

NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR MEDISCHE MICROBIOLOGIE

Van de redactie

Artikelen

De behandeling van *Dientamoeba fragilis*-infecties
M.A. Schouten

Laboratoriumdiagnostiek van *Trichomonas vaginalis*
B. Mulder, H. Wilke, M. Homaci

Moleculaire diagnostiek van toxoplasmose
J.J. Verweij, L. van Lieshout

Diagnostiek van *leishmaniasis*
J.E.M. de Steenwinkel, J.J. Verweij, I.C. Gyssens

Malariadiagnostiek voor de dagelijkse praktijk
D. Haddad, T. van Gool

Van alsem tot zeeverzaad: enkele plantaardige antiwormmiddelen van vroeger
B.H. Postma

The need for speed in medical microbiology
N.L.A. Arents, B.M.W. Diederens, R. Klont, R. Rentenaar, N. Vaessen, B. Vlamincx

Proefschrift

Samenvatting proefschrift
H.F.L. Wertheim

Rubrieken

Personalia
Promoties
Agenda

3

advertentie Avelox

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

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

Eindredactie

Mw. J. de Leeuw
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 ntmm@zuidencomm.nl

Oplage

900 exemplaren, 4 x per jaar

Abonnementen

€ 35,00 per jaar voor niet-leden van de NVMM,
Europa € 42,50 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., 2005
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 gedeponereerd bij de Kamer van Koophandel te Amsterdam.

ISSN 0929-0176

Van de redactie 54

Artikelen

De behandeling van *Dientamoeba fragilis*-infecties 55
M.A. Schouten

Laboratoriumdiagnostiek van *Trichomonas vaginalis* 57
B. Mulder, H. Wilke, M. Homaei

Moleculaire diagnostiek van toxoplasmose 59
J.J. Verweij, L. van Lieshout

Diagnostiek van *leishmaniasis* 63
J.E.M. de Steenwinkel, J.J. Verweij, I.C. Gyssens

Malariadiagnostiek voor de dagelijkse praktijk 67
D. Haddad, T. van Gool

Van alsem tot zeverzaad: enkele plantaardige antiwormmiddelen van vroeger 71
B.H. Postma

The need for speed in medical microbiology 75
N.L.A. Arents, B.M.W. Diederens, R. Klont, R. Rentenaar, N. Vaessen, B. Vlaminckx

Proefschrift

Samenvatting proefschrift 79
H.F.L. Wertheim

Rubrieken

Promoties 80
Personalialia 80
Agenda 81

Gezien de achtergrond van de meerderheid van de lezers van het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie*, zal het geen verbazing wekken dat dit themanummer parasitologie vooral ingaat op de diagnostiek van een aantal parasitaire infectieziekten. Allereerst geven Danny Haddad en Tom van Gool vanuit het AMC en Havenziekenhuis een overzicht van de meest risicovolle vorm van parasitologische diagnostiek die in Nederlandse laboratoria wordt uitgevoerd: de klassieke microscopische diagnostiek van malaria. Zij beschrijven in een compleet overzicht van de huidige diagnostische mogelijkheden de plaats hiervan in de dagelijkse Nederlandse praktijk, terwijl tevens het gebruik van de nieuwere antigeentesten met name in de diensturen wordt besproken. Hetzelfde wordt vanuit Rotterdam voor leishmaniasis gedaan in een overzicht van Jurriaan de Steenwinkel, Jacco Verweij en Inge Gyssens.

Jacco Verweij en Lisette van Lieshout geven naar aanleiding van hun ervaringen in het Leids Universitair Medisch Centrum een visie op de toepassing binnen de klinische diagnostiek van moleculaire diagnostiek van toxoplasmose. In het Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek in Enschede is de kweek van *Trichomonas vaginalis* vervangen door moleculaire diagnostiek. Bert Mulder, Hans Wilke en Mohammad Homaei beschrijven hoe deze overgang totstandkwam.

Daarnaast beschrijft Ries Schouten de veelgestelde vraag hoe *Dientamoeba fragilis* in de dagelijkse praktijk in het Rivierenland Ziekenhuis in Ede wordt behandeld. Ben Postma geeft een historisch overzicht van planten met beschreven werkzaamheid tegen wormen, waarbij opvalt dat enkele *Artemisia*-soorten de revue passeren. In Nederland zijn inmiddels enkele semisynthetische derivaten afkomstig van het kruid *Artemisia annua* geregistreerd wegens hun werkzaamheid tegen malaria, dus wellicht geeft dit historisch overzicht ook toekomstperspectief.

Wat de toekomst van de positie van de parasitologie in de Nederlandse opleidingscentra betreft, is het een zorgelijke zaak dat de afgelopen tijd zoveel klassiek getrainde parasitologen met pensioen of VUT zijn gegaan. Dit geldt voor zowel de humane als de veterinaire parasitologie. Morfologische herkenning blijft een belangrijk aspect van de parasitologie en om dat goed te leren is tijd en geduld nodig. Ook het denken in ontwikkelingscycli en interactie met dieren krijgt bij parasieten een grote nadruk en vereist aparte aandacht. Het volgen van een cursus parasitologie is een begin, maar niet voldoende om de parasitologie voldoende te beheersen. Het is daarom van groot belang dat door meerdere academische centra arts-assistenten wordt gestimuleerd om zich in de parasitologie te verdiepen.

Bert Mulder, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Enschede

Titia Kortbeek, Laboratorium voor Infectieziekten Diagnostiek en Perinatale Screening, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

De behandeling van *Dientamoeba fragilis*-infecties

M.A. SCHOUTEN

Over de behandeling van *Dientamoeba fragilis* zijn vrijwel alleen casuïstische mededelingen verschenen in de literatuur. Op basis van de schaarse informatie, het werkingspectrum en het gemak van beschikbaarheid van de diverse middelen komt de auteur tot de volgende keuze: metronidazol als middel van eerste keuze en clioquinol als middel van tweede keuze. Klinische onderzoeken zijn nodig om de effectiviteit van beide middelen te evalueren.

Trefwoorden: *Dientamoeba fragilis*, metronidazol, clioquinol, iodoquinol

Door de invoering van de triple-feces-test (TFT) rapporteren laboratoria steeds vaker *D. fragilis* in de feces-monsters die voor diagnostiek worden aangeboden. Het is de vraag of iedere *D. fragilis*-bevinding tevens de verklaring vormt voor de klachten van de patiënt. Over de betekenis van *D. fragilis*, als veroorzaker van diarree en buikklachten, is de laatste tijd al het een en ander geschreven en inmiddels lijkt deze parasiet zich te scharen in de rij van darmpathogenen. Anderzijds is in eerder onderzoek aangetoond dat er genetisch sterk verschillende *D. fragilis*-stammen bestaan die er morfologisch identiek uitzien.¹ Het is dus heel goed mogelijk dat we te maken hebben met apathogene en pathogene stammen die met behulp van de TFT niet van elkaar kunnen worden onderscheiden, analoog aan *Entamoeba histolytica* en *E. dispar*. De behandeling van infecties, veroorzaakt door *D. fragilis* lijkt nog weinig uitgekristalliseerd. Veelal berust de keuze van het therapeutikum op casuïstiek en zeker niet op gerandomiseerd, dubbelblind, prospectief onderzoek. Om de therapeutische inzetbaarheid van de diverse middelen toch enigszins op hun waarde te kunnen beoordelen wil ik een overzicht geven van datgene wat tot nu toe is gepubliceerd en wat uiteindelijk de therapie van keuze is geworden in Ziekenhuis Rivierenland in Tiel en Ziekenhuis Gelderse Vallei in Ede.

Van het laboratorium...

Canadese onderzoekers hebben MIC-bepalingen voor *D. fragilis* verricht en kwamen uit op MIC 128 µg/l voor iodoquinol, 16 µg/l voor paromomycine, 32 µg/l voor tetracycline en 32 µg/l voor metronidazol.² Het is zeer de vraag in hoeverre deze MIC-waarden kunnen worden gebruikt om een klinische respons te voorspellen. Daarnaast is gebruikgemaakt van een kweekmedium met *Klebsiella pneumoniae* en *Bacteroides vulgatus*; sommige van deze antibiotica zullen zeker ook invloed hebben gehad op genoemde bacteriën en daarmee de MIC-bepaling mogelijk hebben beïnvloed.

...naar de praktijk

Dit brengt ons weer terug naar die paar klinische onderzoeken en *case reports* die bekend zijn. In een overzichtsartikel betreffende *D. fragilis* beschrijven Windsor et al. casuïstiek van de afgelopen decennia.³ In het verleden zijn arsenicumhoudende middelen gebruikt met succesvolle eradicatie als gevolg. In een aantal gevallen ging dit gepaard met ernstige

leverfunctiestoornissen. Daarom ging men kijken naar alternatieven. Tetracycline is beschreven met wisselend succes, en in het begin van de jaren 90 werd metronidazol ingezet voor de behandeling met een succespercentage van 70 procent. In diezelfde periode verschenen diverse *case reports* waarin gebruik wordt gemaakt van doxycycline, erythromycine, paromomycine en iodoquinol. Succesvolle behandelingen worden met name toegeschreven aan iodoquinol. Iodoquinol is in Nederland niet geregistreerd. Het verwante middel clioquinol is niet geregistreerd in Nederland voor de behandeling van *D. fragilis*, maar is wel verkrijgbaar met een speciale verklaring. Gunstige ervaringen met clioquinolbehandeling van *D. fragilis*-infecties bij kinderen zijn in ons land al opgedaan.⁴ Het hoogste succespercentage dat beschreven is in de literatuur betreft de behandeling met secnidazol.⁵ Secnidazol is een nitroimidazolderivaat, en daarmee dus verwant aan metronidazol en tinidazol. Het is in Nederland niet geregistreerd. In de landen waar secnidazol is geregistreerd wordt het gebruikt voor de behandeling van infecties veroorzaakt door amoeben, *Giardia* en *Trichomonas*. Het onderzoek dat het succes van secnidazol-therapie bij *D. fragilis* beschrijft, is verricht in Turkije. In de feces van 400 patiënten met buikklachten en/of diarree werd bij 35 patiënten *D. fragilis* gevonden. Deze patiënten werden behandeld met een eenmalige dosis secnidazol (kinderen tot 15 jaar 30 mg/kg, daarboven 2 g). Van deze 35 mensen waren 34 na een eenmalige gift *D. fragilis*-vrij, bij fecescontrole na één en twee weken. Eén patiënt had een tweede gift nodig om de parasieten te klaren. Ook de klinische respons was goed. De lange halfwaardetijd van secnidazol, ruim 20 uur, verklaart waarom een eenmalige gift werkzaam kan zijn.

Met bovenstaande informatie is het nog steeds lastig om tot een rationele keuze te komen voor de therapie van *D. fragilis*. Nitroimidazolen in zijn algemeenheid lijken goed werkzaam, secnidazol in het bijzonder. Voordeel van deze middelen is dat ze werkzaam zijn tegen meerdere parasieten die darmpathologie kunnen veroorzaken. In de praktijk zien we vaak dat een patiënt zowel *D. fragilis* als *Blastocystis hominis* in de ontlasting heeft. Zonder in te gaan op het nut van de behandeling van *B. hominis* vallen beide protozoa wel binnen het werkingspectrum van een nitroimidazolpreparaat. Clioquinol heeft eenzelfde werkingspectrum wat protozoa betreft, maar laat de anaërobe darmflora ongemoeid. Helaas is clioquinol

voor de behandeling van *D. fragilis* niet geregistreerd in ons land. Om deze redenen hebben we in onze ziekenhuizen gekozen voor metronidazol als middel van eerste keuze en clioquinol als middel van tweede keuze. Door middel van een vergelijkend onderzoek zijn we aan het inventariseren welke van beide middelen tot zowel de beste parasitologische als klinische verbetering leidt.

Voor volwassenen wordt als dosering voor metronidazol aangehouden: driemaal daags 500 mg gedurende tien dagen, en voor clioquinol driemaal daags 250 mg gedurende tien dagen. Voor kinderen hanteren we een dosering voor zowel metronidazol als clioquinol van 15 mg/kg per dag verdeeld over drie doses gedurende tien dagen. *B. hominis*, resistent tegen metronidazol, is beschreven in diverse Zuid-Oost-Aziatische landen. Van *D. fragilis* is dit soort resistentie niet bekend. In de praktijk geef ik wel het advies mee om patiënten die hun *D. fragilis*-infectie waarschijnlijk in Zuid-Oost-Aziatische landen hebben opgelopen, primair te behandelen met clioquinol, mits er natuurlijk geen andere 'tropische' pathogenen zijn gevonden.

Summary

Only case reports have been published in literature about the treatment of Dientamoeba fragilis infections. Based on these few publications, the spectrum of activity and the ease of availability of different antimicrobial drugs the author has come to the following preference: metronidazole as agent of first choice, clioquinol as second. Clinical studies are needed to evaluate the clinical effectivity of both drugs.

Referenties

1. Johnson JA, Clark CG. Cryptic Genetic Diversity in *Dientamoeba fragilis*. Journal of Clinical Microbiology 2000;46:53-4.
2. Chan FT, Guan MX, Mackenzie AM, Diaz-Mitoma F. Susceptibility testing of *Dientamoeba fragilis* ATCC 30948 with iodoquinol, paromomycin, tetracyclin, and metronidazole. Antimicrobiol Agents and Chemotherapy 1994;34(5):1157-60.
3. Windsor JJ, Johnson EH. *Dientamoeba fragilis*: the unflagellated human flagellate. British Journal of Biomedical Science 1999;56:293-306.
4. Bosman DK, Benninga MA, Berg P van de, Kooijman GCL, Gool T van. *Dientamoeba fragilis*: een mogelijk belangrijke oorzaak van persisterende buikpijn bij kinderen. Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde 2004;148(12):575-9.
5. Girginkardesler N, Coskun S, Cuneyt Balcioglu I, Ertan P, Ok UZ. *Dientamoeba fragilis*, a neglected cause of diarrhea, successfully treated with secnidazole. Clinical Microbiology and Infection 2003;9:110-3.

Dr. M.A. Schouten, arts-microbioloog, Ziekenhuis Rivierenland Tiel, Klinisch Laboratorium voor Medische Diagnostiek, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Medisch Microbiologisch Laboratorium, Willy Brandtlaan 10, 6716 RP Ede, tel: 0318-43 43 68, e-mail: schoutenr@zgv.nl.

Bijsluiter

Bijsluiter

Laboratoriumdiagnostiek van *Trichomonas vaginalis*

B. MULDER, H. WILKE, M. HOMAEI

Dit artikel beschrijft de bevindingen bij de overgang van het Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek van kweek via enzyme immuno assay (EIA) en conventionele polymerase chain reaction (PCR) naar de diagnostiek van *Trichomonas vaginalis* met behulp van real-time-PCR. De CBO-richtlijn Seksueel overdraagbare aandoeningen en herpes neonatorum (2002) beveelt laboratoria aan deze methode beschikbaar te maken voor routine-diagnostiek. Sinds begin 2005 wordt real-time-PCR voor *T. vaginalis* als routine-diagnostiek toegepast binnen het laboratorium met als gevolg een significante stijging van het aantal positieve bevindingen ten opzichte van de voorafgaande jaren.

Trefwoorden: *Trichomonas vaginalis*, laboratoriumdiagnose, kweek, EIA, real-time-PCR

Inleiding

T. vaginalis-infectie is wereldwijd de meest voorkomende niet-virale seksueel overdraagbare aandoening. *Trichomonas*-infectie vormt een risicofactor voor de verspreiding van HIV. Bij vrouwen geeft deze infectie aanleiding tot vaginitis met als mogelijke symptomen: overvloedige, hardnekkige fluor met een karakteristieke (vis)geur, jeuk en een brandend gevoel. De klassieke manier om een *T. vaginalis*-infectie vast te stellen is het 'natje' (*wet mount*), waarin bij direct microscopisch onderzoek *Trichomas* als typische, zeer beweeglijke micro-organismen worden gezien. In de huidige praktijk ontbreekt het de behandelend arts veelal aan tijd om dit onderzoek zelf te verrichten. Bovendien is de gevoeligheid van deze test met ongeveer 60 procent veel lager dan de sensitiviteit van de gebruikelijke laboratoriumbepalingen (tabel 1). Dit artikel beschrijft de bevindingen bij de overgang van het Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek van kweek via EIA en conventionele PCR naar de diagnostiek van *T. vaginalis* met behulp van real-time-PCR.

Laboratoriumdiagnostiek

Onderzoek door middel van kweek op *T. vaginalis* in diverse vloeibare en halfvaste media wordt ook in de nieuwste druk van 'de Mandell' nog steeds als gouden standaard voor de laboratoriumdiagnostiek beschouwd.¹ Nadeel van de kweek is dat deze in een periode oplopend tot zeven dagen meerdere keren moet worden bestudeerd op het voorkomen van bewegende micro-organismen, hetgeen arbeidsintensief en tijdrovend is en binnen de laboratoriumlogistiek een aparte plaats inneemt. Bovendien is de kweek alleen mogelijk op de levende parasiet en kan de overleving van *T. vaginalis* en daarmee de sensitiviteit van dit onderzoek, negatief worden beïnvloed door de transporttijd naar het laboratorium vanuit – met name – de eerste lijn. Dit zou het lage percentage positieve kweken vanaf 1999 tot 2004 gedeeltelijk kunnen verklaren (tabel 2).

EIA *T. vaginalis*

In eerste instantie werd in 171 ingestuurde monsters onderzocht of de mogelijk te lage gevoeligheid van de kweek met een antigeendetectie door middel van een EIA voor *T. vaginalis* (TV Screen[®]) kon worden verbeterd. Dit leek het geval te

Tabel 1. Sensitiviteit van onderzoek naar *T. vaginalis*.

TECHNIEK	SENSITIVITEIT (%)
Direct 'nat' preparaat	49-80
Vaginale kweek	85-98
ELISA	77-93
PCR	92-100
Immuunfluorescentie	64-90
Gram-kleuring	< 1
Acridine oranje-kleuring	~ 66
Giemsa-kleuring	35-60
Latex-fixatie	56-90
DNA-probe	86-91
Cervixcytologie	56-70
Mannelijke urethrakweek	80
Mannelijke eerstestraals-urinekwak	68

Bron: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases, 5th Edition, 2000.

zijn aangezien van deze 171 monsters in de *T. vaginalis*-kweek vier (2,3 procent) positief bleken, terwijl in de *T. vaginalis*-EIA 11 monsters (6,4 procent) een positieve uitslag te zien gaven. Dit suggereerde een bijna verdrievoudiging van het percentage positieve uitslagen met een EIA-test. Deze was bovendien in een dagdeel goed uitvoerbaar, waarmee de diagnostiek ten opzichte van de kweek derhalve aanzienlijk zou worden versneld. Voor we besloten de test in ons laboratorium te gebruiken, wilden we deze resultaten eerst met een PCR-onderzoek bevestigen.

Tabel 2. Onderzoeken *T. vaginalis* Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek.

JAAR	N	N POSITIEF (%)
1999	2.133	28 (1,3)
2000	2.059	29 (1,4)
2001	2.065	25 (1,2)
2002	2.331	22 (0,9)
2003	2.547	25 (1,0)
2004	2.802	14 (0,5)

Conventionele PCR *T. vaginalis*

Uit tabel 1 blijkt dat PCR als enige techniek een sensitiviteit van 100 procent benadert. Volgens de huidige inzichten is PCR-diagnostiek de optimale methode voor de detectie van *T. vaginalis*. Een groot onderzoek uitgevoerd in Rotterdam liet zien dat in vergelijking met de PCR, de sensitiviteit van de kweek veel lager was (96 vs. 70 procent).² Vergelijking van kweek en PCR, respectievelijk EIA en PCR leverde het verrassende beeld in tabel 3.

Concluderend kon de schijnbaar grotere sensitiviteit van de EIA niet worden bevestigd indien de conventionele PCR op *T. vaginalis* als gouden standaard werd beschouwd. Uitgaande van PCR als meest gevoelige 'gouden' standaard laat de kweek een hoge sensitiviteit, specificiteit en positief- en negatief-voorspellende waarde zien en heeft de EIA geen meerwaarde als aanvulling of vervanging van de kweek. Een schijnbaar eenvoudige verklaring voor de fout-positieve EIA-uitslagen leek aanvankelijk naar voren te komen uit het resultaat van het microbiologisch onderzoek van de cervixuitstrijken van acht patiënten met PCR-negatieve EIA-positieve uitslagen: zeven van deze acht patiënten bleken een positieve kweek te hebben met *Candida albicans*. Het moge duidelijk zijn dat bij een vrouw met fluorklachten een EIA-onderzoek op *T. vaginalis* niet fout-positief mag worden op grond van *C. albicans*. Wij hebben deze verklaring echter niet met verdere experimenten kunnen bevestigen, zelfs niet door het opnieuw opkweken van *C. albicans*-stammen van de betrokken patiënten en het hertesten van verdunningen hiervan rechtstreeks in de EIA.

Real-time-PCR *T. vaginalis*

Vervolgens rees de vraag of gezien de meerwaarde van het PCR-onderzoek deze techniek zou kunnen worden toegespast voor de routine-diagnostiek van *T. vaginalis*. De CBO-richtlijn *Seksueel overdraagbare aandoeningen en herpes neonatorum* (2002) geeft als antwoord op de vraag: "Wat is de optimale methode om een vaginale *Trichomonas*-infectie vast te stellen?" dat volgens de huidige inzichten PCR de optimale diagnostische methode is voor een infectie met *T. vaginalis* en beveelt laboratoria aan deze methode beschikbaar te maken voor routine-diagnostiek. Hiervoor dient het onderzoek wel op een praktische en snelle manier te kunnen worden uitgevoerd. De conventionele PCR had als nadeel dat de techniek inclusief DNA-opwerking enkele werkdagen kostte. Door het beschikbaar komen van real-time-PCR-onderzoek wordt het ook praktisch mogelijk om de aanbeveling uit deze richtlijn te implementeren. Op deze manier is het mogelijk dit onderzoek in één werkdag uit te voeren. Hiervoor werd een bruikbare real-time-PCR ontwikkeld voor de Taqman®. De primers en probe werden opnieuw ontworpen met behulp van ABI Primer Express 2.0, waarbij naar dezelfde target werd gekeken als in de conventionele PCR.

Tabel 3. Vergelijking van kweek en PCR respectievelijk EIA en PCR.

VERGELIJKING KWEEK EN PCR			VERGELIJKING EIA EN PCR		
	PCR +	PCR -		PCR +	PCR -
Kweek +	4	0	EIA +	3	8
Kweek -	1	68	EIA -	2	60
Sensitiviteit kweek	80%		Sensitiviteit EIA	60%	
Specificiteit kweek	100%		Specificiteit EIA	68%	
Positief-voorspellende waarde kweek	100%		Positief-voorspellende waarde EIA	27%	
Negatief-voorspellende waarde kweek	98,5%		Negatief-voorspellende waarde EIA	97%	

Routine-diagnostiek

Besloten werd om met ingang van 2005 real-time-PCR in te voeren in de routine-diagnostiek van *T. vaginalis* in het Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek. In de eerste helft van 2005 werden in 1.407 monsters 26 positieve uitslagen vastgesteld. In de vergelijkbare periode van 2004 leverde de kweek slechts vijf positieve resultaten op in 1.322 monsters. Hoewel in de laatste jaren een stijgende trend in de hoeveelheid gediagnosticeerde SOA valt waar te nemen, nemen wij aan dat een belangrijk deel van de geconstateerde toename kan worden verklaard uit de verbeterde diagnostische techniek. Bovendien vinden we nu in een half jaar een vergelijkbaar aantal positieven als voorheen in een heel jaar werd gevonden (tabel 1). Uiteraard is het na het eerste halfjaar nog te vroeg voor definitieve conclusies. Langduriger evaluatie van de toepassing van de real-time-PCR voor de diagnostiek van *Trichomonas* is noodzakelijk. Hopelijk zullen spoedig meerdere laboratoria de aanbeveling uit de CBO-richtlijn volgen om moleculaire diagnostiek beschikbaar te maken. Uit de literatuur komt naar voren dat het mogelijk is om de *Trichomonas*-diagnostiek door middel van real-time-PCR, analoog aan de diagnostiek van Chlamydia, ook in urine-monsters uit te voeren.³ Het vervolg van dit onderzoek naar de verbetering van de laboratoriumdiagnostiek van *T. vaginalis* zal eruit bestaan dat in een (multicentrum) onderzoeksverband wordt gekeken naar de meerwaarde van deze vorm van diagnostiek voor de patiënt.

Summary

This article describes the transition of the Laboratory for Medical Microbiology and Public Health from culture via enzyme immuno assay (EIA) and conventional polymerase chain reaction (PCR) to the diagnosis of *Trichomonas vaginalis* with the real-time polymerase chain reaction (PCR). The CBO guideline SOA (2002) recommends laboratories to make this method available for routine diagnosis. Since 2005 real-time PCR for *T. vaginalis* is applied as routine diagnostic method in the laboratory with a subsequent significant increase in the number of positive findings in comparison to earlier years.

Referenties

1. Martin DH, Rein MF. *Trichomonas vaginalis*. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles & Practice of Infectious Diseases, 6th Edition, 2005.
2. Schee C van der, Belkum A van, Zwijgers L, Brugge E van der, O' Neill EL, Luijendijk A, Rijsoort-Vos T van, et al. Improved diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by PCR using vaginal swabs and urine specimens compared to diagnosis by wet mount microscopy, culture, and fluorescent staining. *Journal of Clinical Microbiology* 1999;137:4127-30.
3. Hardick J, Yang S, Lin S, Duncan D, Gaydos C. Use of the Roche Lightcycler instrument in a real-time PCR for *Trichomonas vaginalis* in urine samples from females and males. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:1630-3.

Dr. B. Mulder, arts-microbioloog, H. Wilke, coördinator moleculaire technieken, M. Homaei, analist microbiologie, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Postbus 377, 7500 AJ Enschede, tel: 053-852 63 43, e-mail: B.Mulder@labmicta.nl (correspondentieadres).

Moleculaire diagnostiek van toxoplasmose

J.J. VERWEIJ, L. VAN LIESHOUT

In dit artikel wordt naar aanleiding van ervaringen in het Leids Universitair Medisch Centrum een visie gegeven op de mogelijkheden en valkuilen van moleculaire diagnostiek van toxoplasmose. Sinds begin 2002 wordt in ons laboratorium gebruikgemaakt van real-time-polymerase chain reaction (PCR) op het B1-gen van *Toxoplasma gondii*. Deze PCR wordt gecombineerd met isolatie, amplificatie en detectie van een interne controle. Enkele toepassingen binnen de klinische diagnostiek worden hier gepresenteerd en de resultaten worden vergeleken met voorbeelden uit de literatuur.

Trefwoorden: *Toxoplasma gondii*, real-time-PCR

Introductie

De laboratoriumdiagnostiek van toxoplasmose is voornamelijk gebaseerd op de detectie van specifieke antistoffen. Bij een ongecompliceerde lymfeklier-toxoplasmose of het vaststellen van de immunestatus bij voor het overige gezonde individuen zal de interpretatie van de serologische testen veelal geen problemen opleveren. Veel minder eenduidig is echter de diagnostiek van een congenitale of een oculaire toxoplasmose of een toxoplasmose bij immuungecompromitteerde patiënten. In verschillende publicaties is de detectie van parasiet-specifiek DNA door middel van PCR juist in deze patiëntencategorieën aangemerkt als een zeer bruikbare aanvulling op de serologie. Al vanaf de eerste jaren na de introductie van de PCR is een grote verscheidenheid aan in-huis-PCR's ontwikkeld voor de detectie van *Toxoplasma*-DNA. Door de grote variatie in gebruikte procedures voor isolatie en amplificatie is het vergelijken van de verschillende gepubliceerde onderzoeken echter niet eenvoudig. Daarbij zijn veel van deze PCR's in onderzoekslaboratoria ontwikkeld, waarna de implementatiestap naar de dagelijkse patiëntendiagnostiek nooit werd gemaakt. Ook op ons laboratorium toonden we in het begin van de jaren 90 aan dat het mogelijk was *Toxoplasma*-DNA te detecteren door middel van de toen nog zeer nieuwe techniek, PCR. De afwezigheid van geschikte apparatuur binnen het eigen laboratorium, het gebruik van radioactiviteit en de toen nog beperkte toepassing van de techniek maakte dat destijds niet werd besloten tot implementatie binnen ons laboratorium.

Een van de meest gevreesde problemen in de moleculaire diagnostiek is contaminatie met PCR-producten. In een onderzoek waarbij acht positieve en vier negatieve monsters aan 15 verschillende expertiselaboratoria werden aangeboden voor *Toxoplasma*-PCR bleken vier laboratoria in één of meer negatieve monsters een positief resultaat te vinden.¹ In een ander groot multicentrum-onderzoek, gericht op de diagnostiek van congenitale toxoplasmose, moesten de resultaten van één laboratorium worden uitgesloten van verdere data-analyse vanwege het relatief grote aantal fout-positieven.² Doordat steeds meer diagnostische laboratoria momenteel werken volgens kwaliteitsnormen waarbij de verschillende PCR-stappen in separate ruimtes wordt verricht en bovendien bij gebruik van real-time-PCR met een gesloten systeem wordt gewerkt, is de kans op contaminatie aanzienlijk ver-

kleind. Naast deze ontwikkelingen zijn ook de andere hiervoor genoemde beperkingen niet meer van toepassing binnen ons laboratorium. Hierdoor werd de introductie van een *T. gondii*-specifieke PCR in het laboratorium en verdere evaluatie van de klinische toepasbaarheid opportuun. In dit artikel presenteren we onze eigen ervaringen met de real-time-PCR voor de detectie van *Toxoplasma*-DNA en vergelijken we deze met bevindingen uit de literatuur.

PCR-ontwikkeling

In de literatuur wordt een grote hoeveelheid DNA-targets beschreven voor *Toxoplasma*-specifieke PCR's, waarbij de B1-, P30- en 18S-ribosomaal-DNA-genen relatief het meest worden gebruikt. Een veelbelovend nieuw target is een 529 bp-*Toxoplasma*-specifiek repeat (AF146527).³ In verschillende publicaties zijn deze targets vergeleken in specificiteit en sensitiviteit voor het aantonen van *Toxoplasma*-DNA in klinische materialen.⁴⁻⁸ Dergelijke onderzoeken zijn echter niet eenvoudig te interpreteren omdat sensitiviteit en specificiteit ook in hoge mate afhangen van de grootte van het PCR-product, de primers en detectie-probes en de gebruikte amplificatie- en detectiemethode. De conclusies uit deze publicaties zijn dan ook niet eenduidig.

Binnen ons laboratorium kozen we voor een real-time-PCR gebaseerd op het B1-gen van *T. gondii*.⁹ De assay werd gecombineerd met een PCR voor de detectie van het Phocin Herpes Virus (PhHV) als een interne controle om daarmee de mogelijke aanwezigheid van remmende factoren in het klinische materiaal zichtbaar te maken.¹⁰ De testcondities van deze multiplex-PCR werden geoptimaliseerd, waarbij gebruik werd gemaakt van *Toxoplasma*-DNA, geïsoleerd van *T. gondii*-parasieten die waren verkregen uit geïnfecteerde muizen. PCR werd verder gevalideerd door het testen van DNA geïsoleerd uit diverse klinische materialen waaraan verschillende aantallen *T. gondii*-parasieten werden toegevoegd. Het DNA-equivalent van 0,5 parasiet werd bepaald als de detectielimiet in PCR. Sinds begin 2002 is deze PCR binnen ons ziekenhuis beschikbaar voor de diagnostiek van toxoplasmose bij die patiënten bij wie door middel van serologisch onderzoek geen uitsluitsel kan worden gegeven.

Congenitale toxoplasmose

Relatief veel onderzoeken zijn gepubliceerd over de toepassing van *Toxoplasma*-PCR in de diagnostiek van congenitale infecties. In het al eerder genoemde multicentrum-onderzoek werd een sensitiviteit gevonden variërend tussen de verschillende laboratoria van 40 tot 100 procent en een specificiteit van 91 tot 100 procent van *Toxoplasma*-PCR op amnionvloeistof.² Het tijdstip van seroconversie in de zwangerschap bleek daarbij ook nog van invloed op de diagnostische eigenschappen van de PCR. Hoe later in de zwangerschap seroconversie had plaatsgevonden, des te hoger de positief-voorspellende waarde en des te lager de negatief-voorspellende waarde. De variabiliteit in sensitiviteit en specificiteit van *Toxoplasma*-PCR op amnionvloeistof tussen verschillende laboratoria laten de auteurs nogmaals zien in een overzichtstabel waarin 11 kleinere onderzoeken worden samengevat. Geconcludeerd kan worden dat een positief of negatief resultaat van een *Toxoplasma*-PCR van een groot aantal factoren afhangt. Bij de interpretatie van de resultaten dient hiermee terdege rekening gehouden te worden.

Met behulp van *real-time*-PCR is het mogelijk de hoeveelheid DNA te kwantificeren. Zo toonden Romand et al. met gebruik van een *real-time*-PCR aan dat grotere hoeveelheden *Toxoplasma*-DNA in de amnionvloeistof een grotere kans geven op ernstige afwijkingen bij het ongeborn kind. Daarmee lieten ze zien dat niet alleen het tijdstip van de infectie binnen de zwangerschap bepalend is voor de mate van de afwijkingen, maar ook de hoeveelheid parasieten in de amnionvloeistof.¹¹ In de Nederlandse setting is de ervaring met de vroegtijdige diagnostiek van congenitale toxoplasmose vrij beperkt. Dit komt mede doordat zwangere vrouwen in Nederland niet standaard worden gescreend voor toxoplasmose, waardoor een dergelijke diagnostische vraag zich veelal pas aandient na het constateren van afwijkingen bij een foetus of pasgeborene. In veel gevallen biedt serologisch onderzoek daarbij voldoende zekerheid. Het ontbreken van zowel IgG als IgM bij het kind sluit een congenitale infectie uit, mits geen behandeling heeft plaatsgevonden, terwijl de aanwezigheid van IgM juist een hoge positief-voorspellende waarde heeft. Indien slechts IgG wordt aangetoond, is nader onderzoek noodzakelijk. In die gevallen kan aanvullend serologisch onderzoek worden uitgevoerd, waarbij kan worden gedacht aan testen die met een hogere gevoeligheid IgM kunnen aantonen, het meten van de IgA-respons, of het vergelijken van de immunrespons van moeder en kind door middel van immunoblot. Wellicht dat ook PCR in voorkomende gevallen additionele informatie kan geven.

Enige tijd geleden waren wij betrokken bij een ernstige klinische verdenking op congenitale toxoplasmose bij een zwangerschap van 28 weken; een intra-uteriene vruchtdood volgde twee weken later. In serum van het navelstrengbloed werd een hoge IgG- en IgM-titer gevonden. Vervolgens werd retrospectief bij de moeder een IgG-titerstijging en een hoge IgM-titer tijdens deze zwangerschap aangetoond. Met behulp van *real-time*-PCR toonden we retrospectief ook *Toxoplasma*-DNA aan in het serum van het navelstrengbloed. Om de klinische toepasbaarheid van deze PCR op serum van zwangeren en pasgeborenen voor de diagnostiek van congenitale toxoplasmose te bepalen is verdere evaluatie noodzakelijk.

Oogtoxoplasmose

Tot recentelijk werd chorioretinitis veroorzaakt door *T. gondii* vooral gezien als een late manifestatie van een congenitaal verworven toxoplasmose. Momenteel zijn er echter steeds meer aanwijzingen dat oogtoxoplasmose ook kan worden veroorzaakt door een acute infectie. De laboratoriumdiagnostiek van een oogtoxoplasmose is notoir problematisch, mede hierdoor wordt de diagnose voornamelijk op klinische gronden gesteld. Villard et al. vergeleken verschillende diagnostische methoden bij 19 patiënten met een klinische *Toxoplasma*-chorioretinitis en 68 controlepatiënten met andere oogafwijkingen. Detectie van lokale IgG-productie door vergelijking van antistof-titers in oogkamervocht en serum (Goldman Witmer-coëfficiënt) en vergelijking van antistof-productie door middel van immunoblot toonden in dit onderzoek een sensitiviteit van respectievelijk 63 en 53 procent. De PCR verricht op oogkamervocht was slechts positief in vijf van 18 patiënten, maar was in tegenstelling tot de serologische testen wel 100 procent specifiek. Indien deze drie technieken werden gecombineerd, werd een sensitiviteit van 83 procent bereikt.¹² In een ander onderzoek werd in bloedmonsters van vijf patiënten met een oogtoxoplasmose een vergelijking gemaakt tussen *real-time*-PCR's gebaseerd op verschillende *targets*. In de bloedmonsters van deze vijf patiënten werd *Toxoplasma*-DNA aangetoond met een *real-time*-PCR op het B1-gen.¹³ Het aantonen van *Toxoplasma*-DNA in serum of plasma blijkt hier een zeer waardevolle aanvulling, maar de patiëntengroep in dit onderzoek is klein en aanvullend onderzoek is zeker nodig. Binnen ons laboratorium hebben we tot op heden weinig ervaring met de moleculaire diagnostiek van oogtoxoplasmose en werden nog geen bewezen gevallen door middel van PCR gediagnosticeerd.

Immuungecompromitteerde patiënten

Met name bij HIV-geïnfecteerden die weinig CD4-cellen hebben, is encefalitis de karakteristieke presentatie van toxoplasmose. Bij deze groep patiënten betreft het voornamelijk reactivatie van een latente infectie, waardoor serologisch onderzoek meestal weinig uitkomst biedt. Net als bij oogtoxoplasmose blijkt bij *Toxoplasma*-encefalitis de additionele verrichting van PCR op serum tot een hogere gevoeligheid te leiden.¹⁴ Recentelijk deden wij mee aan een onderzoek in Malawi naar de etiologie van acute neurologische uitvalsverschijnselen, al dan niet in relatie tot een HIV-infectie. Bij de 104 gehospitaliseerde patiënten werd een *Toxoplasma*-seroprevalentie gevonden van 20 procent. Bij één van de HIV-geïnfecteerden toonden we *Toxoplasma*-specifieke IgG aan, zowel in serum als in liquor. In deze beide materialen kon met *real-time*-PCR tevens *Toxoplasma*-DNA worden aangetoond, terwijl de PCR negatief was bij de overige patiënten met specifiek IgG in het serum. Na *Toxoplasma*-therapie herstelde de patiënt zich spoedig.¹⁵

Een andere risicogroep voor toxoplasmose vormen de transplantatiepatiënten. In deze groep uit de infectie zich vaker systemisch, waarbij verschillende organen zoals longen en hart kunnen worden aangedaan. Niet lang na de technische validatie van onze *Toxoplasma*-PCR werden wij geconfronteerd met een levertransplantatiepatiënt die zich binnen een maand na de transplantatie presenteerde met onder meer ernstige longklachten. Vlak voor het overlijden van deze

patiënt werden bij microscopisch onderzoek *Toxoplasma*-parasieten aangetoond in een bronchusspoelsel. De PCR bleek positief zowel op dit spoelsel als op het obductiemateriaal van lever, long, milt en pleura. Vanzelfsprekend werd de vraag gesteld of we met behulp van serologie deze gedissemineerde toxoplasmose niet in een eerder stadium hadden kunnen diagnosticeren. Zowel voor de transplantatie als vlak voor het overlijden van de patiënt waren echter geen *Toxoplasma*-specifieke antistoffen aantoonbaar. Vervolgens werd PCR retrospectief uitgevoerd op plasmamonsters, afgenomen in de periode van voor de transplantatie tot vlak voor het overlijden. *Toxoplasma*-DNA kon al worden aangetoond in een plasmamonster dat een week voor het overlijden van deze patiënt werd afgenomen, in de twee daarop volgende plasmamonsters werd een stijgende hoeveelheid *Toxoplasma*-DNA gezien (tabel 1).

Tabel 1. Resultaten van *Toxoplasma*-real-time-PCR op plasma van een patiënt voor en na levertransplantatie.

AFNAME-DATUM	CT-TOXO-PCR	TOXOPLASMA/ML	
01-05-2002	n.a.	-	Serologie negatief
30-10-2002	n.a.	-	Levertransplantatie
14-11-2002	n.a.	-	
18-11-2002	n.a.	-	
21-11-2002	n.a.	-	Heropname ziekenhuis vanwege complicaties
26-11-2002	n.a.	-	
02-12-2002	n.a.	-	
05-12-2002	40,04	120	
09-12-2002	36,12	1.800	
11-12-2002	34,16	7.200	Serologie negatief
12-12-2002			BS en overlijden

n.a. = niet aantoonbaar
 Ct = *Threshold cycle*
 BS = bronchusspoelsel

Twee jaar later presenteerde zich bij ons een andere patiënt met luchtwegklachten. Bij deze patiënt was bij opname een HIV-infectie geconstateerd met zeer lage CD4-aantallen. In het Giemsa-preparaat van het broncho-alveolaire lavage (BAL)-materiaal, gemaakt voor *Pneumocystis*-diagnostiek, werden bij een tweede microscopische beoordeling *Toxoplasma*-parasieten gezien. Inmiddels was ook *Toxoplasma*-PCR op het materiaal verricht en positief bevonden. In het serummonster dat dezelfde dag als het BAL werd afgenomen, was ook *Toxoplasma*-DNA aantoonbaar. Na het starten van de therapie daalde de DNA-load in het serum spoedig en was na 11 dagen niet meer detecteerbaar (tabel 2). Helaas was van deze patiënt geen serum of plasma beschikbaar uit de periode voordat de HIV-diagnose werd vastgesteld.

Deze bevindingen deden ons vermoeden dat pulmonale toxoplasmose mogelijk vaker voorkomt, maar bij microscopisch onderzoek eenvoudig kan worden gemist, zelfs indien voor de *Pneumocystis*-diagnostiek Giemsa-preparaten worden bekeken. Om dit te onderzoeken werd *Toxoplasma*-PCR verricht op 194 BAL-monsters die waren verzameld door zowel

Tabel 2. Resultaten van de *Toxoplasma*-real-time-PCR op serum van een HIV-positieve patiënt met een pulmonale toxoplasmose voor en na therapie.

AFNAME-DATUM	CT-WAARDE	TOXOPLASMA/ML	
21-10-2004	33,91	9.400	Diagnose en start therapie
22-10-2004	31,16	68.700	
25-10-2004	34,08	8.280	
25-10-2004	35,17	3.780	
27-10-2004	38,28	400	
02-11-2004	n.a.	-	
09-11-2004	n.a.	-	

Ct = *Threshold cycle*

het LUMC als de universitair medische centra van Maastricht en Nijmegen in het kader van een vergelijkend multicentrum-onderzoek naar *Pneumocystis jirovecii*-PCR. In eerste instantie waren, bij microscopisch onderzoek van dit materiaal, in geen van de monsters *Toxoplasma*-parasieten gevonden. In vier monsters – van twee beenmergtransplantatie (BMT) en twee aids-patiënten – werd echter wel *Toxoplasma*-DNA aangetoond. Bij één van de patiënten werden bij microscopisch heronderzoek alsnog *Toxoplasma*-parasieten gezien in het oorspronkelijke Giemsa-preparaat. Bij een andere patiënt werden ook na herbeoordeling van de preparaten geen parasieten gezien, van de twee overige patiënten waren de preparaten niet meer beschikbaar. Van één van de positieve BMT-patiënten was ook nog serum beschikbaar van dezelfde periode. Ook daarin konden wij *Toxoplasma*-DNA aantonen.

Recentelijk werd aangetoond dat het screenen van serum-monsters bij BMT-patiënten zinvol kan zijn in een multicentrum-onderzoek waarbij 106 BMT-patiënten gedurende zes maanden werden gevolgd.¹⁶ Gedurende de follow-up-periode werd bij 16 patiënten in één of meerdere serummonsters *Toxoplasma*-DNA aangetoond. Vier van deze 16 patiënten ontwikkelden *Toxoplasma*-encefalitis, één patiënt pulmonale toxoplasmose en één gedissemineerde toxoplasmose. De tien overige patiënten vertoonden geen symptomen. Wellicht even belangrijk is dat geen van de 90 overige patiënten bij wie *Toxoplasma*-DNA niet kon worden aangetoond toxoplasmose ontwikkelde. De absolute hoogte van de parasitaire load bleek geen indicator te zijn voor het ontstaan van klinische verschijnselen. Bij individuele patiënten bleek echter wel een correlatie te bestaan tussen een stijgende DNA-load en de progressie van de symptomen.^{16,17} Uit deze resultaten blijkt dat het vervolgen van de *Toxoplasma*-load in serum door middel van *real-time*-PCR voor deze patiëntencategorie een belangrijk diagnostisch hulpmiddel kan zijn.

Conclusie

Zowel op basis van recente publicaties als uit onze eigen bevindingen concluderen wij dat het aantonen van *Toxoplasma*-DNA in diverse klinische materialen een belangrijke diagnostische aanvulling kan geven, met name in die patiëntencategorieën waarbij serologische diagnostiek tekortschiet. Zo blijkt de aanwezigheid van *Toxoplasma*-DNA in serum of plasma bij *Toxoplasma*-chorioretinitis en het vervolgen van de *Toxoplasma*-load in serum of plasma van immuuncompromitteerde patiënten veelbelovend te zijn. Het vergelijken

en eenduidig interpreteren van de gepubliceerde resultaten in relatie tot de klinische presentatie blijft echter moeizaam vanwege de grote verscheidenheid aan gebruikte procedures voor DNA-isolatie en -amplificatie. Verdere standaardisatie van methoden en het uitwisselen van klinische materialen tussen laboratoria zouden hierin verbetering kunnen brengen. Een positieve ontwikkeling is dat dit jaar door de QCMD (*Quality Control for Molecular Diagnostics*) een tweede pilot-onderzoek zal worden verricht met een kwaliteitscontrole-panel voor de moleculaire diagnostiek van toxoplasmose. Hoewel onze eigen ervaring zich tot op heden beperkt heeft tot enkele specifieke cases, heeft de moleculaire toxoplasmose-diagnostiek een duidelijke plaats gekregen binnen ons klinisch microbiologisch laboratorium.

Summary

In this paper, the authors give their view on the use of molecular methods in the diagnosis of toxoplasmosis based on in-house experience and a review of the literature. Since 2002, a real-time polymerase chain reaction (PCR) has been used in our laboratory using the B1-gen of Toxoplasma gondii as a target. Isolation, amplification and detection of an internal control for the detection of inhibition are included in the assay. Application of this PCR in selected cases within the clinical setting of our academic hospital are presented and compared with examples from literature.

Referenties

- Pelloux H, Guy E, Angelici MC, Aspöck H, Bessieres MH, Blatz R, et al. A second European collaborative study on polymerase chain reaction for *Toxoplasma gondii*, involving 15 teams. *Fems Microbiology Letters* 1998;165:231-7.
- Thalib L, Gras L, Romand S, Prusad A, Bessierese MH, Petersen E, et al. Prediction of congenital toxoplasmosis by polymerase chain reaction analysis of amniotic fluid. *Bjog-An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2005;112:567-74.
- Homan WL, Vercaemmen M, Debraekeleer J, Verschuere H. Identification of a 200- to 300-fold repetitive 529 bp DNA fragment in *Toxoplasma gondii*, and its use for diagnostic and quantitative PCR. *Int J Parasitol* 30 PY = 2000:69-75.
- Jones CD, Okhravi N, Adamson P, Tasker S, Lightman S. Comparison of PCR detection methods for B1, P30, and 18S rDNA genes of *T. gondii* in aqueous humor. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2000;41:634-44.
- Filiseti D, Gorcii M, Pernot ME, Villard O, Candolfi E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis: Comparison of targets for detection of *Toxoplasma gondii* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:4826-8.
- Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *Bmc Infectious Diseases* 2003;3.
- Chabbert E, Lachaud L, Crobu L, Bastien P. Comparison of two widely used PCR primer systems for detection of *Toxoplasma* in amniotic fluid, blood, and tissues. *Journal of Clinical Microbiology* 2004;42:1719-22.
- Buchbinder S, Blatz R, Rodloff AC. Comparison of real-time PCR detection methods for B1 and P30 genes of *Toxoplasma gondii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2003;45:269-271.
- Lin MH, Chen TC, Kuo TT, Tseng CC, Tseng CP. Real-time PCR for quantitative detection of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Clinical Microbiology* 2000;38:4121-5.
- Niesters HG. Clinical virology in real time. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 3):S3-12.
- Romand S, Wallon M, Franck J, Thulliez P, Peyron F, Dumon H. Prenatal diagnosis using polymerase chain reaction on amniotic fluid for congenital toxoplasmosis. *Obstetrics and Gynecology* 2001;97:296-300.
- Villard O, Filiseti D, Roch DF, Garweg J, Flament J, Candolfi E. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay, immunoblotting, and PCR for diagnosis of toxoplasmic chorioretinitis. *Journal of Clinical Microbiology* 2003;41:3537-41.
- Contini C, Seraceni S, Cultrera R, Incorvaia C, Sebastiani A, Picot S. Evaluation of a Real-time PCR-based assay using the lightcycler system for detection of *Toxoplasma gondii* bradyzoite genes in blood specimens from patients with toxoplasmic retinochoroiditis. *International Journal for Parasitology* 2005;35:275-83.
- Joseph P, Calderon MM, Gilman RH, Quispe ML, Cok J, Ticona E, et al. Optimization and evaluation of a PCR assay for detecting toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. *Journal of Clinical Microbiology* 2002;40:4499-4503.
- Kumwenda JJ, Mateyu G, Kampondeni S, Dam AP van, Lieshout L van, Zijlstra EE. Differential diagnosis of stroke in a setting of high HIV prevalence in Blantyre, Malawi. *Stroke* 2005;36:960-4.
- Martino R, Bretagne S, Einsele H, Maertens J, Ullmann AJ, Parody R, et al. Early detection of *Toxoplasma* infection by molecular monitoring of *Toxoplasma gondii* in peripheral blood samples after allogeneic stem cell transplantation. *Clinical Infectious Diseases* 2005;40:67-78.
- Costa JM, Pautas C, Ernault P, Foulet F, Cordonnier C, Bretagne S. Real-time PCR for diagnosis and follow-up of toxoplasma reactivation after allogeneic stem cell transplantation using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *J Clin Microbiol* 2000;2929-32.

Met dank aan drs. K. Templeton en drs. J. Gooskens van de afdeling Medische Microbiologie van het Leids Universitair Medisch Centrum in Leiden, dr. I.J.B. Spijkerman van het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis in Amsterdam, dr. J. Jacobs van het Academisch Ziekenhuis Maastricht en dr. P. Beckers van het Universitair Medisch Centrum St Radboud in Nijmegen.

Dr. J.J.Verweij, onderzoeker-parasitoloog, dr. L. van Lieshout, onderzoeker-parasitoloog, Leids Universitair Medisch Centrum, afdeling Medische Microbiologie en afdeling Parasitologie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden, e-mail: J.J.Verweij@lumc.nl (correspondentieadres).

Diagnostiek van leishmaniasis

J.E.M. DE STEENWINKEL, J.J. VERWEIJ, I.C. GYSSENS

De diagnostiek van *Leishmania*-infecties blijkt vaak niet eenvoudig. De combinatie van epidemiologische gegevens en klinische presentatie is de eerste stap bij het stellen van een mogelijke diagnose. De hierna volgende laboratoriumdiagnostiek berust traditioneel op microscopisch onderzoek, eventueel aangevuld met een kweek. In toenemende mate blijken moleculaire technieken, door de grote sensitiviteit en specificiteit, de plaats van microscopie als gouden standaard over te nemen. Combinatie van serologie en moleculaire technieken kunnen langdurig microscopisch onderzoek vervangen en bovendien kan direct een verdere differentiatie van het speciescomplex worden verricht. In de endemische gebieden zullen vooral de verder ontwikkelde, goedkopere serologische testen een belangrijke rol spelen in de diagnostiek van viscerale leishmaniasis.

Trefwoorden: *Leishmania*

Inleiding

Leishmaniasis komt momenteel in 88 landen (waarvan 72 ontwikkelingslanden) endemisch voor. Omdat slechts een beperkt aantal van die landen een meldingsplicht heeft, is het moeilijk om het exacte aantal *Leishmania*-infecties vast te stellen. De *World Health Organization* (WHO) schat de incidentie op 2 miljoen, waarvan ongeveer een kwart visceraal en driekwart (muco)cutaan. De impact van dit groot aantal ziektegevallen is enorm. In 2001 kwamen naar schatting 59.000 mensen om het leven als gevolg van viscerale leishmaniasis (VL).¹

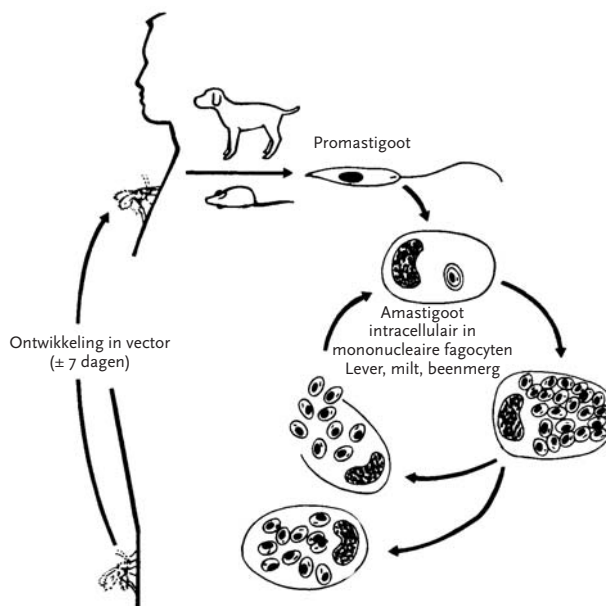
Leishmaniasis wordt veroorzaakt door een groep van intracellulaire protozoën. De parasiet wordt overgedragen via een vector, de *Phlebotomus*-species in de 'oude wereld' en de *Lutzomyia*-species in de 'nieuwe wereld' (figuur 1). Als een gastheer is geïnfecteerd met een species van het viscerale type, kan de parasiet zich hematogeen verplaatsen naar het beenmerg, de milt en de lever. Daar zorgt het invasieve karakter van de parasiet voor een spleno- en hepatomegalie en heeft de infectie een remmende werking op het immuunsysteem. Hierdoor kan de gastheer immuungecompromiteerd raken. Daarbij kunnen ook afwijkingen in de hematopoiesis optreden, waardoor trombocytopenie, leukocytopenie en anemie kunnen ontstaan. Zonder adequate behandeling heeft dit de dood tot gevolg. In India en Sudan wordt na behandeling van sommige patiënten een post-kala-azar dermale leishmaniasis (PKDL) gezien, wat een langere en intensieve behandeling tot gevolg heeft.²

Cutane leishmaniasis (CL) heeft vaak een milder beloop, zal bijna altijd spontaan verdwijnen en is zeer zelden lethaal. In een aantal gevallen kan CL echter evolueren naar een mucocutane vorm, waarbij de slijmvliezen geïnfecteerd raken. Dit kan een veel langduriger ziektebeeld met zich meebrengen en kan leiden tot ernstige afwijkingen in het aangezicht.

De parasieten hebben met elkaar gemeen dat ze alle tot de heterogene groep van het *Leishmania*-genus behoren. Hoewel ze tot dezelfde familie behoren, kunnen ze een zeer divers klinisch beeld geven. Onderscheid wordt gemaakt naar het land van herkomst en daarbij verdeeld in 'nieuwe wereld'-

of 'oude wereld'-leishmaniasis. Ook wordt wel een onderverdeling gemaakt naar klinische presentatie: cutaan, mucocutaan (espundia) en visceraal (kala-azar). Daarnaast is er een verdeling in verschillende soorten en ondersoorten op grond van biochemische en/of genetische eigenschappen. In tabel 1 wordt een overzicht gegeven van de drie mogelijke manieren van indeling. In de recente literatuur wordt het *Leishmania*-genus verdeeld in de subgenera *Leishmania* en *Viannia*. In dit laatste subgenus zijn onder andere het *Leishmania braziliensis*- en *Leishmania guyanensis*-species (complex ondergebracht, dus *Leishmania Viannia braziliensis*). De overige voor de mens belangrijke species bevinden zich in het subgenus *Leishmania*.³

Figuur 1. Ontwikkelingscyclus van de *Leishmania*-parasiet (overgenomen uit: Medische Parasitologie, Handleiding bij de laboratoriumdiagnostiek; p. 38, A. Polderman en A. Rijpstra, copyright 1999, met toestemming van Bohn Stafleu Van Loghum).



Tabel 1. Overzicht van de drie verschillende vormen van indeling (geografisch, klinisch en op species) van de meest voorkomende leishmaniasis.

GEOGRAFISCH	KLINIEK	SPECIESCOMPLEX
<i>Oude wereld</i>		
China, Pakistan, India en Oost-Afrika	Visceraal (cutaan)	<i>L. donovani</i>
Mediterraan, Midden-Oosten en Zuidwest-Azië	Visceraal (cutaan)	<i>L. infantum</i>
Midden-Oosten, Centraal-Azië en Afrika	Cutaan	<i>L. major</i>
Midden-Oosten, Centraal/West-Azië en Noord-Afrika	Cutaan (visceraal)	<i>L. tropica</i>
Ethiopië, Kenia en Jemen	Cutaan (diffuus)	<i>L. aethiopica</i>
<i>Nieuwe wereld</i>		
Centraal/Zuid-Amerika	Visceraal	<i>L. chagasi</i>
Guyana en Suriname	Cutaan	<i>L. guyanensis</i>
Centraal/Zuid-Amerika	Cutaan (diffuus)	<i>L. mexicana</i>
Centraal/Zuid-Amerika	Cutaan/mucocutaan	<i>L. braziliensis</i>

Klinische presentatie

Epidemiologische kennis van leishmaniasis is een belangrijk aanknopingspunt in de klinische diagnose. Bij een patiënt met koorts en malaiseklachten in combinatie met een specifieke reisanamnese behoort VL in de differentiaaldiagnose te staan. Ook frequent voorkomende ziektes, zoals malaria, tyfus, tuberculose en schistosomiasis, kunnen zich echter op deze wijze presenteren. Lichamelijk onderzoek kan een aanwijzing geven in de vorm van een vergrote milt of lever, die kan passen bij een VL. Bij standaard laboratoriumonderzoek kunnen afwijkingen in de aanmaak van witte/rode bloedcellen worden gezien en daarbij passende pancytopenie. In tegenstelling tot veel andere parasitaire infecties wordt er bij een VL vaak een verlaagd aantal eosinofielen gezien. Tevens worden door de activatie van de polyklonale B-lymfocyten hypergammaglobulinemie en mogelijk circulerende reumafactoren gemeten. Dit kan in een later stadium leiden tot glomerulonefritis met als gevolg nierinsufficiëntie. Geen van deze bevindingen zijn echter specifiek voor een *Leishmania*-infectie waardoor bij blijvende verdenking vervolgonderzoek is geïndiceerd.

Leishmania Skin Test

Een oudere, eenvoudige diagnostische test is de Montenegrohuidtest of *Leishmania* Skin Test (LST). Deze door Melo et al. beschreven test maakt gebruik van het aantonen van antistoffen. Door een intradermale toediening van een mix van promastigoten (in fenol gedood) of eiwitten van de promastigoten wordt de mate van induratie bepaald. Dit wordt vervolgens vergeleken met een Phenol-NaCl-controle. Indien de controle negatief is en de diameter van de induratie meer dan 5 millimeter bedraagt, is de uitslag positief. In een vergelijkend onderzoek door Faber et al. wordt een sensitiviteit van 87 procent en een specificiteit van 57 procent genoemd, wat overeenkomt met de overige literatuur.

In de verschillende delen van de wereld worden verschillende mengsels van *Leishmania*-species gebruikt. Door het toepassen van verschillende soorten promastigoten wordt een hogere sensitiviteit verkregen, maar gaat een deel van de specificiteit verloren. Naast de kruisreactiviteit met de verschillende *Leishmania*-species is er ook kruisreactiviteit met tuberculose beschreven.

De LST kan bij cutane en mucocutane vormen worden toegepast, maar niet bij een actieve VL, omdat daar geen verhoogde specifieke T-celproductie is. Een andere beperking is dat met een LST geen onderscheid kan worden gemaakt tussen een doorgemaakte en een actieve infectie.^{4,7}

Laboratoriumonderzoek

Bij de verdenking op CL wordt een biopt genomen uit de rand van de laesie, nog net in het gezonde weefsel. Hiervan worden depreparaten of histologische coupes gemaakt en na Giemsa- of Hematoxyline/Eosine(HE)-kleuring microscopisch beoordeeld. Preparaten kunnen ook worden gemaakt van weefselvocht uit de ulcusrand dat met een injectienaald wordt opgezogen (eventueel na van tevoren een kleine hoeveelheid fysiologisch zout te hebben ingebracht).

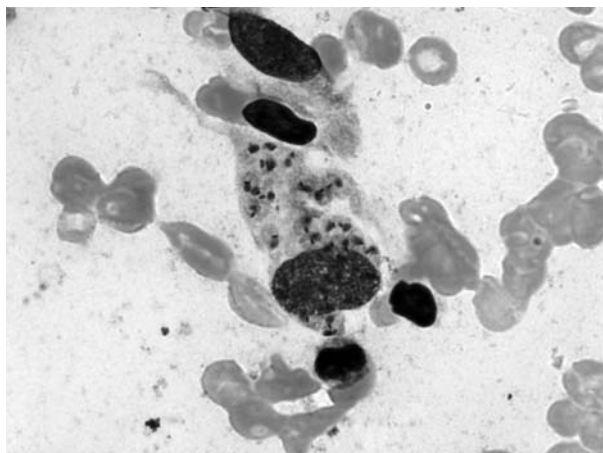
Bij verdenking op VL kan microscopisch onderzoek worden verricht op preparaten van beenmerg of miltaspiraats. Afhankelijk van de omstandigheden zou echter eerst een serologie en/of *polymerase chain reaction* (PCR) van een bloedmonster kunnen worden overwogen. De toepasbaarheid van serologie en moleculaire diagnostiek bij een verdenking op CL of VL worden hierna besproken.

Microscopie

Na kleuring van de preparaten met Giemsa of bij histologische coupes ook met May-Grünwald, Wright's of HE, worden de preparaten microscopisch beoordeeld op aanwezigheid van *Leishmania*-amastigoten (figuur 2). In de histologische coupes wordt bovendien gekeken naar ontstekingsinfiltratie in de vorm van eosinofielen, plasmocyten en/of granulocyten. De parasieten hebben een karakteristieke grote, donkerpaarse en excentrische kern en een blauw gekleurd cytoplasma. Tevens hebben ze een typische kleine, rood gekleurde mitochondriale structuur, die bekend staat als een kinetoplast. De gerapporteerde sensitiviteit van microscopie is zeer divers; bijvoorbeeld bij CL 50-70 procent voor het aantonen van amastigoten en 70-100 procent voor het identificeren van granulomateuze veranderingen met of zonder aangetoonde parasieten in een HE-kleuring.⁵ Deze grote spreiding van de sensitiviteit kan worden verklaard door verschillen in de onderzoeksopzet en doordat het aantonen van de verschillende species wellicht met wisselend succes gebeurt. Bovendien is de gevoeligheid van microscopisch onderzoek vanzelfsprekend afhankelijk van de tijd en moeite die aan het bekijken van het objectglaasje wordt besteed. De verschillende *Leishmania*-species zijn morfologisch niet te onderscheiden. Voor een specifieke soortbepaling is aanvullend moleculair of biochemisch onderzoek noodzakelijk.

Beschreven is het gebruik van fluorescerende polyklonale of monoklonale (genusspecifieke) antistoffen, die de sensitiviteit en specificiteit van de microscopie kunnen verbeteren.³ Deze fluorescerende antistoffen zijn echter niet commercieel beschikbaar.

Figuur 2. Een Giemsa-kleuring van een deppreparaat met daarin *Leishmania*-amastigoten (met dank aan E.A.T. Brienen, afdeling Parasitologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden).



Microbiologische kweek

In het algemeen wordt voor de kweek een Novy-MacNeal-Nicolle (NHN)-medium gebruikt dat 20-30 procent konijnenbloed bevat. Ook wordt soms Schneider's insect-medium gebruikt, verrijkt met 10 procent v/v foetal calf-serum.⁴ De kweken worden geïncubeerd bij 26-28 °C en (in het Erasmus MC) na zes dagen overgeënt. De oorspronkelijke kweken en de overentingen worden regelmatig beoordeeld op groei van *Leishmania*-parasieten met behulp van natieve preparaten. Bij een ernstige infectie duurt het nog enige dagen voordat de kweken positief worden, bij een lage parasitaire load kan dit enkele weken duren. Daarom blijven de kweken minimaal vier weken staan. Tevens is er literatuur over het inoculeren van *Leishmania* in dieren (zoals de goudhamster) ter gebruik als groeimedium. In deze tijd kan dit echter als obsoleet worden beschouwd.

Immunodiagnostiek

Serologie is vooral bij VL een belangrijk diagnostisch hulpmiddel. De rol van immunodiagnostiek bij mucocutane leishmaniasis is beperkter, alhoewel in recente publicaties ook bij (muco)cutane vormen zeer goede resultaten worden gerapporteerd.^{4,5} De meest gebruikte technieken voor het aantonen van antistoffen zijn: *direct agglutination test* (DAT); *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA); *fast agglutination screening test* (FAST) en *indirect fluorescence antibody test* (IFAT). In DAT wordt serum van de patiënt met in formaline gefixeerde (gevroesdroogde) promastigoten geïncubeerd. In het algemeen wordt een titer van > 1:3.200 als positief beschouwd, waarmee een sensitiviteit van 91-100 procent en een specificiteit van 72-95 procent wordt bereikt bij VL.^{2,4} In FAST is de proceduuretijd met behoud van specificiteit en sensitiviteit verkort tot drie uur in tegenstelling tot 18 uur in DAT.⁸

Het meest gebruikte antigeen in ELISA is een *crude soluble antigen* (CSA). De sensitiviteit van ELISA op basis van CSA varieert tussen 80 en 100 procent, kruisreactiviteit is echter beschreven met trypanosomiasis, tuberculose en toxoplasmosis. Bij gebruik van gezuiverde antigeenfracties wordt een sterk verbeterde specificiteit (100 procent) bereikt, de sensitiviteit is daarentegen beduidend lager.^{2,4,6-9}

Van de verschillende recombinant-antigenen is een 39 aminozuren tellend eiwit (rK39) het meest gebruikt. Een ELISA met rK39-antigeen bleek 100 procent sensitief en specifiek in de diagnostiek van VL en PKDL. Anti-rK39-antistoftiters

blijken bovendien te correleren met een actieve infectie en kunnen dus worden gebruikt voor het monitoren van therapie-effect. Recentelijk is ook een veelbelovende immunochromatografische dipstick ontwikkeld (InBios®). De gerapporteerde resultaten zijn echter nog zeer wisselend. In India wordt voor VL een sensitiviteit van bijna 100 procent beschreven, terwijl dit in Sudan slechts 67 procent zou zijn. In Zuid-Europa werd met de rK39-striptest bij 71 procent van de patiënten met VL een positief resultaat gevonden.^{2,9} De *indirect fluorescence antibody test* (IFAT) is een test die in een vroeg stadium van de infectie al een positieve uitslag kan geven. Indien de titers (gedurende behandeling) langer hoog blijven is dit een aanwijzing voor een mogelijke relaps.⁴ Naast de afzonderlijke voor- en nadelen van de verschillende serologische technieken, blijft een probleem van het aantonen van antistoffen dat geen onderscheid kan worden gemaakt tussen een actieve of een doorgemaakte infectie. Een veelbelovende nieuwe ontwikkeling is het aantonen van *Leishmania*-specifieke antigenen. Antigeendetectie is specifiekere dan antistofdetectie, kan ook bij patiënten met een gestoord immuunsysteem worden gebruikt en heeft een hoge prognostische waarde bij het vervolgen van therapie. Het aantonen van antigenen kan door middel van een recentelijk voor *Leishmania* ontwikkelde latex agglutinatietest (KATEX). Deze test kan antigenen in de urine van patiënten aantonen met een gerapporteerde sensitiviteit van 68-100 procent en een specificiteit van 100 procent.¹⁰

Moleculaire diagnostiek

De moleculaire diagnostiek is gebaseerd op detectie van DNA/RNA van de *Leishmania*-parasiet. De mogelijkheden van moleculaire diagnostiek zijn sinds de ontwikkeling van de PCR sterk toegenomen. In 1992 beschreven Van Eys et al. een *Leishmania*-specifieke PCR, gebaseerd op *small subunit ribosomal RNA* (SSU rRNA)-gen.¹¹ In de Nederlandse instituten waar moleculaire *Leishmania*-diagnostiek wordt verricht, wordt deze *Leishmania*-PCR nog steeds gebruikt. Na amplificatie kan tot speciescomplex-niveau worden gedifferentieerd met restrictie-enzym-fragmentlengte-polymorfisme (RFLP). Hierbij wordt het amplificatieproduct met een set verschillende restrictie-enzymen geknipt en worden de resulterende fragmenten door middel van gelelektroforese op grootte gescheiden. Het verkregen RFLP-patroon is specifiek voor de verschillende speciescomplexen.¹¹ Bij onderzoek in Sudan bleek dat bij 70 procent van de bewezen leishmaniasispatiënten met deze PCR *Leishmania*-DNA ook in bloed aantoonbaar is.¹²

Gebruikmakend van verschillende PCR's wordt bij VL een specificiteit van 100 procent met daarbij een sensitiviteit van 92-98 procent beschreven, mede afhankelijk van het materiaal waaruit het DNA wordt geïsoleerd (bloed, beenmerg of miltaspiraats). Er zijn ook onderzoeksgroepen die iets lagere percentages (rond de 80-92 procent) vaststellen.^{6,9,13} De percentages bij CL liggen gemiddeld lager en daarbij is er ook een veel grotere spreiding. De gerapporteerde sensitiviteit varieert van 60-80 tot 96 procent en de specificiteit van 50 tot 100 procent. Deze diversiteit zou kunnen worden veroorzaakt door de inclusie van chronische vormen. Bij chronische vormen wordt namelijk een veel lagere diagnostische waarde aan de PCR toegeschreven. Deze getallen lijken heel laag, maar in vergelijking met de conventionele technieken (4,5-27 procent) is het een hele vooruitgang.

De meest gebruikte *targets* voor de detectie en speciesdifferentiatie van *Leishmania*-soorten zijn veelal *multicopy*-sequenties, zoals kinetoplast-DNA (kDNA), ribosomale RNA-genen en genomische *repeats*. Door middel van RFLP, sequentieanalyse of species-specifieke *primers* kan differentiatie tot op sub(species)-niveau worden bereikt, maar vaak gaat dit ten koste van de sensitiviteit.¹³⁻¹⁷

De meest recente ontwikkelingen zijn de verschillende real-time-PCR-procedures.¹⁸⁻²⁰ Een voorbeeld hiervan is een real-time-PCR voor *Leishmania* gebaseerd op de *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET)-technologie. Door gebruik te maken van het verschil in hechtingstemperatuur van de fluorescerende *probes* kan bovendien door middel van een smeltcurveanalyse onderscheid worden gemaakt tussen het *Leishmania donovani*-complex en het *Leishmania braziliensis*-complex en de overige species. Een voordeel van *real-time*-PCR is onder andere de mogelijkheid tot kwantificering. Door vast te stellen na hoeveel PCR-cycli de test positief wordt en dit te vergelijken met een standaardcurve kan kwantitatieve informatie over de parasitaire *load* worden gegeven. Hoewel de uitslagen een benadering van de parasitaire *load* zijn, blijkt het wel bruikbaar om VL tijdens therapie te vervolgen.

Conclusie

De inzet van de besproken diagnostische procedures is vanzelfsprekend afhankelijk van de situatie, tijd en beschikbare financiële middelen. In de endemische gebieden zullen FAST en verdere ontwikkeling van *rapid diagnostic tests*, zoals de rK39-dipstick, een belangrijke rol spelen in de diagnostiek van VL. Bij CL kan moleculaire diagnostiek bijdragen aan de kwaliteitscontrole en verbetering van de microscopie.

De diagnostiek van leishmaniasis in een niet-endemische setting zoals in Nederland begint met een reisanamnese. Het optreden van huidlaesies bij iemand die een rondreis heeft gemaakt door Midden- of Zuid-Amerika, moet al snel doen denken aan CL. In die gevallen kan het onderzoek van een biopt, genomen uit de rand van de laesie, voldoende zijn om de diagnose te stellen. Met behulp van moleculaire technieken kan vervolgens direct een verdere differentiatie van de species(-complex) worden verricht, wat belangrijk is in de keuze van behandeling.

Het stellen van de diagnose VL is door de diversiteit van symptomen en het ontbreken van zichtbare laesies veel moeilijker dan bij de cutane vormen. Serologie en/of moleculaire diagnostiek zijn hierbij onmisbare hulpmiddelen in de differentiaaldiagnostiek.

De moleculaire diagnostiek is door de hoge sensitiviteit en specificiteit een zeer belangrijke aanvulling op de traditionele diagnostiek. Door de snelle ontwikkelingen en beschikbaarheid van moleculaire technieken zullen deze een steeds grotere plaats innemen binnen de laboratoriumdiagnostiek. Zeer langdurig microscopisch onderzoek, zoals dit in het recente verleden werd aanbevolen, is nu niet meer vanzelfsprekend. In plaats van twee uur of langer microscopiseren kan nu worden volstaan met veel korter microscopisch onderzoek, gevolgd door moleculaire diagnostiek. Daarnaast kan bij een verdenking op VL worden overwogen naast serologisch onderzoek een PCR op bloed te verrichten alvorens het meer patiëntbelastende, beenmergonderzoek uit te voeren.

Summary

The diagnosis of leishmaniasis often proves to be complex. The combination of epidemiology and clinical presentation is the first

step of a probable diagnosis. Classically, microscopy and culture have been the diagnostic tests of choice to perform in the laboratory. The high sensitivity and specificity of molecular techniques makes them to replace microscopy as golden standard. Combination of serology and molecular diagnostics can replace extensive microscopy and moreover, provides direct differentiation of the species (complex) involved. In the endemic areas, the further development of low-priced serological tests will play an important role in the diagnosis of visceral leishmaniasis.

Referenties

- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003;326:377-82.
- Sundar S, Rai M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:951-8.
- Disch J, Pedras MJ, Orsini M, Pirmez C, de Oliveira MC, Castro M, et al. *Leishmania* (*Viannia*) subgenus kDNA amplification for the diagnosis of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;51:185-90.
- Singh S, Sivakumar R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003;49:55-60.
- Vega-Lopez F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16:97-101.
- Junqueira Pedras M, Orsini M, Castro M, Passos VM, Rabello A. Antibody subclass profile against *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* in the diagnosis and follow-up of mucosal leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:477-85.
- Faber WR, Oskam L, van Gool T, Kroon NC, Knecht-Junk KJ, Hofwegen H, et al. Value of diagnostic techniques for cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol* 2003;49:70-4.
- Schoone GJ, Hailu A, Kroon CC, Nieuwenhuys JL, Schallig HD, Oskam L. A fast agglutination screening test (FAST) for the detection of anti-*Leishmania* antibodies. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:400-1.
- Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, Lambson B, Ramos P, et al. Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs. *Parasitology* 2001;122:253-61.
- Attar ZJ, Chance ML, el-Safi S, Carney J, Azazy A, El-Hadi M, et al. Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Trop* 2001;78:11-6.
- van Eys GJ, Schoone GJ, Kroon NC, Ebeling SB. Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1992;51:133-42.
- Osman OF, Oskam L, Zijlstra EE, Kroon NC, Schoone GJ, Khalil ET, et al. Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2454-7.
- Tavares CA, Fernandes AP, Melo MN. Molecular diagnosis of leishmaniasis. *Expert Rev Mol Diagn* 2003;3:657-67.
- Mahboudi F, Abolhassani M, Tehrani SR, Azimi M, Asmar M. Differentiation of old and new world *Leishmania* species at complex and species levels by PCR. *Scand J Infect Dis* 2002;34:756-8.
- Schonian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HD, Presber W, et al. PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;47:349-58.
- Minodier P, Piarroux R, Gambarelli F, Joblet C, Dumon H. Rapid identification of causative species in patients with Old World leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997;35:2551-5.
- Medeiros AC, Rodrigues SS, Roselino AM. Comparison of the specificity of PCR and the histopathological detection of *Leishmania* for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 2002;35:421-4.
- Schulz A, Mellenthin K, Schonian G, Fleischer B, Drosten C. Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic *Leishmania* organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2003;41:1529-35.
- Mary C, Faraut F, Lascombe L, Dumon H. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004;42:5249-55.
- Bell AS, Ranford-Cartwright LC. Real-time quantitative PCR in parasitology. *Trends Parasitol* 2002;18:337-42.

J.E.M. de Steenwinkel^{1,2}, arts-onderzoeker, dr. J.J. Verweij², onderzoeker-parasitoloog, dr. I.C. Gyssens¹, internist-infectioloog, ¹Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, Rotterdam, ²Leids Universitair Medisch Centrum, afdeling Parasitologie, Leiden.

***Correspondentieadres: J.E.M. de Steenwinkel, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten, kamer L-257, Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam, tel: (010) 463 21 74, fax: (010) 463 38 75, e-mail: j.desteenwinkel@erasmusmc.nl.**

Malariadiagnostiek voor de dagelijkse praktijk

D. HADDAD, T. VAN GOOL

Goede microscopische diagnostiek van malaria vraagt veel expertise. In de afgelopen jaren zijn nieuwe, eenvoudigere testen voor de malariadiagnostiek op de markt gekomen. In dit overzicht worden de voor- en nadelen besproken van de klassieke technieken, de dikke druppel en uitstrijk en nieuwe technieken zoals Quantitative Buffy Coat (QBC) en diverse antigeentesten. Geconcludeerd wordt dat klassieke microscopische diagnostiek nog steeds onontbeerlijk is voor goede malariadiagnostiek. QBC is een excellente screeningstechniek voor laboratoria met veel vraag naar malariadiagnostiek. Antigeentesten die histidine-rich protein 2 (HRP-2) aantonen zijn zeer goed voor de diagnostiek van *Plasmodium falciparum* en parasiet-specifieke lactaatdehydrogenase (pLDH)-detectie voor de diagnostiek van *P. vivax*-infecties. Een test waarbij zowel HRP-2 als pLDH kan worden aangetoond heeft daarom de voorkeur. De waarde van de uitstrijk voor de diagnostiek van malaria wordt vaak onderschat. Gecombineerd onderzoek van een uitstrijk met een antigeentest, waarin HRP-2 wordt aangetoond, is zeer efficiënt.

Trefwoorden: malaria, dikke druppel, uitstrijkpreparaat, antigeentesten, QBC

Inleiding

Malariadiagnostiek wordt in veel Nederlandse laboratoria als lastig beschouwd. Dat is begrijpelijk: het goed herkennen van morfologische details van *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* en *P. malariae* in dikke druppel en uitstrijk is een kunst die alleen door veelvuldig oefenen kan worden aangeleerd en onderhouden. Gelukkig staat de ontwikkeling van nieuwe diagnostische testen niet stil en zijn er de laatste jaren diverse eenvoudige technieken op de markt gekomen die, ook in minder ervaren handen, een hoge mate van betrouwbaarheid hebben.

In dit betoog worden de verschillende diagnostische technieken op een rij gezet met speciale aandacht voor het gebruik in de dagelijkse praktijk. Gebruik van *polymerase chain reaction* (PCR) en bloedanalysers als CD 4000 (Abbott Diagnostics, Santa Clara, Californië, USA) voor de malariadiagnostiek worden hier buiten beschouwing gelaten. PCR kan (nog) niet concurreren met de klassieke technieken wat betreft snelheid, gebruikersgemak en kosten, al zijn hier in de nabije toekomst verbeteringen van te verwachten. CD 4000, in gebruik als hematologie-analyser in veel klinisch-chemische laboratoria, is zeker nuttig voor de diagnostiek van malaria. De techniek heeft een hoge sensitiviteit bij hogere (> 0,5 procent) parasitemieën van *P. falciparum* (96 procent), maar een lage sensitiviteit bij lage(re) parasitemieën van *P. falciparum* (43 procent) en infecties met *P. vivax* en *P. ovale* (25 procent).¹ Het alarm van deze analyser goed instellen is dus zeker nuttig om bij patiënten bij wie (nog) niet aan malaria wordt gedacht, bij routine bloedonderzoek (ernstige) *P. falciparum*-malaria aan te tonen. Aan de gangbare eisen voor individuele diagnostiek voldoet de techniek echter niet.

Wij concentreren ons daarom op de 'klassiekers', de dikke druppel en uitstrijk, de meer recentelijk ontwikkelde QBC-techniek en de antigeentesten. Hierbij maken wij gebruik van praktijkervaring, literatuurgegevens en resultaten van een recentelijk door ons uitgevoerd onderzoek in het Academisch Medisch Centrum (Amsterdam) en het Havenziekenhuis

(Rotterdam). In dit onderzoek werden zowel microscopische technieken (zes typen) en antigeentesten (vijf typen) toegepast. Beoordeeld werden 383 patiënten verdacht van malaria. Hiervan hadden 109 patiënten daadwerkelijk een malaria-infectie: 83 keer *P. falciparum*, 20 keer *P. vivax*, vijf keer *P. ovale* en één keer *P. malariae*. De 'gouden standaard' in dit onderzoek was een Giemsa-gekleurde dikke druppel waarbij 800 microscopische velden (1.000 x) werden beoordeeld. Aan dit onderzoek zal verder worden gerefereerd als het MALDIAG-onderzoek.

De dikke druppel

Onderzoek van de dikke druppel vormt al sinds 1903 de hoeksteen van de malariadiagnostiek.² Dit zal het komende decennium waarschijnlijk ook niet veranderen. De techniek maakt gebruik van lysis van erythrocyten in verschillende lagen waarbij de vrijgekomen parasieten zich op een enkele laag concentreren. Kortdurend microscopisch onderzoek van deze laag maakt het mogelijk op een betrouwbare manier malariaparasieten aan te tonen. De sensitiviteit is hoog, de vier malariasoorten zijn goed te determineren en de parasitemie van *P. falciparum* is, indien niet te hoog, goed te kwantificeren. Essentieel voor ontwikkelingslanden is daarbij dat de techniek zeer goedkoop is. Deze ijzersterke combinatie van mogelijkheden is nog door geen enkele andere vorm van malariadiagnostiek overtroffen. De dikke druppel wordt in de regel gekleurd met een Giemsa-kleurstof, wat zeer goede resultaten geeft indien wordt gebruikgemaakt van goede kwaliteit kleurstof (bijvoorbeeld BDH, Poole, Engeland), een goede buffer voor de verdunning (1:10, pH 7,2) en voldoende lange kleurtijd (30-35 minuten).

Als alternatief voor de Giemsa-kleuring wordt in de tropen veelvuldig de kleuring volgens Field gebruikt. Deze kleuring is, in tegenstelling tot de Giemsa-kleuring zeer snel met een totale kleurtijd van slechts 30 seconden. Daarbij zijn de parasieten veel minder vervormd dan bij de Giemsa-kleuring, wat de identificatie van parasieten vereenvoudigt.

Nadeel is echter dat de parasieten zich minder goed concentreren in één laag waardoor, voor een hoge sensitiviteit, de microschoef van de microscoop veelvuldig moet worden gebruikt. In het AMC en Havenziekenhuis wordt deze techniek als standaardkleuring voor de dikke druppel gebruikt (naast de QBC) en heeft de techniek zich als uiterst betrouwbaar bewezen. In het MALDIAG-onderzoek was de sensitiviteit van microscopie met de Fields-kleuring een fractie lager dan die met de Giemsa-kleuring. Wanneer men malariadiagnostiek niet vaak uitvoert, kan het best worden gebruikgemaakt van de Giemsa-kleuring. Indien er meer ervaring is, haast is of indien naast QBC een dikke druppel wordt gebruikt (zoals in onze praktijk), is de Fields-kleuring de aangewezen techniek.

Groot dilemma blijft altijd hoe lang een dikke druppel moet worden bekeken voordat de patiënt als 'negatief' kan worden doorgegeven. De aanbevelingen lopen dan ook sterk uiteen van 100 microscopievelden door de *World Health Organization* (WHO),³ 'ten minste' 200 velden volgens de Nederlandse richtlijn voor malariadiagnostiek⁴ tot twee keer 500 velden door het referentielaboratorium van het *Hospital for Tropical Diseases* in Londen.⁵ Meestal worden de velden beoordeeld met een vergroting van 10 x 100 (1.000 x). In het MALDIAG-onderzoek had onderzoek van 200 velden (1.000 x) van een Giemsa-gekleurde dikke druppel door een ervaren analist een sensitiviteit van 100 procent. Bij enkele patiënten was soortdeterminatie echter niet mogelijk door het geringe aantal gedetecteerde parasieten. Dit aantal nam af (bij eenzelfde sensitiviteit) bij onderzoek van 400 velden. Dit onderzoek van 400 velden is voor de Nederlandse situatie, zeker ook bij minder ervaren analisten, dan ook een goede basis. Dit onderzoek vraagt circa 12-15 minuten. Bij onzekerheid kan het aantal onderzochte velden worden uitgebreid, maar het aantal patiënten dat dan alsnog positief zal worden gevonden, zal zeer klein zijn. Goed uitgevoerd onderzoek van de dikke druppel heeft een sensitiviteit van circa 5-10/μl. De WHO schat dat in de tropen een reële ondergrens van deze techniek op circa 100 parasieten/μl ligt.⁶

De uitstrijk

De uitstrijk wordt traditioneel naast de dikke druppel gebruikt voor soortdeterminatie en bepaling van de parasitemie van *P. falciparum* wanneer deze ho(0)g(er) is (> 0,5 procent). Met een Giemsa-kleuring zijn waardevolle determinatiekenmerken als de Maurerse vlekken en Schüffnerse stippeling dan ook goed zichtbaar.

Een zeer goed alternatief voor Giemsa-kleuring van een uitstrijk is *Diff Quick*-kleuring (bijvoorbeeld Medion Diagnostics, Düdingen, Zwitserland). De kleurresultaten zijn gelijk en de kleuring is veel sneller (circa 45 seconden). Belangrijk voor goede resultaten met deze techniek is echter dat voor malariadiagnostiek andere kleurtijden worden gebruikt dan voor de hematologie waarin deze kleuring ook wordt gebruikt, en dat deze tijden (één keer acht en één keer 30 seconden voor de twee kleurstappen), strikt moeten worden nageleefd.

Een *Diff Quick*-gekleurd uitstrijkje is een machtig hulpmiddel bij de diagnostiek van malaria. Behalve de snelheid van maken (totaal enkele minuten) en mogelijkheden voor soortdeterminatie en bepaling van parasitemie en een lage prijs, heeft de techniek ook een vrij hoge sensitiviteit. Dit laatste krijgt meestal weinig aandacht, omdat de dikke druppel sensitiever is en deze twee technieken in de regel samen worden

gebruikt. In het MALDIAG-onderzoek bleek echter dat dit verschil niet zo groot is als vaak wordt aangenomen. Vijfminutenbeoordeling (circa 200 velden, 1.000 x) van de uitstrijkpreparaten in de Nederlandse laboratoria, toonde een sensitiviteit van 94 procent ten opzichte van resultaten verkregen met een Giemsa-gekleurde dikke druppel (200 velden). Deze sensitiviteit is dus hoog en komt in de praktijk neer op een detectiegrens van circa 100-300 parasieten/μl bloed, hetgeen bij patiënten met een malaria-infectie een lage parasitemie is. Daarbij komt dat parasieten in de uitstrijk, ook voor minder geoefende analisten, gemakkelijker te herkennen zijn als in de dikke druppel. De uitstrijk kan de dikke druppel als meest sensitieve techniek niet vervangen maar tijdens (bijvoorbeeld) het wachten op een Giemsa-kleuring (35 minuten) kan een vijfminutenbeoordeling van een snel gemaakte *Diff Quick*-uitstrijk al zeer veel informatie opleveren. Bij hogere parasitemieën (> 0,5 procent) is één blik op de uitstrijk al voldoende om de diagnose malaria te stellen.

Quantitative Buffy Coat- of QBC-II-analyse

QBC (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) is een fluorescentietechniek die gebruikmaakt van capillairen die zijn *gecoat* met acridine-oranje. Deze stof bindt zich aan nucleïnezuren waarmee kernhoudende cellen (onder andere leukocyten), na centrifugeren en aanstralen met uv-licht, goed zichtbaar worden in de *buffy coat*. Malariaparasieten concentreren zich vlak onder de *buffy coat* en zijn duidelijk herkenbaar als helder fluorescerende structuren tegen een donkere achtergrond. De techniek werd in beginsel ontwikkeld om uit capillair bloed uit de vinger snel hematologische parameters te kunnen bepalen.⁷ Voor malariadiagnostiek is de techniek met name geschikt als snelle screeningsmethode voor het aantonen/uitsluiten van malaria. Met deze techniek kan een zeer hoge sensitiviteit in een zeer korte beoordelings-tijd worden verkregen (circa 1 parasiet/μl bloed na vijfminutenbeoordeling). Hierin is deze techniek naar onze mening uniek en onovertroffen. Ook de specificiteit (voor malaria parasieten) is excellent. In het AMC is deze techniek al gedurende 15 jaar de eerste lijn van de malariadiagnostiek (aangevuld met Fields- en *Diff Quick*-gekleurde preparaten) en heeft zich daarbij als uiterst betrouwbaar bewezen. Naast malaria kunnen met QBC ook microfilariae, trypanosomen en *Borrelia* spp. worden aangetoond.⁸ Er zijn ook nadelen aan verbonden: de malariasoort kan met de techniek niet worden bepaald en er zijn forse investeringen nodig (circa 2.600-4.000 euro, afhankelijk van de aanwezigheid van een fluorescentiemicroscoop) aan apparatuur. De techniek is daarmee excellent voor een laboratorium met veel aanvragen voor malariadiagnostiek. Met minder aanvragen kan men ook goed volstaan met een dikke druppel, uitstrijk en anti-geentest.

Antigeentesten

De basis van de malaria-antigeentesten is het aantonen van specifieke antigenen van malariaparasieten met behulp van goud- of seleniumgelabelde monoklonale antilichamen. De antigenen die op dit moment als *targets* worden gebruikt voor commerciële testen zijn HRP-2, aldolase en pLDH. HRP-2 is een wateroplosbaar eiwit dat door de aseksuele stadia en jonge gametocyten van *P. falciparum* wordt gesynthetiseerd. Dit eiwit wordt op de buitenmembraan van de erythrocyten tot expressie gebracht en komt in grote hoeveel-

heden vrij wanneer een schizont uiteenvalt. Monoklonale antilichamen tegen HRP-2 tonen dus specifiek *P. falciparum* aan. Erythrocytaire stadia van de malariasoorten die bij de mens voorkomen beschikken niet over een functionele citroenzuurcyclus, waardoor ze voor hun energiemetabolisme geheel afhankelijk zijn van de glycolyse. pLDH is een enzym dat in de glycolyse wordt gebruikt en elke malariasoort heeft zijn specifieke isomeren. Een ander enzym in de glycolyse is aldolase. Hetzelfde enzym wordt in alle humane *Plasmodium*-soorten aangetroffen.

Antigeentesten voor malaria zijn in korte tijd zeer populair geworden, zowel in de tropen als in westerse landen. Dit is met name te verklaren door het grote gebruikersgemak. De testen zijn in een paar minuten uit te voeren en voor het herkennen van bijvoorbeeld een *P. falciparum*-infectie hoeft alleen maar te worden gekeken of al dan niet een rood bandje verschijnt dat, in vergelijking met de lastige microscopie, een wonder van eenvoud is.

Er zijn inmiddels diverse antigeentesten op de markt gekomen, allen gebaseerd op de bovenstaande principes.⁹ Deze komen onder andere uit Noord-Amerika, Europa, Zuid-Afrika en India. De testen uit India en Zuid-Afrika zijn veel goedkoper dan die uit Europa en Noord-Amerika en worden dan ook frequent in de tropen gebruikt. Helaas zijn deze antigeentesten niet altijd even goed geëvalueerd.

In Nederland zijn de meest gebruikte testen NOW[®] ICT Pf/Pv (Binax Inc., Portland, Maine, USA), OptiMAL 48 en OptiMAL-IT (Diamed, Cressier, Zwitserland). Een nieuwe test, recentelijk geïntroduceerd, is PALUTOP⁺⁴ (ALL-DIAG, Straatsburg, Frankrijk). De discussie zal zich dan ook met name op deze testen richten.

NOW[®] ICT Pf/Pv

De NOW[®] ICT Pf/Pv-test heeft een kaartformaat die zeer eenvoudig in gebruik is. Deze test is opgebouwd uit een HRP-2-band voor de detectie van *P. falciparum* en een aldolase-band om alle humane *Plasmodium*-soorten mee te detecteren (met name bedoeld voor *P. vivax*). In onderzoek in westerse landen werd met deze test voor *P. falciparum* een sensitiviteit gevonden tussen 88-97 procent en een specificiteit tussen 89-99 procent.¹⁰ De detectiegrens ligt waarschijnlijk rond 100-300 parasieten/ μ l. Bij hogere parasitemieën kan de test echter ook (zelden) fout-negatief zijn. De sensitiviteit voor *P. vivax* is minder en varieert van 62 tot 98 procent.¹⁰ Sensitiviteit voor *P. ovale* en *P. malariae* is slechts matig.¹¹ Mogelijk houdt de lagere sensitiviteit bij *P. vivax*, *P. ovale* en *P. malariae* verband met de lage(re) parasitemieën waarmee patiënten met deze infecties zich meestal presenteren. In het AHMAL-onderzoek had deze test een sensitiviteit voor *P. falciparum* van 99 procent, voor *P. vivax* 75 en voor *P. ovale* 20 procent. De specificiteit was zeer goed: 98 procent. Bij diagnostisch onderzoek in Suriname, waarbij wij zijn betrokken, was deze test bij vier van tien patiënten met een *P. malariae*-infectie positief (40 procent).

OptiMAL 48 en OptiMAL-IT

OptiMAL 48 is de basistest voor de detectie van pLDH en OptiMAL-IT een vernieuwde versie in individuele verpakking, waardoor met name in de tropen de invloed van luchtvochtigheid zou verminderen.¹² Deze testen zijn opgebouwd uit een specifieke *P. falciparum*-pLDH-band en een pan-malaria-pLDH-band die met alle soorten reageert (met name bedoeld voor *P. vivax*). Aangezien het verloop van de pLDH-acti-

teit parallel loopt met het aantal levende parasieten kan deze test ook worden gebruikt om de effectiviteit van de behandeling te monitoren. De test bestaat uit twee stappen en is minder eenvoudig in gebruik dan NOW[®] ICT Pf/Pv. In onderzoeken bij teruggekeerde reizigers in Duitsland, Frankrijk en Italië toonde de OptiMAL 48-test een teleurstellende sensitiviteit voor *P. falciparum* met respectievelijk 83, 80 en 89 procent.¹⁰ De specificiteit was echter goed (boven 97 procent).¹⁰ Een onderzoek in het *Hospital for Tropical Diseases* in Londen met OptiMAL 48 gaf een sensitiviteit van 95,3 procent voor *P. falciparum* en 96 procent voor *P. vivax* met een specificiteit van 100 procent.¹³ In onderzoeken in de tropen werd een sensitiviteit verkregen die varieerde van 60-88 procent voor *P. falciparum*¹⁰ en 94 procent voor *P. vivax*.¹⁴ In het MALDIAG-onderzoek was de sensitiviteit voor *P. falciparum* 88 procent, voor *P. vivax* 100 procent en voor *P. ovale* 40 procent. De specificiteit was zeer goed: 99 procent. Volgens de fabrikant zou de sensitiviteit van de OptiMAL-IT test zijn verbeterd ten opzichte van de OptiMAL 48-test, maar dit is niet onze ervaring. Hoewel de sensitiviteit voor de andere malariasoorten wat tegenvalt, is de sensitiviteit voor *P. vivax* excellent.

PALUTOP⁺⁴

Ervaringen met NOW[®] ICT Pf/Pv- en OptiMAL-testen suggereren tot nu toe, bij herhaling, dat HRP-2 geschikter is voor detectie van *P. falciparum* dan *P. falciparum* - pLDH. Pan-pLDH lijkt echter weer beter voor de detectie van *P. vivax* dan aldolase dat wordt toegepast in (bijvoorbeeld) NOW[®] ICT. Het ligt dan ook voor de hand om HRP-2 en pLDH in één test te combineren. Recentelijk is een test met deze configuratie op de markt verschenen. PALUTOP⁺⁴ heeft naast HRP-2, een specifiek pLDH voor *P. vivax* en ook een tweede pan-malaria-pLDH voor de detectie van alle humane *Plasmodium*-soorten. Niet-gepubliceerde data tonen een hoge gevoeligheid voor *P. falciparum*, *P. vivax* en *P. malariae*, maar een matige sensitiviteit voor *P. ovale*.¹⁵ Onderzoek naar sensitiviteit en specificiteit van deze test wordt momenteel uitgevoerd in het AMC en Havenziekenhuis.

Conclusie

Het is een wens van velen om de lastige microscopische diagnostiek te vervangen door een eenvoudigere techniek. Dit is begrijpelijk, maar helaas nog niet mogelijk. Dit hangt samen met de unieke combinatie van eigenschappen die in de klassieke technieken, de dikke druppel en uitstrijk, zijn verenigd: hoge sensitiviteit en specificiteit, snelheid, goede soortdeterminatie, kwantificering van parasitemie en bovenal ook lage kosten. Al deze aspecten zijn zeer belangrijk voor het bepalen van het klinische beleid, met name ook de therapiekeuze. De lage kosten zijn essentieel bij grootschalig gebruik in de tropen. Geen van de nieuwe technieken heeft deze combinatie van mogelijkheden.

Nederlandse laboratoria die malariadiagnostiek aanbieden dienen vaardigheden voor microscopisch onderzoek van dikke druppel en uitstrijk dan ook goed te beheersen.

Dit alles neemt niet weg dat het zoeken naar eenvoudigere technieken voor malariadiagnostiek veel aandacht moet blijven krijgen. QBC is met een combinatie van snelheid, sensitiviteit en specificiteit superieur aan de Giemsa-dikke druppel voor het screenen op malaria. Door de extra investering is gebruik van QBC echter alleen kosteneffectief wanneer er veel aanvragen zijn.

Gebruik van antigeentesten is in Nederlandse laboratoria, naast microscopie, zonder meer aan te bevelen. NOW[®] ICT Pf/Pv is een goede test voor het aantonen/uitsluiten van een *P. falciparum*-infectie. OptiMAL is zeer goed voor detectie van *P. vivax*. Theoretisch is PALUTOP⁴[®] de beste test door de combinatie van goede eigenschappen van eerdere antigeentesten. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen of dit in de praktijk ook het geval is. *P. ovale* en *P. malariae* blijven voornamelijk lastig te diagnosticeren met antigeentesten.

Interessant zijn de combinaties van een microscopische techniek en een antigeentest. Een uitstrijk heeft als 'stand alone'-test een relatief hoge sensitiviteit, is eenvoudig te maken, te kleuren en te beoordelen en heeft de mogelijkheid om de parasitemie van *P. falciparum* nauwkeurig te kwantificeren. In het MALDIAG-onderzoek bleek vijfminutenbeoordeling van een uitstrijk in combinatie met de resultaten van een NOW[®] ICT Pf/Pv-test een overall sensitiviteit van 99 procent te geven met daarbij goede soortdeterminatie. Deze combinatie kan dan ook snel betrouwbare informatie geven in die situaties waar expertise in het beoordelen van een dikke druppel (tijdelijk) niet voorhanden is.

Summary

Microscopic diagnosis of malaria requires appropriate technical expertise. In recent years new and simplified tests have become available for diagnosis of malaria. This review discusses the advantages and disadvantages of the classical techniques, the thick and thin smear, and newer techniques like the Quantitative Buffy Coat (QBC) and antigen tests. It can be concluded that for good diagnosis of malaria classical microscopic examination is still essential. The QBC is an excellent screening technique for malaria for laboratories with a large demand for diagnosing malaria. Antigen tests that detect histidine-rich protein 2 (HRP-2) are excellent for diagnosing Plasmodium falciparum while parasite specific lactate dehydrogenase (pLDH) is excellent for P. vivax infection. A test that combines the detection of HRP-2 and pLDH is therefore wanted. The usefulness of good microscopic examination of a thin smear for diagnosis of malaria is often underestimated. A combination of thin smear examination with the result of an antigen test, in which HRP-2 is detected, is remarkably efficient.

Referenties

1. Wever PC, Henskens YMC, Kager PA, Dankert J, Gool T van. Detection of imported malaria with the Cell-Dyn 4000 Hematology Analyzer. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12):4729-31.
2. Ross R. An improved method for the microscopical diagnosis of intermitted fever. *Lancet* 1903;161(4141):86.
3. World Health Organization. Basic malaria microscopy, Part 1: Learner's Guide 1991.
4. Richtlijnen voor de diagnostiek van malaria voor laboratoria in de gezondheidszorg in Nederland. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1999;24(1):44-6.
5. Warhurst DC, Williams JE. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J Clin Pathol* 1996;49(7):533-8.
6. Malaria diagnosis: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1988; 66(5):575-94.
7. Lindhardt PT, Kjaersgaard E, Plesner T. Quantitative buffy coat analysis in haematological patients compared to standard laboratory methods. *Scand J Clin Lab Invest* 1990;50(6):657-61.
8. Dam AP van, Gool T van, Wetsteyn JC, Dankert J. Tick-Borne relapsing fever imported from West Africa: Diagnosis by Quantitative Buffy Coat analysis and in vitro culture of *Borrelia crocidurae*. *J Clin Microbiol* 1999;37(6):2027-30.
9. World Health Organization. List of known commercially available antigen detecting malaria RDT's. Beschikbaar via: <http://www.wpro.who.int/rdt>.
10. Jelinek T. Malaria self-testing by travellers: opportunities and limitations. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2004;2(3-4):143-8.
11. De Monbrison F, Gérome P, Chaulet JF, et al. Comparative diagnostic performance of two commercial rapid tests for malaria in a non-endemic area. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(10):784-6.
12. Moody AH, Chiodini PL. Non-microscopic method for malaria diagnosis using OptiMAL IT, a second-generation dipstick for malaria pLDH antigen detection. *Br J Biomed Sci* 2002;59(4):228-31.
13. Moody A, Hunt-Cooke A, Gabbett E, Chiodini P. Performance of the OptiMAL malaria antigen capture dipstick for malaria diagnosis and treatment monitoring at the Hospital for Tropical Diseases, London. *Br J Haematol* 2000;109(4):891-4.
14. Palmer CJ, Lindo JF, Klaskala WI, et al. Evaluation of the OptiMAL test for rapid diagnosis of *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):203-6.
15. Hance, Depina. Hopital d'Instruction de Armees Laveran – Marseille. Informatiebrochure PALUTOP⁴[®], ALL-DIAG, Straatsburg, Frankrijk.

Dankbetuiging aan: Henk Hofwegen en Rob Koelewijn (Havenziekenhuis, Rotterdam) en Carla Wassenaar en Ellen Bus (Academisch Medisch Centrum, Amsterdam) voor hun zeer waardevolle inbreng in het MALDIAG-onderzoek. Jan Wamsteker wordt bedankt voor het kritisch doorlezen van het manuscript.

D. Haddad¹, arts-microbioloog in opleiding, dr. T. van Gool^{1,2}, medisch microbioloog-parasitoloog, ¹Academisch Medisch Centrum, Sectie Parasitologie, afdeling Medische Microbiologie, Amsterdam, ²Havenziekenhuis, Laboratorium voor Parasitologie, Rotterdam.

Correspondentieadres: D. Haddad, Academisch Medisch Centrum, afdeling Medische Microbiologie, L1-114, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, tel: 020-566 48 61/020-566 91 11, fax: 020-697 92 71, e-mail: d.haddad@amc.uva.nl.

Van alsem tot zeverzaad: enkele plantaardige antiwormmiddelen van vroeger

B.H. POSTMA

De hele natuur is een apotheek.

Paracelsus

BOTANY, n. *The science of vegetables – those that are not good to eat, as well as those that are. It deals largely with their flowers, which are commonly badly designed, inartistic in colour, and ill-smelling.*

Ambrose Bierce: *The Devil's Dictionary* (1906)

Door duizenden jaren waarneming en ervaring ontdekte de mens de heilzame werking van sommige planten bij bepaalde ziekten of aandoeningen. Voordat effectiever en veiliger middelen ter beschikking kwamen, was men ook bij de bestrijding van ingewandswormen aangewezen op middelen die uit die ervaring voortkwamen. In dit artikel wordt aandacht besteed aan enkele van deze wormmiddelen uit de oude doos.

Trefwoorden: antiwormmiddelen, geneeskruiden

Inleiding

Wie tegenwoordig last krijgt van ingewandswormen gaat even naar de huisarts en na een kuur van een paar dagen is het leed meestal geleden. Dat was begin vorige eeuw nog anders. Toen was de lijder aangewezen op preparaten als de wormtabletten van pastoor Heumann, waarin als werkzame bestanddelen onder meer santonine en 'Reinevaren' voorkwamen. Dit laatste is een andere naam voor boerenwormkruid (*Chrysanthemum vulgare*, fam. *Compositae*), dat ook in Nederland vrij algemeen voorkomt. Aftreksels van de bloemknoppen en bladeren van deze plant werden vroeger gebruikt bij de bestrijding van ingewandswormen.

Langs overwoekerde paden

Boerenwormkruid is lang niet de enige plant met wormdrijvende eigenschappen en de wormlijder op zoek naar een plantaardige remedie voor zijn kwaal heeft volop keuze. Tabel 1 toont 55 planten die worden genoemd in recepten voor wormdrijvende middelen. Om niet te verdwalen in een dichtbegroeide kruidentuin beperken wij ons in dit artikel hoofdzakelijk tot enkele soorten die veel in huismiddeltjes en kruidenboeken worden genoemd. Maar vóór behandeling komt de diagnose. In een tijd zonder microscopisch onderzoek moest de patiënt, om als wormlijder te kunnen worden herkend, ofwel (delen van) wormen lozen, ofwel symptomen hebben waarvan de ervaring had geleerd dat zij veel bij wormlijders voorkwamen.

Blaauwe kringen en een jeukende neus

We laten de 17^e-eeuwse arts Stephaan Blankaart¹ aan het woord:

“Seker Kind genegen tot zeer veel Zuiker en Banket te eten, kreeg blauwe ringen om d'oogen, jeukinge in de Neus en een dikachtige buik, losende zomtyds eenige Wormen.”

“Een Jongetjen van acht of tien jaaren, zijnde zeer bleek en maager, met ringen om de oogen, eet veel, daar benevens veel Ooft-vruchten, etc. Wormen heeft hy nooit geloost, is gespannen van buik, in welke hy somwijls eenige pijn komt te gevoelen.”
Verhandeling van de Opvoeding en Ziekten der Kinderen (1684)

Ruim twee eeuwen later zegt broeder Aloysius:²
“Kenteekenen of er wormen aanwezig zijn, zijn de volgende: jeuking der neusgaten, het uitzetten der oogappels, blauwe strepen onder de oogen, het dikwijls veranderen van kleur, zure adem, nu eens gulzige honger dan weer gebrek aan eetlust, buikpijnen, een droge hoest, afwisselend diarrhee, de urine is somtijds melkachtig, enz.”
Troost der Zieken (1912)

Beide schrijvers noemen buikklachten, jeukende neusgaten en blauwe ringen of strepen om de ogen. Ook vermelden zij bijzonderheden over het eetgedrag van hun patiënten. De buikklachten en het wisselend eet- en defecatiepatroon kunnen wijzen op ingewandswormen en de droge hoest van de broeder op de longpassage van *Ascaris*-larven. Beiden noemen jeukende neusgaten en blauwe strepen of ringen om de ogen als uitingen van een worminfestatie. De jeukende neusgaten kunnen passen bij een nasale eosinofilie, zoals die kan voorkomen bij ingewandswormen met een longpassage in hun cyclus. De 'soms melkachtige' urine waarover broeder Aloysius spreekt, is interessant. Dit verschijnsel komt niet voor bij ingewandswormen, maar wel bij filariasis. *Microfilaria* werden voor het eerst ontdekt in 1865 en de volwassen wormen in 1876.³ Misschien was broeder Aloysius via een missionaris op de hoogte van filariasis en kwam hij zo op die melkachtige urine bij worminfecties. Over een verband tussen blauwe kringen om de (uitgezette) ogen en ingewandswormen hebben wij niets gevonden en wat broeder Aloysius bedoelt met 'enz.' blijft helaas een mysterie.

Tabel 1. Planten met beschreven werkzaamheid tegen wormen.

NEDERLANDSE NAAM	WETENSCHAPPELIJKE NAAM	FAMILIE
Absinthalsem	<i>Artemisia absinthium</i>	Compositae
Akelei	<i>Aquilegia vulgaris</i>	Ranunculaceae
Alpenlook	<i>Allium victorialis</i>	Liliaceae
Alsem ¹		Compositae
Appel	<i>Malus communis</i>	Pomaceae
Bieslook	<i>Allium schoenoprasium</i>	Liliaceae
Blauwe knoop	<i>Succisa pratensis</i>	Dipsacaceae
Beuk	<i>Fagus sylvatica</i>	Cupuliferae
Bleke lis	<i>Iris pallida</i>	Iridaceae
Boerenwormkruid	<i>Tanacetum vulgare</i>	Compositae
Bijvoet	<i>Artemisia vulgaris</i>	Compositae
Bonenkruid	<i>Saturea hortensis</i>	Labiatae
Brandnetel	<i>Urtica</i> spp.	Urticariaceae
Citroenkruid	<i>Artemisia abrotanum</i>	Compositae
Duizendblad	<i>Achillea millefolium</i>	Compositae
Duizend guldenkruid	<i>Centaureum minus</i>	Gentianaceae
Echte kamille	<i>Matricaria chamomilla</i>	Compositae
Echt wormkruid	<i>Artemisia cina</i>	Compositae
Eikvaren	<i>Polypodium vulgare</i>	Polypodiaceae
Ereprijs	<i>Veronica</i>	Scrophulariaceae
Es	<i>Fraxinus excelsior</i>	Oleaceae
Gele gentiaan	<i>Gentiana lutea</i>	Gentianaceae
Gewone sleutelbloem	<i>Primula veris</i>	Primulaceae
Goudsbloem	<i>Calendula officinalis</i>	Compositae
Granaatappel	<i>Punica granatum</i>	Punicaceae
Hulst	<i>Ilex aquifolium</i>	Aquifoliaceae
Hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i>	Labiatae
Iris	<i>Iris</i> spp.	Iridaceae
Kers	<i>Prunus avium</i>	Amygdalaceae
Knoflook	<i>Allium sativum</i>	Liliaceae
Komkommer	<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae
Koriander	<i>Coriandrum sativum</i>	Umbelliferae
Mannetjesvaren	<i>Dryopteris filix-mas</i>	Polypodiaceae
Mistel (maretak)	<i>Viscum album</i>	Loranthaceae
Moerbei	<i>Morus</i> spp.	Urticariaceae
Munt	<i>Mentha</i> spp.	Labiatae
Olijf	<i>Olea europaea</i>	Oleaceae
Palomboompje	<i>Buxus sempervirens</i>	Euphorbiaceae
O.L. Vrouwebedstro	<i>Asperula odorata</i>	Rubiaceae
Peen	<i>Daucus carota</i>	Umbelliferae
Pepermunt	<i>Mentha piperita</i>	Labiatae
Perzik	<i>Prunus persica</i>	Amygdalaceae
Ridderspoor	<i>Delphinium consolida</i>	Ranunculaceae
Ronde zonnedaauw	<i>Drosera rotundifolia</i>	Droseraceae
Sint-Janskruid	<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericaceae
Thijm	<i>Thymus vulgaris</i>	Labiatae
Tormentil	<i>Potentilla tormentilla</i>	Rosaceae
Ui	<i>Allium cepa</i>	Liliaceae
Valeriaan	<i>Valeriana officinalis</i>	Valerianaceae
Vuilboom (sporekhouw)	<i>Rhamnus frangula</i>	Rhamnaceae
Vuurwerkplant	<i>Dictamnus albus</i>	Rutaceae
Walnoot	<i>Juglans regia</i>	Juglandaceae

Tabel 1. Vervolg.

NEDERLANDSE NAAM	WETENSCHAPPELIJKE NAAM	FAMILIE
Wijnruit	<i>Ruta graveolena</i>	Rutaceae
Witte klavervaring	<i>Oxalis acetosella</i>	Oxalidaceae
Zeealsem	<i>Artemisia maritima</i>	Compositae

¹Welke alsemsoort hier wordt bedoeld, is niet duidelijk.

De planten en hun werkzame bestanddelen Boerenwormkruid (*Chrysanthemum vulgare*)

Dit is inheems in Europa, Armenië, de Kaukasus en Siberië. In Nederland en België komt de plant algemeen voor langs wegen en dijken, vooral op de zandgronden. Het is een overblijvend, bladverliezend kruid van 60 cm tot 1,20 m hoog met opgaande, holle gegroefde stengel en vertakte wortelstok. De plant verspreidt een aromatische geur en heeft een bittere smaak, reden waarom zij door grazend vee wordt vermeden. De bloeitijd is van juli tot september.

Vooral in bloemen en bladeren is een vluchtige olie aanwezig die tot 70 procent van het giftige *thujon* bevat, dat ook in een aantal *Artemisia*-soorten wordt aangetroffen. De wormdrijvende eigenschappen komen voor rekening van deze verbinding. De plant werd ook veel gebruikt bij menstruatiestoornissen, ter bescherming tegen miskramen en als abortivum. De uitdrukking "Zij heeft dat pakje geloosd zonder wormkruid"^{4,5} wijst hier nog op. Ook zou de plant kinderen beschermen tegen boze geesten. Volgens de *Gart der Gesundheit* (Mainz, 1485) moesten de kinderen daartoe boven de rook van de brandende plant worden gehouden.⁶ Jonge scheuten, meegebakken in eierkoeken, zouden de spijsvertering bevorderen.^{7,8} De meeste kruidenboeken waarschuwen met klem tegen overdosering, ontraden gebruik van de plant in huismiddeltjes of bevelen ten minste terughoudendheid aan.^{9,10} Boerenwormkruid wordt waarschijnlijk in zeer kleine hoeveelheden gebruikt bij de bereiding van Chartreuse.¹¹

Figuur 1. Boerenwormkruid.



Echt wormkruid (*Artemisia cina*)

Deze soort is in Nederland niet inheems, maar hoort oorspronkelijk thuis in de zoutsteppen van Kirgizië. Het is eigenlijk een ondersoort van *Artemisia maritima* (zeealsem).¹² De plant wordt ongeveer 50 cm hoog en de bloemknoppen vormen een losse, aarvormige bloeiwijze. Het werkzame bestanddeel, dat vooral in de bloemknoppen voorkomt, is santonine, dat ook voorkwam in de wormtabletten van pastoor Heumann.¹³ Santonine was een van de eerste antihelminica die werden gebruikt bij de behandeling van *Ascaris*-infecties.

Sinds 1885 stond in Shimkent (Kazakstan) een santoninefabriek.¹⁴ Het wormdrijvend effect berust op verlamming van de wormen,¹⁵ die daarna door een laxeermiddel gemakkelijk konden worden verwijderd. Daartoe bevatten de wormtabletten van pastoor Heumann behalve de antiwormmiddelen ook fenoltaleïne.

Soms werden wormkoekjes en -pastilles met santonine voorzien van een laagje chocolade.¹² Het laat zich denken dat dit vooral bij kinderen gemakkelijk kon leiden tot vergiftiging door overdosering. Het zaad van *Artemisia cina* wordt wel zeverzaad of zedoardzaad genoemd.¹⁵

Figuur 2. Advertentie voor pastoor Heumanns wormtabletten.

Pastoor Heumann's
Nr. 69
Wormtabletten
Bestanddeelen: Santonine 4, Baksedoarbloesem 20, Reinevaren 15, Phenolphtaleïne 5, Bolus 10, Sulker 46.
Prijs: 1 doos f. 1.10
Voor porto en verpakking wordt bij vooruitbetaling niets berekend.
Te verkrijgen bij: **L. Müller, Apotheker**
Kalverstraat 199, Amsterdam.
Nauwkeurige gebruiksaanwijzing staat op de doos.
Gebruik: Kinderen beneden de vijf jaar geeft men dagelijks driemaal een tablet, oudere kinderen 3 maal daags een tablet.

Zeealsem (*Artemisia maritima*)

“Benaming voor een aan de West- en Zuid-Europese kusten voorkomende plantensoort van het geslacht *Artemisia* met witte, vaak viltachtige stengels en geelachtige bloemen (*Artemisia maritima*), aangewend voor geneeskrachtige aftreksels ter behandeling van bezeerde lichaamsdelen en tegen wormkwalen.”¹⁶ Ook deze plant bevat santonine. De Engelse apotheker Nicholas Culpeper (1616-1654) noemde van de drie door hem beschreven *wormwoods* deze plant het zwakste. Er werden allerlei bijzondere eigenschappen aan toegeschreven. Ten onrechte, vond hij en hij maakte van de gelegenheid gebruik voor een hatelijke uitval naar de katholieken, in die tijd (1652) toch al tweederangs burgers: “A papist got the toy by the end, and he called it Holy Wormwood; and in truth I am opinion, their giving so much holiness to herbs, it is the reason there remains so little in themselves.”¹⁸

Absinthalsem (*Artemisia absinthium*)

Deze plant is afkomstig uit Zuid-Europa en wordt in Nederland wel als zeldzame verwilderde plant aangetroffen. Zij kan meer dan een meter hoog worden, is grijs behaard en verspreidt een kenmerkende bitter-aromatische geur. De halfbolvormige bloemhoofdjes staan in sterk vertakte pluimen bij elkaar. In de vluchtige olie die uit de bloemknoppen wordt gewonnen komt behalve thujon een reeks bitterstoffen voor. De plant wordt soms genoemd als antiwormmiddel, maar krijgt de meeste aandacht als grondstof voor de absintbereiding. “Een glaasje absint met water, om den eetlust op te wekken”, schrijft het Woordenboek der Nederlandsche Taal nog in alle onschuld in 1882.¹⁷ Nadat begin vorige eeuw bereiding en verkoop van de drank in de meeste Europese landen werd verboden bleef daar weinig van over. “Hieruit wordt 't beruchte absint-extract gemaakt”, zeggen de auteurs over deze plant in de *Geïllustreerde flora voor Nederland*.¹⁸

De tot nu toe besproken middelen zijn vooral actief tegen rondwormen als *Ascaris*. Voor de behandeling van lintwormen stonden andere middelen ten dienste.

Pompoen (*Cucurbita pepo*) is geen composiet, maar een komkommerachtige. Pompoenzaden staan al zeer lang bekend als middel tegen lintwormen.^{9,19} Ook broeder Aloysius beveelt ze aan.² De zaden moeten tot een deeg worden gestampt, dat wordt vermengd met 30 gram ricinusolie en 30 gram honing. Dit mengsel wordt met een glas melk ingenomen. Twee uur later neemt men het volgende mengsel: 30 gram ricinusolie, 30 gram honing en 10 gram citroensap. De lijder wordt duidelijk geïnstrueerd en komt te weten wat hem te wachten staat: “De zieke moet de kamer niet verlaten, voordat de lintworm tevoorschijn komt, hetgeen plaats heeft na een goede purgatie, vergezeld van hevig koliek.” Bij later onderzoek zijn in pompoenzaden overigens geen verbindingen aangetoond die de werking op lintwormen kunnen verklaren; vermoed wordt dat het hier een mechanisch effect betreft.²⁰ Wie opziet tegen purgeren en koliek kan zijn toevlucht nemen tot olijfolie: iedere 20 minuten twee lepels. “Daardoor gaat de lintworm weg”, aldus broeder Aloysius, die helaas niet vermeldt hoe lang je daarmee door moet gaan en evenmin of de zieke intussen de kamer mag verlaten. Ook Pastoor Heumann¹³ had een middel tegen lintwormen in zijn assortiment. Het bestond uit twee delen: het eigenlijke antiwormmiddel, dat kosobloesem en kamala bevatte, en een laxans waarin sennabladeren voorkwamen. Kosobloesem (*Brayera anthelmintica*) en Kamala (*Mallotus philippinensis*) worden beide in *Martindale* vermeld als middelen tegen lintwormen. Van kosobloesem wordt betwijfeld of de kop van de worm er wel door loslaat; kamala heeft niet alleen een wormdrijvend maar ook een laxerend effect.²¹ De lijder moet eerst het wormdrijvend middel nemen en ongeveer een half uur later het laxeermiddel. Hij wordt geadviseerd in bed te blijven tot het zover is, en zich dan te zetten op “een nachtspiegel, waarin wat warm water is gedaan.”

Pastoor Heumann en broeder Aloysius

Een paar woorden over de twee geestelijken die in dit artikel aan het woord kwamen. Ludwig Heumann (1869-1918) was onder meer 20 jaar als pastoor werkzaam in Elbersroth bij Neurenberg. Door veelvuldig ziekenbezoek raakte hij bekend met allerlei kwalen en ziekten onder zijn parochianen. Dit deed hem besluiten zijn medische kennis te vergroten om hen zo met gedegen raad en daad ter zijde te kunnen staan. Zijn eerste grote succes had hij met de bereiding van een zelf tegen voet- en beenwonden. Dit bracht hem op het idee ook middelen te gaan ontwikkelen tegen andere kwalen, waarbij hij zich steeds door deskundigen liet adviseren. Bij

Figuur 3. Advertentie voor pastoor Heumanns lintwormmiddel.

Nr. 14
Pastoor Heumann's
Lintworm-Middel
Bestanddeelen: Middel tegen den lintworm: Kosobloesem 55, Kamala 20, Menthol-Kobajashi 1.
Laxeermiddel: Zwavelzure Magnesia 25, Sennabladen 5 en Maïssmetel 10.
Prijs: 1 doos f. 3.25
Voor porto en verpakking wordt bij vooruitbetaling niets berekend.
Te verkrijgen bij: **L. Müller, Apotheker, Kalverstraat 199, Amsterdam.**
Nauwkeurige gebruiksaanwijzing staat op de doos.
Gebruik: Den avond, voordat de kuur begint, eet men als avondeten slechts een lichte soep. Den volgenden morgen drinkt men slechts een kopje koffie zonder daarbij wat te eten. Na ongeveer 1/2 uur neemt men de 3 gele ingepakte tabletten, wederom na een half uur neemt men de 2 roode tabletten. Na 2-3 uren zullen de gevolgen komen: bij eene overvloedige ontlasting gaat ook de lintworm af. Het is het beste, dat de patiënt gedurende de kuur te bed blijft; merkt hij, dat ontlasting komt, dan zet hij zich op een nachtspiegel, waarin wat warm water is gedaan.

zijn dood in 1918 liet hij een bloeiende onderneming achter met vestigingen in verschillende Europese landen, waaronder Nederland.

Broeder Aloysius werd als Eduard Vrijens in 1854 te Berg-Urmond in Limburg geboren. "Van mijn jeugd af had ik een bijzondere voorliefde om de geneeskrachtige planten en haar werking te leren kennen", zegt hij in het voorwoord tot de eerste druk van zijn *Troost der Zieken* (1901). Door zijn superieure daartoe in de gelegenheid gesteld verwierf hij door bestuderen van oudere en nieuwe literatuur een grote kennis van geneeskrachtige planten. Al snel was de toeloop van patiënten zo groot dat hij nauwelijks meer aan zijn verplichtingen als kloosterling toe kwam. In 1890 genas hij naar zijn zeggen van 'tering' door een Kneipp-kuur te doen. Tweemaal bezocht hij de bedenker van deze kuur, monseigneur Kneipp in Wörisghofen. Die onderriete hem in zijn methode en spoorde hem bij het tweede bezoek aan vooral door te gaan met zijn kruiden. Op de foto, genomen omstreeks 1892, staan beide geestelijken samen op een trap, de broeder een trede lager. Monseigneur, in zijn rechterhand een sigaar en zijn linkerhand op de schouder van zijn leerling, kijkt alsof hij voor hem een mooie toekomst ziet weggelegd. Dat is ten dele uitgekomen: in 1912 ontving de *Watergeneesinrichting volgens Kneipp* in Heerlen, met broeder Aloysius aan het hoofd, 2.700 geregistreerde bezoekers. Na zijn vertrek in 1917 ging het echter snel bergafwaarts met de inrichting. Broeder Aloysius overleed in 1942, 88 jaar oud. De kruidenapotheek bleef tot 1957 open.

Besluit

In een recent artikel over regulering van het gebruik van geneeskruiden in het Verenigd Koninkrijk²² zeggen de auteurs dat *natuurlijk* niet synoniem is met *onschadelijk*. Als voorbeelden noemen zij onder meer digoxine en vincristine:

Figuur 4. Broeder Aloysius (r) en Mgr. Kneipp, omstreeks 1892.



effectief, maar met een smalle veiligheidsmarge. Dat laatste geldt ook voor de actieve bestanddelen van de hier besproken planten: bij onoordeelkundig gebruik wordt het middel sneller erger dan de kwaal. Bij de tegenwoordige beschikbaarheid van veilige en effectieve antiwormmiddelen zullen waarschijnlijk nog maar weinigen zelf aan de slag gaan om door percoleren, macereren en andere klassieke bereidingswijzen uit bloemen, stengels en wortels preparaten met antiwormwerking te verkrijgen. Wie dat wel doet, moet bedenken dat als de hele natuur een apotheek is, deze in elk geval met omzichtigheid moet worden gebruikt: er zijn immers heel wat "vegetables that are not good to eat..."

Summary

Before safe and effective drugs became available people suffering from intestinal worms often took refuge in preparations from certain herbs reputed to be effective against these parasites. This article describes some of these herbs, their active principles and some preparations used. The activities of two suppliers of herbal medicines, both of them clerics and well known at the time, are briefly mentioned.

Referenties

1. Blankaart S. Verhandeling van de opvoeding en ziekten der kinderen (1684). 2^e druk, 1966.
2. Aloysius, Broeder. Troost der Zieken. Beschrijving van een 450-tal ziekten en kwalen en haar behandeling, benevens van ruim 300 geneeskrachtige planten, wateraanwendungen en heilmiddelen. Tweede, veel vermeerderde uitgaaf. Roermond, 1912.
3. Cook GC, Zumba AI. Manson's Tropical Diseases. 21st ed. (2003), 1477.
4. Harrebomee PJ. Spreekwoordenboek der Nederlandsche Taal of Verzameling van Nederlandsche Spreekwoorden en Spreekwoordelijke Uitdrukkingen van vroegeren en lateren tijd, eerste deel, p. 453 en tweede deel p. 483 onder resp. 'Kruid' en 'Worm', oorspr. uitgave Gorinchem 1853 resp. 1861, herdrukt. Amsterdam, 1980.
5. Woordenboek der Nederlandsche Taal deel XXVI, kol. 2246-2248 (trefwoord 'wormkruid'). SDU, 's-Gravenhage, 1993.
6. Aangehaald in: Engel F-M. Gifkeuken der Natuur. Natuur- en cultuurgeschiedenis van gifplanten. 's-Gravenhage, 1972.
7. Blankaart, S. Den Nederlandsche Herbarius (1698). Ingeleid door dr. D.A. Wittop Koning. Librije der Geneeskunst deel 3. Alphen aan den Rijn/Brussel, 1980.
8. Culpeper, Nicholas. Culpeper's Complete Herbal and English Physician Enlarged (1653). Ware, 1995.
9. Cleene M de. Giftige plantengids. 3^e druk, Baarn, 2000.
10. Schultes RE. Het grote kruidenboek. Honderden geneeskrachtige planten en hun toepassing. Ede, 1980.
11. Daems WF. Geneeskruiden. II. Van onkruid tot geneesmiddel. Gorssel, 1973.
12. Daems WF. Geneeskruiden. I. Van gifplant tot geneesmiddel. Gorssel, 1973.
13. Heumann, Pastoor. De Nieuwe Geneeswijze. 9^{ste} (sic!) Hollandsche oplage. Amsterdam, 1927 (?).
14. Encyclopaedia Britannica, trefwoord 'santonin'.
15. Woordenboek der Nederlandsche Taal XXVII, kol.1078, 's-Gravenhage, 1994, trefwoord 'zedoardzaad'.
16. Woordenboek der Nederlandsche Taal XXVII, kol.1097, 's-Gravenhage, 1994, trefwoord 'zeealsem'.
17. Woordenboek der Nederlandsche Taal. Eerste deel A-Ajuin. Bewerkt door M. de Vries en L.A. Te Winkel. 's-Gravenhage en Leiden, 1882, kol. 608, trefwoord 'absint'.
18. Heimans E, Heinsius HW, Thijsse JP. Geïllustreerde flora van Nederland. Amsterdam/Djakarta, 1956, p. 1027.
19. Pahlow, M. Handboek van geneeskrachtige kruiden. Gezond door de genezende kracht der natuur. Helmond/Antwerpen, 1980.
20. Wade A, Reynolds F. (eds.) Martindale The Extra Pharmacopoeia. 27th ed. London, 1977:101.
21. Wade A, Reynolds F. (eds.) Martindale The Extra Pharmacopoeia. 27th ed. The Pharmaceutical Press, London, 1977:104.
22. Ferner RE, Beard K. Regulating herbal medicines in the UK. BMJ 331(2005):62-3.

B.H. Postma, arts-microbioloog, Laboratorium voor Medische Microbiologie Stichting PAMM, Postbus 2, 5500 AA Veldhoven.

Met dank aan dr. M.A. Schouten, arts-microbioloog, Ziekenhuis Gelderse Vallei, Ede, die bij het PROOST-overleg van 23 juni 2004 een foto liet zien van boerenwormkruid, wat de auteur inspireerde tot het schrijven van dit artikel.

The need for speed in medical microbiology

N.L.A. ARENTS, B.M.W. DIEDEREN, R. KLONT, R. RENTENAAR, N. VAESSEN, B. VLAMINCKX

Op 17 februari 2005 vond het jaarlijkse symposium plaats van de Nederlandse Vereniging van Arts-assistenten Medische Microbiologie (NVAMM) in het gebouw van de Koninklijke Nederlandse Academie voor Wetenschappen (KNAW) te Amsterdam. Snelle medisch-microbiologische diagnostiek stond dit jaar centraal. Dit artikel geeft een samenvatting van de voordrachten.

Trefwoorden: arts-assistenten, NVAMM, snelheid

Dr. Kate Templeton (moleculair bioloog, Leids Universitair Medisch Centrum) hield een zeer boeiende presentatie over sneldiagnostiek van lage luchtweginfecties met behulp van multiplex *real-time*-PCR (*polymerase chain reaction*). Zij begon haar presentatie met een inzichtelijk stroomdiagram waarin een overzicht werd gegeven van de huidige technieken die worden gebruikt bij de diagnostiek van luchtweginfecties (banale kweek, bloedkweek, viruskweek, serologie en urine-antigeentest). De tijd tot aantonen van een verwekker varieert in deze testen van 15 minuten voor antigeentesten tot 21 dagen voor een viruskweek. Wat ontbreekt in het stroomdiagram is een universele, kosteneffectieve screeningstechniek waarmee snelle, gevoelige en specifieke diagnostiek van alle relevante luchtwegpathogenen kan plaatsvinden. Met zo'n snelle universele screeningstechniek zou veel winst kunnen worden behaald bij de zorg voor patiënten met luchtweginfecties, met name op het gebied van het instellen van een gerichte antibiotische therapie. In diverse onderzoeken is aangetoond dat PCR-technieken een hoge sensitiviteit hebben voor de detectie van respiratoire virussen en atypische verwekkers zoals *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* en *Chlamydophila* spp. De toepassing van multiplex *real-time*-PCR met geautomatiseerde methodologie maakt een multipathogene diagnostische test als universele screeningstechniek van luchtwegpathogenen mogelijk.

In Leiden is een multiplex *real-time*-PCR-*assay* ontwikkeld voor de detectie van 12 respiratoire virussen en atypische bacteriën, waarbij de resultaten binnen vijf uur beschikbaar kunnen zijn. De multiplex PCR is vergeleken met conventionele technieken voor de detectie van atypische bacteriën en respiratoire virussen op 105 monsters (keelwat/neusspoelsel/sputum) afkomstig uit een prospectief onderzoek naar *community acquired pneumonia* (CAP). Alle patiënten hadden infiltratieve afwijkingen op de thoraxfoto en bij opname werd bij alle patiënten een *pneumonia severity index* (PSI)-score bepaald. Een microbiologische diagnose werd gesteld in 52/105 (50 procent) patiënten met behulp van conventionele technieken en in 80/105 (76 procent) bij gebruik van PCR. Een virale infectie werd gediagnosticeerd in 15/105 (14,2 procent) van de infecties met behulp van conventionele methoden en in 59/105 (56,2 procent) met behulp van *real-time*-PCR. Gemengde infecties werden gezien in 28/105 (26,6 procent) bij *real-time*-PCR vergeleken met 3/105 (2,8 procent) bij conventionele methoden. In het laatste geval was een menginfectie significant geassocieerd met

een ernstige pneumonie. Opvallend in dit onderzoek was dat humane rinovirussen en coronavirussen (OC43, 229E) vaak werden gevonden in gemengde infecties en als solitaire pathogeen bij patiënten met ernstige pneumonie.

Er kan worden geconcludeerd dat *real-time*-PCR *assays* een hogere sensitiviteit hebben bij snelle diagnostiek van virale en atypische luchtwegpathogenen vergeleken met conventionele technieken. Dr. Templeton is er dan ook een voorstander van het huidige diagnostisch onderzoek bij luchtweginfecties waar mogelijk te vervangen door een schema met als belangrijkste lijnen banale kweek (resultaat binnen 1-2 dagen) en multiplex PCR (resultaat binnen 5-6 uur) zodat de arts-microbioloog een tijdig, en daardoor klinisch relevant, behandeladvies kan geven.

Drs. Jeroen den Boer (arts infectieziekten, GGD Kennemerland, Haarlem) sprak over de (snelle) diagnostiek voor de diagnose van de veteranenziekte. Tot midden jaren 90 waren kweek en serologisch onderzoek de enige methoden om de veteranenziekte te diagnosticeren. Er zijn klinisch weinig kenmerken waarmee deze ziekte zich onderscheidt van andere pneumonieën. Sinds de beschikbaarheid van de urine-sneltest kan de ziekte eerder worden vastgesteld en specifieke behandeling worden gestart, waardoor de mortaliteit is afgenomen. De urine-sneltest is één tot drie dagen na het begin van de ziekte positief en heeft een specificiteit > 99 procent. Dit is belangrijk omdat het om een relatief zeldzame ziekte gaat. Als men aanneemt dat 5 procent van de *community acquired*-pneumonieën wordt veroorzaakt door *Legionella* spp., en de specificiteit is 98 procent, dan is de positief-voorspellende waarde maar 57 procent. De sensitiviteit varieert van 56 tot 99 procent, waarbij de sensitiviteit voor de detectie van *Legionella pneumophila*-serotype 1 hoger is. De sensitiviteit blijkt tevens afhankelijk te zijn van de ernst van de ziekte (ernstige symptomen: 88-100 procent; milde symptomen: 40-53 procent) en de plaats waar de ziekte werd opgelopen (gerelateerd aan reizen: 94 procent; *community acquired*: 44-48 procent; nosocomiaal: 76-87 procent). Een alternatief is de DFA-test (*direct fluorescent antibody*). De sensitiviteit van deze test is afhankelijk van de ervaring van de laboratoriummedewerker en varieert van 33 tot 70 procent. De specificiteit is 96 tot 99 procent. Er zijn diverse PCR's ontwikkeld die zich tegen verschillende delen van het *Legionella* spp.-genoom richten. De sensitiviteit varieert van 11 tot 100 procent en de specificiteit van 92 tot 100 procent.

De reproduceerbaarheid van de PCR is echter matig. Hierbij spelen problemen met betrekking tot nucleïnezuurextractie een belangrijke rol. *Real-time*-PCR is veelbelovend, maar dit kan pas een betrouwbaar diagnostisch middel zijn als de specificiteit (reproduceerbaar) hoger is dan 99 procent. Omdat de specificiteit van DFA en PCR te laag is en de reproduceerbaarheid van PCR onvoldoende is, kan een optimale sensitiviteit alleen worden bereikt door een combinatie van kweek, serologisch onderzoek en de detectie van *Legionella*-antigeen in de urine.

Prof. dr. Michel Bergeron (*director Infectious Diseases Research Centre, University Laval, Québec, Canada*) hield een vurig betoog over snelle, op DNA-gebaseerde microbiologische diagnostiek. Waarom berust de behandeling van patiënten met een ernstige infectie nog steeds op empirie? Beeldvorming (radiologie) en uitslagen van bijvoorbeeld een echocardiogram of klinische chemie zijn binnen een uur beschikbaar, terwijl de huidige microbiologische diagnostiek vaak minimaal twee dagen duurt. Het gevolg is dat microbiologische uitslagen meestal alleen worden gebruikt als de patiënt niet reageert op de empirisch ingestelde behandeling. Het doel dat Bergeron nastreeft, is het ontwikkelen van nieuwe, snelle (binnen een uur), eenvoudig uitvoerbare en betaalbare diagnostiek. Deze diagnostiek moet sensitief en specifiek zijn, direct van het klinisch materiaal kunnen worden gedaan en meerdere micro-organismen, inclusief resistentiegenen, kunnen aantonen.

Voorbeelden zijn de IDI-Strep B en IDI-MRSA. Het aantal technische handelingen wordt teruggebracht van meer dan 50 voor bijvoorbeeld de *Roche Cobas Amplicor* naar zes eenvoudig uitvoerbare stappen voor beide IDI-assays. In een onderzoek van Davies et al. (CID, 2004) was de sensitiviteit en specificiteit van de IDI-Strep B (respectievelijk 94 en 95,9 procent) veel hoger dan de conventionele methode (54,3 en 97,1 procent voor antepartum afgenomen kweek, en 41,9 en 70,2 procent voor een op risicofactoren gebaseerde kweekafname). De IDI-MRSA-test maakt gebruik van meerdere moleculaire aangrijppunten: *targets* specifiek voor het aantonen van *Staphylococcus aureus* en *targets* specifiek voor het detecteren van meticillineresistentie (SCC *mec*-gen). In een onderzoek van Huletsky et al. (JCM, 2004) werden 1,657 MRSA-isolaten getest. In totaal werden 1,636 (98,7 procent) gedetecteerd met de IDI-MRSA-assay, terwijl 26 van 569 (4,6 procent) meticillinegevoelige *S. aureus* (MSSA)-stammen fout-positief reageerde. Geen van de coagulase-negatieve stafylokokken of andere geteste bacteriën gaven fout-positieve resultaten. In een klinische evaluatie (786 neus-swabs) werd een specificiteit van 98,4 procent gevonden, een sensitiviteit van 93,1 procent, een positief-voorspellende waarde van 93,7 procent en een negatief-voorspellende waarde van 98,2 procent.

De grootste uitdaging voor de toekomst zal zijn het ontwikkelen van assays voor het snel detecteren van zowel multiële pathogenen als hun resistentiegenen die uiteindelijk als *point of care*-testen kunnen worden gebruikt. Een nadeel van PCR is dat het een relatief dure techniek is, veel tijd kost, je beperkt bent in het aantal pathogenen dat je kunt aantonen en gevoelig is voor enzyminhibitie. Detectie zonder amplificatie zou deze beperking niet hebben. Een voorbeeld hiervan is de zogenaamde *micro-fluidic compact disc* waar binnen 15 minuten een resultaat kan worden gegenereerd door gebruik te maken van microscopisch kleine glasparels (100-200 micrometer),

op kamertemperatuur in verschillende stappen (prehybridisatie, hybridisatie, wassen en drogen). Door deze techniek is het mogelijk om tegelijk multiële *targets* aan te tonen, waardoor zowel determinatie als gevoeligheidsbepaling (door het aantonen van resistentiegenen) mogelijk wordt. De eindconclusie van prof. dr. Bergeron luidde daarom ook: "*Rapid DNA-based microbiology is here, but we need a change in culture without culture!*"

Prof. dr. Joep Galama (UMC St Radboud, Nijmegen) hield een lezing getiteld *De HIV-sneltest: is testen buiten het laboratorium een goed alternatief?* De uitkomsten van de nieuwe HIV-sneltesten zijn vergelijkbaar zijn met die van de *enzyme immuno assay* (EIA)-testen. Deze sneltesten hebben hun waarde bewezen in situaties waarin een uitslag op korte termijn wenselijk is, bijvoorbeeld niet-gescreende zwangeren tijdens de bevalling of in het geval van een prikaccident om te bepalen of postexpositie-profylaxe (PEP) moet worden gestart. In Nederland worden HIV-sneltesten ook buiten gezondheidscentra aangeboden aan homoseksuelen en iedereen die wil weten of hij/zij is geïnfecteerd met het HIV-virus (*Checkpoint*). Omdat de test snel en eenvoudig is uit te voeren en een hoge negatief-voorspellende waarde heeft, is het een interessante aanpak. Alleen positieve uitkomsten hoeven te worden bevestigd.

Hoewel de voordelen voor zich spreken, is toch enige terughoudendheid te betrachten, omdat men ernaar streeft dat de test wordt uitgevoerd door werkers in de gezondheidszorg zonder ervaring met laboratoriumdiagnostiek. Sneltesten behoren echter te worden uitgevoerd volgens een *standard operating procedure* (SOP) door daartoe gekwalificeerd personeel onder supervisie van een arts-microbioloog. Omdat de positief-voorspellende waarde (PPV) van de HIV-sneltest afhankelijk is van de achtergrond van de patiënt, moet de uitkomst zorgvuldig worden geïnterpreteerd. Ook hier is een taak weggelegd voor de arts-microbioloog. In het geval van een prikaccident is de PPV hoog, maar deze is lager wanneer het om een zwangere vrouw tijdens de bevalling gaat. *Counseling* kan het beste worden gedaan door personeel dat kennis heeft van de epidemiologie van HIV in relatie tot het onderzochte individu. Voortdurende educatie en training op dit gebied is dan ook onontbeerlijk.

Dr. Gerard van Doornum (arts-microbioloog, Erasmus MC, Rotterdam) besprak de sneldiagnostiek van respiratoire virussen. Snelheid in het diagnostisch proces is niet alleen afhankelijk van de snelheid van de testprocedure, maar ook van allerlei andere, met name logistieke, factoren. Het verkrijgen van materialen, het transport van materialen naar het laboratorium alsmede het verschil tussen het bekend worden van het testresultaat en het rapporteren aan de behandelend arts bepalen mede de snelheid in het diagnostisch proces. Specifiek werden de volgende tests besproken: immunofluorescentie-assays, ELISA, *immunoblot* en nucleïnezuur-detectie.

Immunofluorescentieonderzoek is een gevoelig onderzoek voor de meeste respiratoire virussen. De sensitiviteit van immunofluorescentieonderzoek voor respiratoire virussen is echter afhankelijk van de kwaliteit van het monster en het vereist goed getraind personeel. De *line immunoblot*-techniek is veel eenvoudiger uit te voeren. Daardoor kunnen deze testen worden gebruikt voor zogenaamde *point of care testing*. Dat maakt deze testen echter niet noodzakelijk geschikt als snel

en tegelijkertijd sensitief diagnosticum. Als voorbeeld dient Respiratoir Syncytiaal Virus (RSV)-infectie bij volwassenen. De *line immunoblot assay* en ook de immunofluorescentie heeft bij RSV-infecties bij volwassenen slechts een beperkte sensitiviteit. Voor het aantonen van een RSV-infectie en ook van andere respiratoire virusinfecties is een PCR van respiratoire materialen gevoeliger.

De testkarakteristieken van de snelle influenza-*line immunoblot assays* zijn nogal uiteenlopend in verschillende onderzoeken. Daarbij zijn de positief- en negatief-voorspellende waarde sterk afhankelijk van de te testen populatie.

Dr. Van Doornum toonde de resultaten van een korte enquête onder 27 Nederlandse laboratoria met betrekking tot de beschikbaarheid van snelle tests voor respiratoire virussen. Directe fluorescentie en kweek werd door de meeste laboratoria aangeboden (n= 13) gevolgd door een *line immunoblot assay* en kweek (n= 7). Bij 15 laboratoria waren buiten kantooruren testen beschikbaar op verzoek, bij tien laboratoria alleen in geval van nood. Bij twee laboratoria werden testen voor respiratoire virussen nooit buiten kantooruren verricht.

De reden voor het snel verkrijgen van uitslagen van diagnostische test voor respiratoire virussen zijn: vroege behandeling, preventie van overdracht en *health care management*. In dit kader werden de indicaties voor oseltamivir bij influenza-epidemieën in verpleeghuizen besproken. De vaccinatiegraad van bewoners van verpleeghuizen is ongeveer 80 procent. Echter, slechts 7 procent van de medewerkers van verpleeghuizen is gevaccineerd, terwijl ook zij influenza kunnen overbrengen. Van Doornum concludeert dat het rationeel is om grotere groepen patiënten en gezondheidswerkers te vaccineren tegen influenza.

Samenvattend dient met name de gevoeligheid van snelle respiratoire tests nog te worden verbeterd. Snelheidswinst kan eveneens worden behaald in logistiek voorafgaande en na afloop van de test.

Prof. dr. Anthony Moody (*Department of Clinical Parasitology, Hospital for Tropical Diseases University College Hospital, Londen*) gaf een presentatie over sneldiagnostiek van malaria, waarbij met name veel aandacht werd besteed aan de voor- en nadelen van *lateral flow*-immunochromatografische methoden. Malaria is wereldwijd een groot probleem. Endemische malaria, de toenemende populatie, migratie en reizigersverkeer kunnen leiden tot praktische problemen in laboratoria waar weinig ervaring is met malariadiagnostiek, zowel in de westerse wereld als in de tropen. Microscopisch onderzoek van een dikke druppel en bloeduitstrijk is nog steeds de meest gebruikte methode voor de diagnose van malaria en wordt algemeen beschouwd als de gouden standaard waarmee andere diagnostische testen moeten worden vergeleken. Alhoewel de sensitiviteit van microscopie duidelijk minder is dan van de PCR, kan in ervaren handen een detectiegrens van 50 parasieten per microliter worden gehaald en kan een uitslag binnen vijf minuten beschikbaar zijn met gebruik van aangepaste snelle kleuringstechnieken. Nauwkeurige microscopie van dikke druppel en bloeduitstrijk vergt echter intensieve training en met name ervaring die in de meeste laboratoria niet (meer) of slechts in beperkte mate aanwezig is. Daarnaast zorgt de toenemende resistentie wereldwijd voor verandering in de morfologie van verschillende malaria-soorten.

De introductie van immunochromatografische methoden heeft de mogelijkheid geboden van snelle (binnen 20 minuten),

nauwkeurige, niet-microscopische diagnostiek die kan worden gebruikt in situaties waarbij adequate training of expertise met directe microscopie ontbreekt. In deze snelsten wordt gebruikgemaakt van monoklonale antistoffen gericht tegen antigenen die overmatig aanwezig zijn in alle asexuele en seksuele stadia van de parasiet. De meest gebruikte *targets* zijn tegenwoordig het water-oplosbaar HRP2 van *Plasmodium falciparum* of enzymen van de glycolytische *pathway* van de plasmodium-parasiet, zoals het parasiet-specifiek lactaat-dehydrogenase of *Plasmodium aldolase*.

Er is momenteel een grote verscheidenheid aan snelsten voor malaria beschikbaar, zonder duidelijk toezicht op de kwaliteit van deze testen. Sensitiviteit, specificiteit en houdbaarheid onder verschillende condities (fysieke problemen van hitte en vochtigheid op transport, opslag en gebruik van snelsten in de tropen) zijn slechts enkele factoren die een rol spelen bij de beslissing om een test op grote schaal toe te passen. De rol die de *World Health Organisation* wereldwijd kan spelen in kwaliteitscontrole van deze snelsten zal van groot belang zijn zeker nu dure grootschalige multi-drug-programma's de goedkopere (en minder effectieve) methoden vervangen in gebieden met parasitaire resistentie.

Dr. Colin Ingham (moleculair bioloog, Jeroen Bosch ziekenhuis, Den Bosch) sprak over keramische poreuze chips voor snelle gevoeligheidsbepalingen in het medisch microbiologisch laboratorium. Anopore is een keramisch poreus materiaal. Het leent zich uitstekend voor mechanische manipulaties en het is volkomen inert. Door het poreuze karakter van dit materiaal kan het worden geïmpregneerd met voedingsstoffen en antibiotica. Dit biedt de mogelijkheid om 'levende *micro chips*' te maken. Momenteel wordt onderzocht of anopore technologie een toepassing kan krijgen in snelle microbiologische diagnostiek. Voor dit doeleinde wordt een anopore chip verdeeld in miniatuurcompartimenten met verschillende klassen en concentraties van antibiotica. Het effect van antibiotica op celdeling en kolonimorfologie is na enkele verdubbelingstijden te beoordelen met gebruik van fluorescentie-microscopie. Naar de potentiële toepassingen van deze technologie voor sneldiagnostiek in het microbiologisch laboratorium zal verder onderzoek worden verricht.

Ing. Marjan Bruins (research-analist, Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten, Isala Klinieken, Zwolle) sprak over de klinische impact van snelle diagnostiek: *Does shortening turnaround time of microbiological procedures affect clinical outcomes?*

De diagnostische cyclus van een (bacteriële) standaardprocedure omvat het afnemen van materiaal bij de patiënt, administratieve verwerking in het laboratorium, kweek, identificatie en antimicrobiële gevoeligheidsbepaling en ten slotte een rapportage naar de aanvrager. De duur van deze cyclus wordt de omlooptijd of *turnaround time* (TAT) genoemd. Er zijn tot op heden maar twee onderzoeken bekend waarin het effect van verkorten van de TAT als gevolg van versnelde bepaling op *clinical outcome* wordt beschreven. Doern et al. en Barenfanger et al. beschrijven het effect van snelle rapportage door gebruik te maken van een geautomatiseerd systeem voor identificatie en gevoeligheidsbepaling (respectievelijk *Baxter-MicroScan Walkaway* en *Vitek*) in de Verenigde Staten. Beide onderzoeken toonden een significante reductie in kosten aan, en het onderzoek van Doern et al. liet ook een mortaliteitsreductie van 6,5 procent zien. Bij Barenfanger et al.

was de opnameduur voor de snelle groep gemiddeld twee dagen korter. Maar kunnen deze resultaten blind geëxtrapoleerd worden naar een Noord-Europees land?

In een prospectieve, gerandomiseerde *single-blind* onderzoeksopzet hebben Bruins et al. gekeken naar het effect van snellere rapportage als gevolg van geautomatiseerde bacteriële identificatie en antimicrobiële gevoeligheidsbepaling (*Vitek 2*) op *clinical outcome* en ziekenhuiskosten. Randomisatie was gebaseerd op de som van geboortedag en geboortemaand (even versus oneven). Drie onderzoeksperiodes (elk drie maanden, elk 2 x 300 patiënten) werden vergeleken. In onderzoeksperiode 1 werd alleen de gebruikelijke schriftelijke en mondelinge rapportage uitgevoerd. In onderzoeksperiode 2 werd frequenter telefonisch contact tussen de arts-microbioloog en aanvrager nagestreefd, ook buiten de normale werktijden 's avonds, zodra er een relevante uitslag voorhanden was. In onderzoeksperiode 3 kwam daarbij dat het personeel één uur eerder begon met werken en werden additionele uitslagen met een extra postronde verstuurd. In totaal werden 1.870 patiënten geïncludeerd. In tegenstelling tot de twee eerder genoemde publicaties werd geen verschil gevonden in mortaliteit, morbiditeit en kosten tussen de verschillende groepen. Behalve een aantal tekortkomingen in onderzoeksopzet bij Doern et al. (mogelijke *bias* door verschillen tussen de patiëntengroepen betreffende de antimicrobiële therapie op het moment van inclusie, randomisatie op basis van de eerste letter van de achternaam) en Barenfanger et al. (de kostenreductie wordt geheel verklaard door de kortere opnameduur; het gebruik van een historische controlegroep) kunnen verschillen in antimicrobiële resistentiepercentages en in patiëntenpopulaties tussen de landen een rol hebben gespeeld. De conclusie is echter dat versneld bepalen in deze Nederlandse setting geen voordelen oplevert. Hoewel complex, is meer van dit soort *outcome*-onderzoek nodig om deze resultaten te bevestigen en verschillende *settings* beter te kunnen vergelijken.

De *raison d'être* van de medische microbiologie is bijdragen aan een adequate behandeling van patiënten met een infectieziekte: als de *need for speed* er niet is, maken we dan wel verschil? We kunnen gerust zijn; een recent onderzoek door Bouza et al. (*CID*, 2004) laat zien dat vertraging in de diagnostische cyclus een onafhankelijke risicofactor is voor infectiegerelateerde mortaliteit bij patiënten met een positieve bloedkweek. Telefonische en schriftelijke rapportage door de arts-microbioloog inclusief therapieadvies, verstrekt eerder dan de definitieve kweekuitslag leidde tot een verbeterde *clinical outcome*. Dus de eindconclusie luidt: we maken wel degelijk een verschil!

Prof. dr. Pim Assendelft (hoogleraar huisartsgeneeskunde, Leids Universitair Medisch Centrum) hield een zeer onderhoudende presentatie over de rol van microbiologische *point of care*- en zelftesten in de huisartsenpraktijk: zijn ze een zegen of eerder een vloek?

In de huisartsgeneeskunde is in toenemende mate vraag naar *point of care*-testen. Op infectiologisch/microbiologisch terrein wordt gebruikgemaakt van urinedipsticks en in de nabije toekomst zouden sneltesten voor de identificatie van respiratoire pathogenen een toepassing kunnen vinden. Wellicht dat resistentiescreening met DNA-technologie ook een weg zal vinden in de dagelijkse huisartsenpraktijk.

Daarnaast zijn er microbiologische testen die beschikbaar zijn voor de individuele patiënt als zelftesten. Voordelen van zelftesten zijn dat ze snel geruststelling zouden kunnen bieden buiten het medisch circuit om. Momenteel zijn er zelftesten voor influenza, *H. pylori*, borrelia, mononucleosis infectiosa, HIV, hepatitis en syfilis. In Nederland heeft drogisterij Etos de testen voor mononucleosis en syfilis op de markt gebracht. De Raad voor de Volksgezondheid heeft verklaard het gebruik van zelftesten te ondersteunen, mits de consument in staat is de consequenties van zelftesten in te zien en benadrukt derhalve het belang van goede informatie. Dit levert in de dagelijkse praktijk echter nogal wat problemen op. A-priori-kansen, sensitiviteit, specificiteit en andere fenomenen om de waarde van een test in te schatten zijn vaak onbekende begrippen voor de consument. Een positieve test betekent meestal dat de consument/patiënt alsnog naar de dokter moet voor behandeling en advies evenals bij een negatieve test waarbij de symptomen persisteren. Op dit moment is het gebruik van microbiologische *point of care*-testen in de huisartsgeneeskunde beperkt: zelftesten zijn van matige kwaliteit en dragen evidente problemen met zich mee.

Dr. N.L.A. Arents, arts-assistent medische microbiologie, Universitair Medisch Centrum Groningen; **B.M.W. Diederens***, arts-assistent medische microbiologie, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Tilburg; **R. Klont**, UMC St Radboud, Nijmegen; **dr. R. Rentenaar**, arts-assistent medische microbiologie, Academisch Medisch Centrum, Amsterdam; **dr. N. Vaessen**, arts-assistent medische microbiologie, Leids Universitair Medisch Centrum, Leiden; **B. Vlaminckx**, arts-assistent medische microbiologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht.

*Correspondentieadres: **B.M.W. Diederens**, arts-assistent medische microbiologie, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Laboratorium voor Medische Microbiologie en Immunologie, Postbus 747, 5000 AS, Tilburg, tel: 013-539 26 55, e-mail: b.diederens@elisabeth.nl.

Samenvatting proefschrift

H.F.L. WERTHEIM

Bent u onlangs gepromoveerd? De redactie van NTMM nodigt u uit een Nederlandstalig artikeltje te schrijven van 400-600 woorden over uw proefschrift. Dit kan een samenvatting zijn of een beschrijving van uw ervaringen met het schrijven van uw proefschrift. In dit nummer bijt Heiman Wertheim het spits af. Hij promoveerde op 17 juni 2005 aan de Erasmus Universiteit te Rotterdam op 'Staphylococcus aureus infections: lead by the nose'.

Staphylococcus aureus is één van de belangrijkste verwekkers van ziekenhuisinfecties. In dit onderzoek tonen wij aan dat *S. aureus*-neusdragers een drievoudig verhoogd risico hebben van het krijgen van een ziekenhuisbloedbaaninfectie met *S. aureus* ten opzichte van niet-dragers. Wanneer men echter de mortaliteit berekent in de twee groepen, ziet men dat **niet-dragers** met een *S. aureus*-bloedbaaninfectie een significant **verhoogd** risico hebben van overlijden dan dragers (46 versus 18 procent). Mogelijk zijn *S. aureus*-neusdragers met *S. aureus*-infecties beschermd tegen overlijden door gedeeltelijke immuniteit, mede gezien dat 80 procent van de *S. aureus*-infecties bij dragers van endogene oorspong is. Aangezien *S. aureus* steeds meer resistent wordt tegen antibiotica, is het voorkómen van *S. aureus*-infecties essentieel. Wij hebben de effectiviteit van mupirocine(antibioticum)-neuszalf bij het voorkómen van *S. aureus*-infecties onderzocht onder ruim 14 duizend niet-chirurgische patiënten door middel van een gerandomiseerd placebogecontroleerd onderzoek. De resultaten van dit onderzoek ondersteunen niet het routinematig aantonen van *S. aureus*-neusdragerschap door middel van kweek en het vervolgens behandelen van dragers met mupirocine-neuszalf om *S. aureus*-infecties te voorkomen. Nader onderzoek laat zien dat het toedienen van mupirocine-neuszalf alleen niet afdoende is voor een effectieve dekolonisatie.

Voor het ontwikkelen van nieuwe effectieve preventieve maatregelen, dient het mechanisme dat leidt tot dragerschap te worden opgehelderd. Het is reeds bekend dat dragerschap van *S. aureus* in de neus en op de handen en vingers sterk met elkaar zijn gecorreleerd. Wij onderzochten neuspeutergedrag in relatie tot dragerschap van *S. aureus*. Wij vonden een significante associatie tussen *S. aureus*-dragerschap en deelnemers die waren geclassificeerd als neuspeuteraar volgens standaardcriteria. Een advies tot stoppen met neuspeuteren zou een belangrijke bijdrage kunnen leveren in een preventiestrategie.

Om infecties met meticillineresistente *S. aureus* (MRSA) te voorkomen, is het essentieel om de prevalentie van MRSA-dragerschap laag te houden. Hiervoor is goede diagnostiek nodig. Wij laten in dit onderzoek zien dat bij het gebruiken van een selectief ophopingsmedium met antibiotica twee keer zoveel MRSA wordt gedetecteerd als met vaste media alleen. Deze kweekmethode wordt inmiddels in meer Nederlandse ziekenhuizen naar tevredenheid gebruikt. Met deze techniek hebben wij 10.000 patiënten zonder risicofactoren voor MRSA-dragerschap bij opname gescreend op MRSA-neusdragerschap in vier Nederlandse ziekenhuizen. De gevonden prevalentie van MRSA-neusdragerschap is zeer laag (0,03 procent). Deze lage prevalentie ondersteunt het huidige *search en destroy*-beleid in combinatie met het restrictieve antibiotica-gebruik.

***Dr. H.F.L. Wertheim, arts-microbioloog, Erasmus MC,
Dr. Molewaterplein 40, 3015 GD Rotterdam,
e-mail: h.wertheim@erasmusmc.nl.***

13 april 2005 – B. Lamme

Surgical treatment strategies in intra-abdominal infection.
Promotor: prof. dr. D.J. Gouma.
Co-promotor: dr. M.A. Boermeester. Academisch Medisch Centrum Amsterdam, afd. Heelkunde.

14 april 2005 – S.L. Smits

The molecular characterization and epidemiology of toroviruses: Nidovirus stepchildren or missing links?
Promotors: prof. dr. J.P.M. Rottier, prof. dr. M.C. Horzinek.
Universiteit Utrecht, fac. Diergeneeskunde, hoofdafd. Infectieziekten en Immunologie, afd. Virologie.

21 april 2005 – K. Huijsdens-van Amsterdam

Helicobacter pylori adaptation to the gastric epithelium.
Promotor: prof. dr. C.J.M.E. Vandenbroucke-Grauls.
Co-promotor: dr. A. van der Ende. Academisch Medisch Centrum Amsterdam, afd. Medische Microbiologie.

15 juni 2005 – K. Kremer

Genetic markers for *Mycobacterium tuberculosis*; characterization and spread of the Beijing genotype.
Promotor: prof. dr. M.W. Borgdorff.
Co-promotor: dr. ing. D. van Soolingen. Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.

16 juni 2005 – A.W. Graffelman

Lower respiratory tract infections in adults. A diagnostic study in general practice.
Promotors: prof. dr. P.J. van den Broek, prof. dr. W.J.J. Assendelft.
Leids Universitair Medisch Centrum, afd. Infectieziekten.

17 juni 2005 – M.M. van der Eerden

Community acquired pneumonia. A clinical approach to hospital admission, diagnosis and treatment.
Promotor: prof. dr. H.M. Jansen.
Co-promotor: dr. W.G. Boersma. Academisch Medisch Centrum Amsterdam, afd. Longziekten. Medisch Centrum Alkmaar.

17 juni 2005 – H.F.L. Wertheim

Staphylococcus aureus infections. Lead by the nose.
Promotor: prof. dr. H.A. Verbrugh.
Co-promotor: dr. M.C. Vos. Erasmus MC, afd. Medische Microbiologie en Infectieziekten.

7 september 2005 – E.L.G.M. Tonnaer

Pathogenic mechanisms in otitis media with emphasis on *Streptococcus pneumoniae*.
Promotors: prof. dr. K. Graamans, prof. dr. E.A.M. Sanders.
Universitair Medisch Centrum St Radboud, Nijmegen.

27 oktober 2005 – J.J.C.M. van den Broek

Epidemiology of tuberculosis and leprosy under the influence of the HIV/AIDS epidemic.
Promotor: prof. dr. M.W. Borgdorff. Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.

17 november 2005 – R. Laijendecker

Oral Lichen Planus.
Promotor: prof. dr. H.A.M. Neumann.
Co-promotor: dr. B. Tank. Albert Schweitzer ziekenhuis Dordrecht, Erasmus MC, afd. Dermatologie, Rotterdam.

**Datum nog niet bekend – M.R.A. van Cleeffen
L. Kivihya-Ndugga (dubbelpromotie)**

Towards improved diagnosis of tuberculosis.
Promotors: prof. dr. P.A. Kager, prof. dr. M.W. Borgdorff.
Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.

ORATIE

23 juni 2005 – Prof. dr. H. Schuitemaker

Niets zo veranderlijk als het HIV. Hoogleraar Virologie, in het bijzonder de viropathogenese van aids. Academisch Medisch Centrum, Amsterdam.

25 november 2005 – Prof. dr. E.P. Prems

Titel nog niet bekend. Erasmus MC Rotterdam, afd. Dermatologie.

PERSONALIA

Adreswijzigingen

- Mw. E.P.M. van Elzakker, Den Burghstraat 21, 2275 TM Voorburg.
- P.W.M. Hermans, UMC St Radboud, Laboratorium voor Kinderimmunologie/Infectiologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen.
- Mw. dr. S. Kuipers, Gelre Ziekenhuizen, afd. Medische Microbiologie, Postbus 9014, 7300 DS Apeldoorn.
- E. Nulens, Algemeen Ziekenhuis Sint-Jan, afd. Medische Microbiologie, Ruddershove 10, 8000 Brugge, België.
- Mw. drs. J. Spaargaren, Laboratorium voor Infectieziekten, Van Ketwich Verschuurlaan 92, 9721 SW Groningen.
- J.E. van Steenberghe, LCI, p/a RIVM, interne postbak 13, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.
- Mw. dr. K. Waar, Laboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland, Postbus 21020, 8900 JA Leeuwarden.
- Dr. A.A. van Zwet, Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Postbus 9025, 6800 EG Arnhem.

Nieuwe leden

- Dhr. M.A. Bencini, Mr. Cornelisstraat 37, 2023 DE Haarlem.
- Prof. dr. R.A. Coutinho, RIVM, CIE, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.
- C.J. Hodiamont, 2^e Kostverlorenkade 2 III, 1052 RH Amsterdam.
- Mw. J.G.M. Hoefnagel, De Kluijskamp 12-87, 6545 JK Nijmegen.
- Dr. ir. P.J.M. Nuijten, Nobilon International BV, Bacteriologische R&D, Exportstraat 39B, 5831 AK Boxmeer.
- Prof. dr. D. Pierard, AZ-VUB, Afd. Microbiologie, Laarbeeklaan 101, B-1090 Brussel, België.
- Dr. A.F.M. Simons, PathoFinder, Oxfordlaan 70, 6229 EV Maastricht.
- Mw. dr. M.J.C.A. Trijp, Furkabaan 602, 3524 ZL Utrecht.
- Prof. dr. A.J. van Winkelhoff, Academisch Centrum Tandheelkunde Amsterdam, afd. Orale Microbiologie, Van der Boechorststraat 7, 1081 BT Amsterdam.

13 – 24 OKTOBER 2005

4th Scheveningen Meeting

Scheveningen.

Informatie: Wens Reizen bv Brinkzicht 20, 3743 EX Baarn,
e-mail: info@molecularmeeting.com,
website: www.molecularmeeting.com.

19 – 22 OKTOBER 2005

7th European Congress of Chemotherapy and Infection

Florence, Italië.

Informatie: Congrex Holland BV, Postbus 302, 1000 AH
Amsterdam, e-mail: Ecc2005@chemio.org, website: www.ioc.it.

23 – 26 OKTOBER 2005

2nd Trends in Medical Mycology

Berlijn, Duitsland.

Informatie: Congress Care, Postbus 440, 5201 AK Den Bosch,
e-mail: info@congresscare.com, website: www.timm2005.org.

12 DECEMBER 2005

**312^e Bijeenkomst van de Werkgroep Oost,
medische microbiologie**

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang: 14.30 uur.

Informatie: J.A. Kaan, tel: 030-256 67 48.

15 DECEMBER 2005

Infectieziekten Symposium Amsterdam (X)

Academisch Medisch Centrum, collegezaal 5, Amsterdam.

Informatie: congresorganisatie AMC, tel: 020-566 85 85, fax:
020-696 32 28, e-mail: congresorganisatie@amc.nl.

16 – 19 DECEMBER 2005

**45th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and
Chemotherapy (ICAAC)**

Washington, DC, Convention Center, USA.

Informatie: ASM, 1752 N Street, NW Washington,
DC 20036-2804, USA, e-mail: ICAAC@asmusa.org,
website: www.icaac.org/ICAAC.asp.

11 JANUARI 2006

**1^e bijeenkomst van de Werkgroepen Oost en West,
medische microbiologie**

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang: 14.30 uur.

Informatie: J.A. Kaan, tel: 030-256 67 48.

22 – 25 FEBRUARI 2006

2nd Advances against Aspergillosis

Athene, Griekenland.

Informatie: Congress Care, Postbus 440, 5201 AK Den Bosch,
e-mail: info@congresscare.com, website: www.AAA2006.org.

1 – 4 APRIL 2006

**16th European Congress of Clinical Microbiology and
Infectious Diseases**

Nice, Frankrijk.

Informatie: 16th ECCMID 2005, c/o AKM Congress Service, P.O.
Box, CH-4005 Basel, Zwitserland,
e-mail: info@escmid.org, website:
www.escmid.org/sites/index_f.asp?par=2.1.

16 – 18 APRIL 2006

**Voorjaarsvergadering Nederlandse Vereniging voor
Microbiologie**

Papendal.

Informatie: C.H.E. Boel, Stichting PAMM, Laboratorium voor
Medische Microbiologie, Postbus 2, 5500 AA Veldhoven,
tel: 040-258 81 00, fax: 040-258 81 12,
e-mail: E.Boel@pamm.nl.

25 – 29 JUNI 2006

**16th Congress of the International Society for Human and
Animal Mycology**

Parijs, Frankrijk. Les Palais des Congres de Paris.

Informatie: e-mail: meetings@imedex.com,
website: www.imedex.com.

advertentie Emtriva