA Veldhoven (voorheen Academisch Ziekenhuis Maastricht)
- Mw. G. Weers-Pothoff, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Afd. Medische Microbiologie, Postbus 90153 (adres blijft ongewijzigd), 5200 ME 's-Hertogenbosch (voorheen Bosch Medicentrum, 's-Hertogenbosch)

10 oktober 2001 - M.A. Gaytaut

Cytomegalovirus and herpes simplex virus infections in pregnancy.

Promotores: prof. dr. J.M.D. Galama, prof. dr. J.M.W.M. Merkus.
Co-promotores: Dr. E.A.P. Steegers, Dr. B.A. Semmekrot.
Universitair Medisch Centrum St. Radboud, afd. Medische Microbiologie.

9 november 2001 - J.G.M. Veeken

Control of infectious diseases in developing countries: field studies on visceral leishmaniasis and meningitis.

Promotor: prof. dr. P.A. Kager. Co-promotor: Dr. R.N. Davidson.
Universiteit van Amsterdam, AMC, Inwendige Geneeskunde, Tropische Infectieziekten en AIDS.

7 december 2001 - N.K. van den Engel

The role of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in experimental diabetes.

Promotores: prof. dr. W. van Eden, prof. dr. H. Kolb.
Co-promotor: Dr. S. Martin. Universiteit Utrecht, Fac. Diergeneeskunde, hoofd afd. Infectieziekten & Immunologie, afd. Immunologie. German Diabetes Research Institute at the Heinrich Heine-University of Düsseldorf.

13 december 2001 - J.H.M. van Bilsen

Hunting for novel autoantigens in arthritis. Matrix metalloproteinases as immunological marker and therapeutic agent.

Promotor: prof. dr. W. van Eden. Co-promotor: Dr. M.H.M. Wauben.
Universiteit Utrecht, Fac. Diergeneeskunde, Hoofd afd. Infectieziekten en Immunologie, afd. Immunologie.

18 december 2001 - N.M. Renwick

Human herpesvirus 8 and Kaposi's sarcoma in the Amsterdam Cohort Studies: disease association, transmission and natural history.

Promotor: prof. dr. J. Goudsmit. Universiteit van Amsterdam, AMC, afd. Humane Retrovirologie.

20 december 2001 - K.J. Stittelaar

Vaccination against measles: evaluation of novel approaches.

Promotor: prof. dr. A.D.M.E. Osterhaus. Co-promotor: Dr. R.L. de Swart. Erasmus universitair Medisch Centrum Rotterdam, Inst. Virologie.

11 januari 2002 - R. Satokari

Molecular identification and characterization of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract.

Promotor: prof. dr. W.M. de Vos. Universiteit Wageningen, lab. v. Microbiologie.

8 februari 2002 - M. de Wit

Epidemiology of gastroenteritis in the Netherlands.

Promotor: prof. dr. R.A. Coutinho. Co-promotores: Dr. Y.T.H.P. van Duynhoven, Dr. M.P.G. Koopmans. Universiteit van Amsterdam, GGD, sector Volksgezondheid en Milieu.

14 maart 2002 - A. Terhell

Epidemiological facets of lymphatic filariasis as revealed by the use of anti-filarial IgG4.

Promotor: prof. dr. A.M. Deelder. Co-promotor: Dr. M. Yazdanbakhsh. Leids Universitair Medisch Centrum, afd. Parasitologie.

16 april 2002 - A.M.E. Walenkamp

Cryptococcus neoformans.

Promotor: prof. dr. I.M. Hoepelman. Universitair Medisch Centrum Utrecht, afd. Inwendige Geneeskunde.

* NIEUW

7 MAART 2002: *

Symposium over kwaliteit: 'De keerzijde van de medaille', De Reehorst, Amersfoort. Georganiseerd door NVMM, NVML en NVKC. Inf.: NVML, Wilhelminalpark 52, 3581 NM Utrecht. Tel.: (030) 252 37 92, e-mail: nvml@telebyte.nl.

27 MAART 2002:

Symposium 'Tuberculose: een multidisciplinair probleem', Nijmegen, Auditorium UMC St.Radboud. Inf.: Symposium-secretariaat PAOG Heyendaal. Tel.: (024) 361 70 53, e-mail: b.keijser@paog-fmw.kun.nl, of: M.J. Boeree en W.C.M. de Lange, longartsen, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, locatie Dekkerswald, Nijmegen.

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.

15 - 19 APRIL 2002:

Cursus 'International Course on Laboratory Methods for the Diagnosis of Leptospirosis', Amsterdam. Inf.: Dr. R.A. Hartskeerl, Head Leptospirosis Reference Laboratory, KIT Biomedical Research, Meibergdreef 39, 1105 AZ Amsterdam. Tel.: (020) 566 54 54, fax: (020) 697 18 41, e-mail: BiomedicalResearch@kit.nl, Internet: http://www.kit.nl/biomedical_research/html/body_course.asp.

24 - 27 APRIL 2002:

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.

23 MEI 2002: *

Symposium 'Research in International Health', Academisch Medisch Centrum, Amsterdam. Abstracts voor presentatie in het middagprogramma zijn nog in te dienen tot 31 maart 2002. Inf.: Mw. Petra Schneider, e-mail: p.schneider@mmb.azn.nl.

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: schirmjsgl@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: schirmjsgl@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.

Onderwerp	Pagina	Technologie	Pagina
Accreditatie	123	Therapiebeleid	104
Aminoglycoside	4	Tonsillitis	8
Anti-DNAse-B	42	Virale dynamiek	108
Antimicrobiele resistentie	76	Virale load	104
Arts-viroloog	38	Virologische monitoring	104
ASD-kit	42	Viroloog	38
AST	42	Vloerbare stikstof	122
Beademingspneumonie	14	Voedselinfectie	119
Beleid	36	Werkgroep Infectiepreventie	22, 53
Biofilm	70	Werkgroep West	52
Biomaterialen	70		
Bioterrorisme	98	Auteursindex	
Bloedbank	36	Voor de auteursindex van het Voorjaarscongres wordt	
Bloedproduct	36	verwezen naar het Supplement bij de negende jaargang.	
Bloedtransfusie	36		
Bloedtransfusiegeneeskunde	58	Auteur	Pagina
Bronchoalveolaire lavage	14	Blans MCA	82
Commentaar	38	Boland G	108
Commissie Laboratoriumonderwijs	51, 123	Bosma F	82
Cytologie	14	Boven CPA van	92
Databank	119	Broek PJ van den	45
Diabetes	117	Bruggeman CA	59
Diagnostiek	100	Bruisten SM	63
DNA-chip	82	Buiting AGM	123
Enquete	34	Dorigo-Zetsma JW	122
Enterovirus	116	Fijen CAP	42
Epidemiologie	63, 68, 119	Fleer A	4, 70
Groep-A-streptokok	8	Galama JMD	113
Hechting	70	Hattum J van	108
Hepatitis	60	Hoek JAR van den	63
Hepatitis A	63, 119	Hoepelman IM	22, 76
Hepatitis B	100, 104	Hollingsworth-Vendel I	42
Hepatitis C	108	Jacobs JA	14
Hepatitis E	68	Kaan JA	3, 34, 123
Hepatitis-B-virus	100, 104	Kabel PJ	51
Hepatitis-E-virus	68	Kerkhof JHTC van den	78
Huisarts	8	Koopmans MPG	119
Immuniteit	63	Kroes ACM	60
Inaugurale rede	45, 86, 113	Madeley CR	38
Index 2000 (8)	25	Man RA de	104
Infectieziektenbestrijding	23	Maraha B	82
Infectieziektewet	78	Marcelis JH	58
Interbrew-Baillet Latour prijs	92	Molenaar M	42
Killercel	113	Mooi F	86
Kinkhoestbehandeling	20	Niesters HGM	104
Kinkhoestdiagnostiek	20	Peeters MF	2, 32, 98
Kinkhoestsymptomatologie	20	Rhenen DJ van	36
Klinisch viroloog	32, 38	Roord JJ	20
Kwantitatieve PCR	82	Roosendaal R	123
Lezersenquête	34	Rothbarth PH	100
Mazelenvirus	115	Ruijs GJHM	8
Meldingsplicht	78	Ruijs WLM	78
Merial-award	23	Soest H van	108
Moleculaire diagnostiek	82	Spijkerman IJB	82
Norwalk	119	Uijtendaal EV	4
Paradox	113	Vennema H	119
Pasgeborene	4	Versteegh FGA	20
Personalia	24, 53, 93, 124	Vreede RW	52
Prezies	52	Waar K	82
Promoties	24, 93, 124	Westra-Meijer C	42
S. pyogenes	8	Westreenen M van	82
SB-ICAAC-Award	22	Wijngaarden JK van	78
Screening	36	Wintermans RGF	99
Streptokok	8, 42	Wolthers KC	82
Streptonase-B	42	Zaaijer HL	68
Symposium	82	Zwart S	8

Richtlijnen voor auteurs

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

In het tijdschrift worden zowel fundamentele als klinische aspecten van de Medische Microbiologie belicht. Daarnaast biedt het plaats voor aankondigingen van promoties e.d., evenementen en mededelingen uit de Vereniging.

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

Door het inzenden van kopij verklaart de auteur:

- dat hij/zij het recht van eenmalige publicatie overdraagt aan het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie
- dat het manuscript niet eerder of te zelfde tijd aart een ander Nederlandstalig tijdschrift is aangeboden
- dat hij/zij ermee akkoord gaat dat de redactie het manuscript ter beoordeling aan adviseurs kan voorleggen
- dat met name genoemde personen die aan het tot stand komen van het manuscript hebben bijgedragen, akkoord gaan met de vermelding van hun naam
- dat hij/zij toestemming heeft verkregen voor het publiceren indien het reeds eerder gepubliceerd materiaal betreft.

Oorspronkelijk onderzoek & overzichtsartikel

Hierbij wordt uitgegaan van maximaal vijf gedrukte tijdschriftpagina’s inclusief samenvatting en literatuurgegevens (maximaal 3000 woorden). Het manuscript moet een Nederlandse en Engelse samenvatting bevatten van elk maximaal 200 woorden. Maximaal vijf tabellen en/of figuren. Maximaal 30 literatuurverwijzingen.

Casuïstiek

Hierbij wordt uitgegaan van drie gedrukte tijdschriftpagina’s, inclusief samenvatting en literatuurgegevens (maximaal 1800 woorden). Het manuscript moet een samenvatting bevatten van maximaal 150 woorden, gevolgd door een beschouwing en een conclusie. Maximaal vijf auteurs noemen. Maximaal drie tabellen en/of figuren. Maximaal 15 literatuurverwijzingen.

Visie

Hierbij wordt uitgegaan van maximaal twee gedrukte tijdschrift-pagina’s (1200 woorden). Geen tabellen en/of figuren. Maximaal vijf literatuurverwijzingen. In de tekst worden referenties met nummer (in superscript) en niet met naam vermeld.

Ingezonden

In deze rubriek worden commentaren, brieven en reacties op artikelen of brieven opgenomen. Er wordt gelegenheid gegeven tot maximaal twee gedrukte tijdschriftpagina’s (1200 woorden) en maximaal vijf literatuurverwijzingen.

Literatuur

De lijst met gerefereerde literatuur aan het eind van het manuscript wordt opgesteld aan de hand van de nummering in de tekst. Elke verwijzing staat op een nieuwe regel: nummer, namen en voorletters (bij meer dan zes auteurs, na de derde auteur: “, et al.”); de volledige titel van de publicatie, naam van het tijdschrift volgens de Index Medicus; jaartal; deelnummer; eerste en laatste bladzijde, zoals hieronder is aangegeven.

Voorbeeld:

- Meijere M de, Mervielde L, Bogaert M. Het nut van antibiotica bij acute keelpijn. Ned Tijdschr Geneeskd 1992;136:2314-8. Voor de overige referentievormen wordt verwezen naar de ‘Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals’.

Bacteriële nomenclatuur

Cursief gedrukte tekst dient in het manuscript als cursief dan wel onderstreept te worden aangegeven. Bij het voor de eerste keer noemen van de bacterienaam dient deze voluit te worden geschreven in cursief. Daarna dient de genusnaam te worden afgekort tot de eerste letter (‘*S. aureus*’, niet ‘*Staph. Aureus*’). Wanneer de naam van het genus op zichzelf wordt gebruikt zoals in ‘er werden stafylokokken gevonden’, of ‘streptokokkeninfectie’ dan wordt niet gecursiveerd. Bij specifiek gebruik van de genusnaam, bv. ‘micro-organismen van het genus *Staphylococcus*’ wordt wel gecursiveerd. Indien dit meervoud wordt gebruikt zoals bij ‘Salmonellae’ wordt niet gecursiveerd, maar kan ook worden gekozen voor ‘salmonella’s’. In samenstellingen wordt aaneengeschreven met een verbindingsstreepje: ‘*Salmonella*-infecties’, ‘*Salmonella*-species’, maar zonder streepje in ‘*Salmonella* spp.’. Medicamenten of farmaca dienen met generieke naam te worden vermeld.

Tabellen en figuren

Deze dienen op een apart vel in viervoud te worden aangeleverd, alsmede (indien beschikbaar) in digitale versie. Figuren dienen vakkundig te zijn vervaardigd, belettering in handschrift wordt niet geaccepteerd. De afbeeldingen moeten zoveel mogelijk contrasterend zijn. Foto’s dienen als glanzende zwart-wit foto’s in viervoud te worden ingezonden, verpakt in karton.

Aan de achterkant van uw illustratiemateriaal moet een etiket zijn geplakt met het nummer van de figuur of foto, de naam van de auteur, en een pijl om de bovenkant van de illustratie aan te geven. Schrijf niet direct op de achterkant van het materiaal; lever bij de figuren en foto’s gaarne de onderschriften op een aparte pagina.

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

Print het manuscript op degelijk A4-papier met 2,5 cm marges en dubbele interlinie.

Begin telkens op een nieuw vel met:

- titelpagina: titel manuscript, titels namen en werkplaats van auteurs, eventuele dankbetuiging, correspondentieadres van een auteur met telefoonnummer (eventuele telefaxnummers), financiers.
- samenvatting in het Nederlands met een werktitel (max. 3 woorden); voeg drie tot tien trefwoorden toe (bv. “Medical Subject Heading (MeSH)” list of *Index Medicus*).
- Engelstalige titel, summary en keywords als boven.

Geef duidelijk aan welke delen van de tekst cursief dienen te worden gedrukt (b.v. namen van micro-organismen).

Zend het origineel en 3 deugdelijke kopieën van het manuscript inclusief tabellen en figuren, samen met de tekst op diskette (bij voorkeur in Word, evt. WordPerfect) naar het Redactiesecretariaat Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie, Postbus 2122, 2400 CC Alphen aan den Rijn.

Elke kopij wordt (tenminste) door de redactie beoordeeld. De redactie behoudt zich het recht voor waar nodig de stijl van het manuscript bij te stellen vanwege de uniformering voor het Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie.

In een separate aanbiedingsbrief dient te worden aangegeven uit hoeveel woorden de tekst, inclusief de referenties, samenvattingen en legenda’s, bestaat. Tevens dienen de adressen van alle auteurs te worden vermeld; zij dienen door ondertekening aan te geven akkoord te gaan met de inhoud van het manuscript en het feit dat het wordt gepubliceerd in dit Tijdschrift.