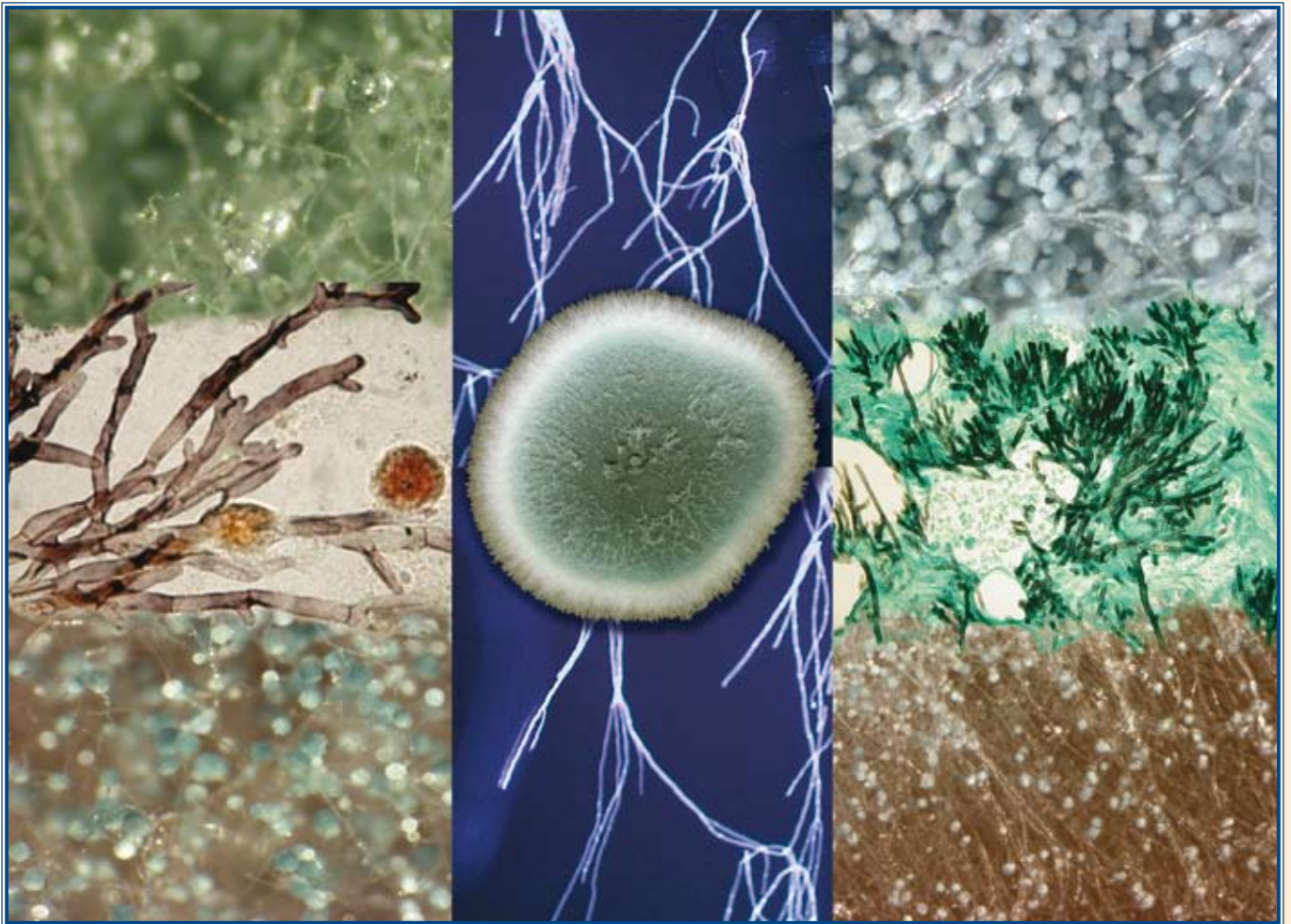


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR  
**MEDISCHE MICROBIOLOGIE**



Patenteren van een *Neisseria gonorrhoeae*-test

•  
Bericht van de laatste auteur van een 'Hot Paper'

•  
*Salmonella typhimurium* en de gastheer: pathogeen-gastheerinteractie, immunontduiking en persistentie

•  
Interview met Roel Coutinho

Advertentie  
Tygasil

## Colofon

### Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie

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

### NVMM-secretariaat

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

### Hoofredactie

Dr. M. van Rijn en Dr. H.F.L. Wertheim

### Redactie

Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,  
dr. A. Fleer, dr. J.G. den Hollander,  
J.A. Kaan, J.S. Kalpoe, mw. L.M. Kortbeek,  
dr. J.F.G.M. Meis, dr. G.J.H.M. Ruijs,  
mw. dr. A. van 't Veen, dr. C. Vink

### Redactiesecretariaat

Mw. G. Brouwer  
Van Zuiden Communications B.V.  
Postbus 2122,  
2400 CC Alphen aan den Rijn  
Tel. (0172) 47 61 91  
Fax. (0172) 47 18 82  
E-mail: ntm@zuidencomm.nl

### Advertentie-exploitatie

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

Oplage en frequency  
900 exemplaren, 4x per jaar

### Abonnementen

Gratis voor leden van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) en leden van de Vereniging voor Infectieziekten (VIZ). Niet-leden NVMM of VIZ in Nederland: € 35,- per jaar  
Buiten Nederland, in Europa: € 42,50 per jaar  
Losse nummers: € 10,20  
Opgave abonnementen:  
Tel. (0172) 47 61 91



### Auteursrecht en aansprakelijkheid

© 2006, Van Zuiden Communications B.V. Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vervoerd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever. Uitgever en redactie verklaren dat deze uitgave op zorgvuldige wijze en naar beste weten is samengesteld; evenwel kunnen uitgever en redactie op geen enkele wijze instaan voor de juistheid of volledigheid van de informatie. Uitgever en redactie aanvaarden dan ook geen enkele aansprakelijkheid voor schade, van welke aard ook, die het gevolg is van bedoelde informatie. Gebruikers van deze uitgave wordt met nadruk aangeraden deze informatie niet geïsoleerd te gebruiken, maar af te gaan op hun professionele kennis en ervaring en de te gebruiken informatie te controleren.

### Algemene voorwaarden

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

ISSN 0929-0176

# Inhoud

## Van de redactie

Nederlands onderzoek in de Holland-Casino-eredivisie en *Citationology*  
J. Meis 41

## Van de voorzitter

De zorgmarkt, altijd een zegen?  
G.J.H.M. Ruijs 42

## Artikelen

Patenteren van een *Neisseria gonorrhoeae*-test  
B. van Wezenbeek, P.M. Schneeberger, M.H.A. Hermans 43

Bericht van de laatste auteur van een 'Hot Paper'  
B. de Pauw 46

*Salmonella typhimurium* en de gastheer: pathogeen-gastheerinteractie,  
immuunontduiking en persistentie  
A. van Diepen, R. Janssen, J.T. van Dissel 49

## Interview

In gesprek met Roel Coutinho  
H.F.L. Wertheim 54

## Verslag symposium NVAMM

*Intensive Care* en infecties  
N.L.A. Arents, R. Klont, E.M. Kraan, B.J.M. Vlamincx, J.J.C. de Vries 60

## Samenvatting proefschrift

Improving the efficacy of antifungal therapy: preclinical studies  
D.T.A. te Dorsthorst 65

## Rubrieken

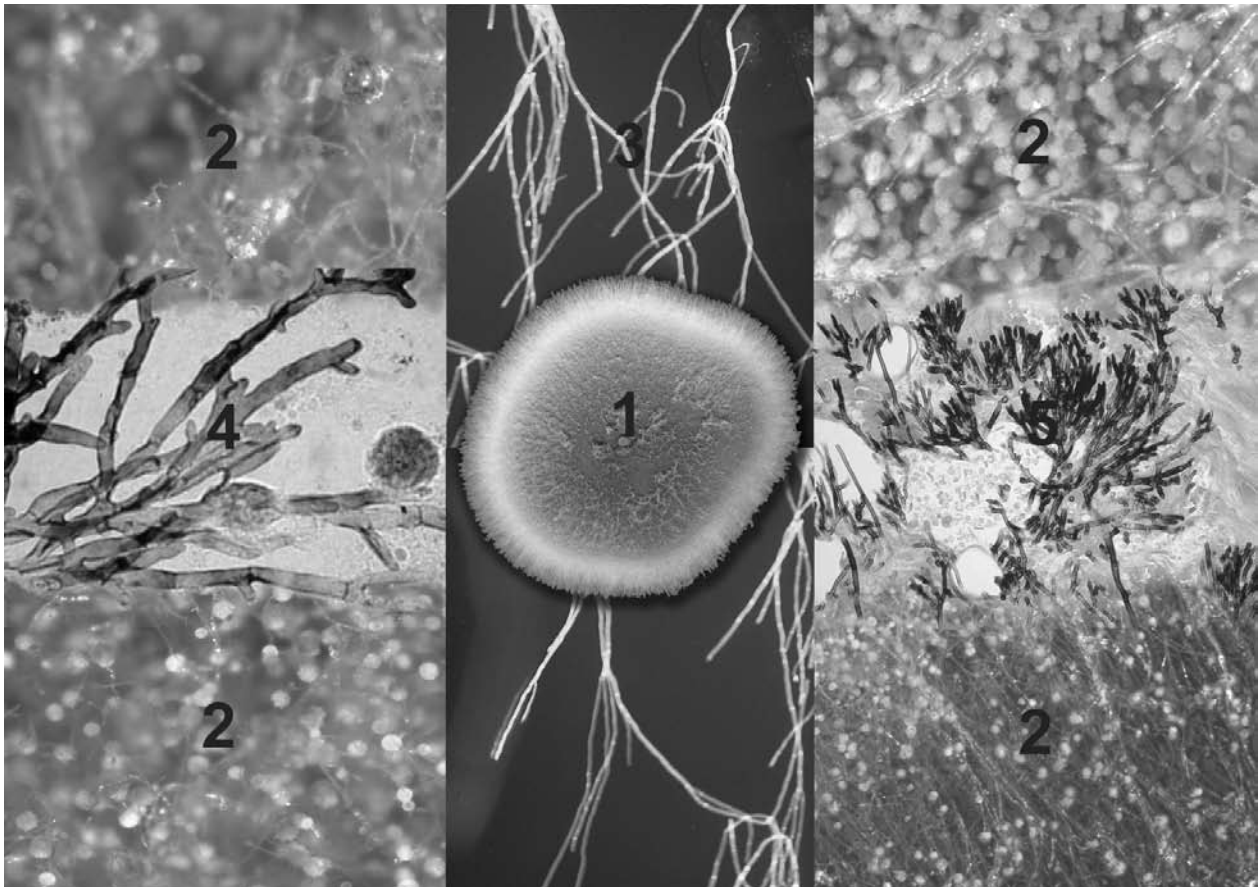
Personalia 66

Promoties 66

Agenda 67

Advertentie  
Vfend

© Loes van Damme, Roel Verkooijen, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten



*Aspergillus fumigatus*

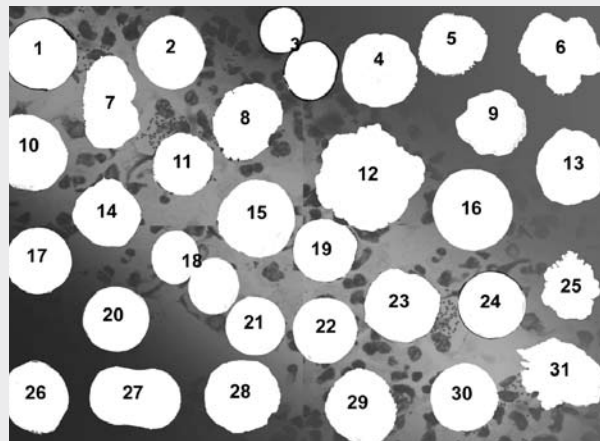
- 1. kolonie, 3 dagen oud op een Sabourad-agar
- 2. kolonie, 3 dagen oud op een Sabourad-agar

- 3. CFW van een bloedkweek – 200x vergroot
- 4. Gomori-kleuring van een BAL – 1.000x vergroot
- 5. Gomori-kleuring van een biopt darmwand – 400x vergroot

**Rectificatie**

Mensen maken fouten, dus ook wij. De legende van de foto op de omslag van NTMM 1, 2006 was niet geheel correct. Zie hier wel de juiste legende. Zoek de verschillen!

01: *Bordetella pertussis*, 02: *Listeria ivanovii*, 03: *Micrococcus luteus*, 04: *Bacillus pumilus*, 05: *Oerskovia xanthineolytica*, 06: *Pseudomonas stutzeri*, 07: *Salmonella typhimurium*, 08: *Yersinia enterocolytica*, 09: *Salmonella typhimurium*, 10: *Shigella flexneri*, 11: *Alcaligenes faecalis*, 12: *Candida parapsilosis*, 13: *Flavimonas oryzihabitans*, 14: *Salmonella typhimurium*, 15: *Paenibacillus pabuli*, 16: *Vibrio cholerae*, 17: *Candida albicans*, 18: *Chromobacter violaceum*, 19: *Bacillus subtilis*, 20: *Vibrioparahaemolyticus*, 21: *Rhodococcus species*, 22: *Shewanella putrefaciens*, 23: *Bacillus licheniformis*, 24: *Staphylococcus sciurii*, 25: *Staphylococcus gallinarum*, 26: *Salmonella typhimurium*, 27: *Campylobacter jejuni*, 28: *Legionella pneumophila*, 29: *Enterobacter amnigenus*, 30: *Oerskovia xanthineolytica*, 31: *Shigella flexneri*





# Nederlands onderzoek in de Holland-Casino-eredivisie en *Citationology*

De kleurige voorkant van het eerste nummer van *Medisch Contact* van dit jaar liet duidelijk Petrischaaltjes zien met voedingsbodems waarop bacteriën groeiden en een hand die een blauwe 10 µm wegwerp-öse bediende.<sup>1</sup>



Mijn eerste reactie was 'Yes, de medische microbiologie en infectieziekten behoren tot de eredivisie van het Nederlands wetenschappelijk onderzoek.' Groot was mijn teleurstelling vervolgens dat de loftrumpet vooral werd geblazen over onderzoek op het gebied van hart- en vaatziekten en genetica. Waar ging het over?

Er was een toptien van 'hot papers' opgesteld waarbij werd gekeken naar het aantal citaties in de internationale literatuur in het tijdvak 2002 tot en met 2004. Bij nadere inspectie bleken er gelukkig toch nog drie van de tien artikelen met infectieziekten te maken te hebben (SARS, HIV en aspergillose), evenveel als de zo geroemde hart- en vaatartikelen. Om met de woorden van een bekende Nederlander te eindigen: "Ben ik nou zo stom of...". Dus niet bacteriologie maar wel de medische microbiologie in de toptien. Laten we maar zeggen dat bacteriologie

zijn gouden tijd honderd jaar geleden heeft gehad en al ruimschoots heeft aangetoond een essentiële component te zijn in de hedendaagse geneeskunde.

Citatieanalyse van gepubliceerd onderzoek is sinds de jaren 50 van de vorige eeuw vooral door Eugene Garfield en zijn 'kinder' *Current Contents* uitgegroeid tot een aanzienlijke bedrijfstak. In Nederland is het centrum voor Wetenschaps- en Technologiестudies in Leiden de belangrijkste *provider* van data om ranglijsten samen te stellen. Kunnen die ranglijsten nu eenvoudig worden gecontroleerd?

In het verleden was dat geen sinecure, maar sinds kort kan elke zichzelf respecterende onderzoeker kijken hoe het zit met zijn eigen 'citatieproductie'. Google, de krachtige zoekmachine, kan heel eenvoudig worden ingezet om citaties in de wetenschappelijke literatuur op te sporen. Ga naar <http://scholar.google.nl/>, vul uw naam en initialen in en u krijgt een indruk hoe u er zelf voorstaat door een toptien (of zelfs tophonderd) van uw artikelen. Nog belangrijker om te weten is hoe je nu op zo'n toptienlijst komt.

De redactie heeft daarom een van de senior-auteurs van zo'n *hot paper*, Ben de Pauw uit Nijmegen, gevraagd om achtergronden en voor het grote publiek onbekende feiten toe te lichten.<sup>2</sup>

**Namens de redactie,**

Jacques Meis

## Referenties

1. Pronk E, Maassen H. Superstudies van eigen bodem. *Med Contact* 2006;61:8-12.
2. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene RE, Oestmann JW, et al. Voriconazol versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347:408-15.

## De zorgmarkt, altijd een zegen?

Dr. G.J.H.M. Ruijs, voorzitter NVMM

Onze onderlinge verhoudingen zijn in de regel die van goede collega's. Je deelt lief en leed tijdens de lunch van een symposium, je bent gewend elkaar van dienst te zijn, elkaar te helpen met tips, met SOP's, met laboratoriumstages waarbij de keukengeheimen vrijelijk worden geopenbaard. We delen veel met elkaar zonder enige terughoudendheid.

Ik denk dat die openheid van een buitengewone betekenis is, waarvan we met z'n allen baat van hebben, evenals diegenen voor wie we werken, onze collegae, onze patiënten.

Zoals ik bij mijn aantreden als voorzitter van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM) aangaf, is het aantal NVMM-leden dat actief is in commissies en besturen, zowel in de NVMM als in gelieerde verenigingen, erg groot. Nu er steeds meer aan de NVMM verbonden werkgroepen en commissies ontstaan neemt het aantal voor de vereniging werkzame collegae nog verder toe.

Door mijn bezoek aan onze werkgroepen en commissies, realiseer ik me des te meer hoeveel werk daar wordt verzet.

Vrijwel altijd worden die functies *pro deo* vervuld en er staat, op een reiskostenvergoeding en een incidenteel entetje na, niets tegenover dan de eer en streling van het ego. En, natuurlijk, het mogen samenwerken met leuke, creatieve collegae. Dit vrijwilligerswerk vanuit hart en ziel is van onschatbare waarde voor een vereniging als de NVMM. Het is de enige manier waarop we erin slagen om sinds onze oprichting in 1992 op steeds meer terreinen actief te zijn en onze bijdrage te leveren.

Die openheid en onderlinge samenwerking kan onder druk komen te staan op het moment dat, terwijl de een zich inspant ten bate van het algemeen, een ander als *free rider* daarvan profiteert en onderwijl bezig is op aanwijzingen van Hoogervorst het tuintje van de collega om te spitten. Dat valt natuurlijk niet goed en kan het functioneren van onze verenigingsorganen onder druk zetten. Vooralsnog is hiervan nog geen sprake. Houden zo!!

*Dr. G.J.H.M. Ruijs, voorzitter NVMM, arts-microbioloog,  
Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectieziekten,  
Rhijnvis Feithlaan 62, 8021 AM Zwolle*

# Patenteren van een *Neisseria gonorrhoeae*-test

L.A.C.M. van Wezenbeek, Dr. P.M. Schneeberger, Dr. M.H.A. Hermans

Het Multidisciplinair Laboratorium voor Moleculair Biologische Diagnostiek (MLMBD) van het Jeroen Bosch Ziekenhuis in 's Hertogenbosch ontwikkelde een test ter detectie van *Neisseria gonorrhoeae*. Gezien de hoge gevoeligheid en specificiteit van de test besloot het Jeroen Bosch Ziekenhuis octrooi aan te vragen op deze test. Dit artikel beschrijft de achtergronden, de *do's and dont's* rond patenteren en de resultaten tot dusver.

Trefwoord: *N. gonorrhoeae*-test, patentaanvraag

## Introductie

Detectie van *N. gonorrhoeae* werd in het Jeroen Bosch Ziekenhuis sinds enkele jaren met de LCx van Abbott uitgevoerd. Deze test is gebaseerd op een ligase chain reaction. Medio 2002 haalde Abbott de LCx-test ter detectie van *N. gonorrhoeae* van de markt omdat de kwaliteit van de reagentia niet langer kon worden gegarandeerd.

De Cobas Amplicor-test van Roche levert relatief veel vals-positieven op,<sup>1,5</sup> daarom besloten we zelf een moleculair biologische test ter detectie van *N. gonorrhoeae*-DNA te ontwikkelen.

## Ontwikkeling van de *real time-PCR-assay* ter detectie van *N. gonorrhoeae*

Evenals Abbott (LCx) baseerden wij onze test op de *opa*-genen. De *opa*-genfamilie codeert voor *opacity* eiwitten. Deze eiwitten komen voor op de buitenste membraan en laten een fasevariabele expressie zien. Na *alignment* van de *opa*-gensequenties kozen we een regio die is geconserveerd binnen de species *gonorrhoeae* en die afwijkend is in andere *Neisseria*-species die *opa*-genen dragen.

Hierop werd een real time-PCR-test ontworpen. Evaluatie van 450 *N. gonorrhoeae*-stammen, waarvan het DNA werd aangeleverd door de GG&GD Amsterdam, liet zien dat 24 van de 450 stammen niet werden gedetecteerd. Op gel lieten deze stammen echter wel een bandje zien. Dit gaf aan dat de primers wel, maar de probe niet voldoende complementair was aan het DNA van deze afwijkende stammen. In samenwerking met de afdeling Pathologie van het Nederlands Kanker Instituut te Amsterdam werd de betreffende sequentie van de 24 stammen bepaald. Hieruit bleek dat deze 24 stammen een zelfde DNA-sequentie bevatten, waarop wij een tweede probe ontwierpen.

Vervolgens testten we kruisreactiviteit van de test met andere micro-organismen door DNA van een groot aantal bacteriën, waaronder 24 *Neisseria*-stammen die samen 12 niet-*gonorrhoeae* bevattende *Neisseria*-species vertegenwoordigden, te analyseren. Deze bleken allemaal negatief. Samen met de afdeling Medische Microbiologie en Infectieziekten van de Gelre Ziekenhuizen te Apeldoorn evalueerden we vervolgens 122 klinische materialen die positief waren bevonden in de Cobas Amplicor-test van Roche. Een 16S rRNA ontwikkeld door PAMM Eindhoven werd als confirmatietest gebruikt voor de Cobas Amplicor. Drieëntachtig materialen bleken negatief zowel in de 16S rRNA-test als in de *opa*-test. Dit is conform de wetenschap dat de Cobas Amplicor-NG-test een hoog percentage vals-positieven genereert. Zesendertig materialen waren zowel 16S rRNA- als *opa*-positief. Drie materialen waren *opa*-positief en 16SrRNA-negatief. Omdat deze drie materialen de hoogste Ct-waarde hadden (en daarmee de laagste concentratie *N. gonorrhoeae*-DNA) werd vermoed dat het verschil zou zijn te verklaren door een verschillende gevoeligheid van beide testen. Evaluatie van een *N. gonorrhoeae*-DNA-verdunningsreeks gaf aan dat dit inderdaad het geval was, de *opa*-test bleek een factor 5 tot 10 gevoeliger dan de 16S rRNA-test.

Deelname aan de QCMD 2003-, 2004- en 2005-panels gaf drie keer een score van honderd procent. Twee monsters waarvan QCMD aangaf dat ze zwak-positief waren (Pos +/-) gaven in duplo nog relatief lage Ct-waarden van 33-34.

Omdat de test goede resultaten liet zien besloten we na te gaan of voor de test een octrooi kon worden aangevraagd. Hiertoe werd contact opgenomen met Octrooibureau VEREENIGDE te Den Haag.

Mr. Drs. L.A.C.M. van Wezenbeek, Octrooigemachtigde, Vereenigde, Den Haag; Dr. P.M. Schneeberger, arts-microbioloog, Regionaal Laboratorium voor Medische Microbiologie en Infectiepreventie, Jeroen Bosch Ziekenhuis, 's Hertogenbosch; Dr. M.H.A. Hermans, moleculair bioloog, Multidisciplinair Laboratorium voor Moleculair Biologische Diagnostiek, Jeroen Bosch Ziekenhuis, Postbus 90153, 5200 ME 's Hertogenbosch, tel: 073-699 21 06, e-mail: m.hermans@jbz.nl (correspondentieadres).



### Patenteren van moleculair diagnostische testen

Vele moleculair diagnostische testen zijn in de afgelopen decennia geïpoteerd. Ook de aan deze testen onderliggende algemene principes (EIA, ELISA, PCR, real time-PCR) zijn in octrooien beschreven en beschermd. Hoewel het dus mogelijk is dit soort uitvindingen te beschermen, dient vooraf altijd de vraag te worden gesteld of het octrooieren inderdaad nut heeft.

Een octrooi geeft de eigenaar het recht om anderen te verbieden de uitvinding te vercommercialiseren. Dat betekent dat een monopoliepositie op de uitvinding wordt verkregen, waardoor het mogelijk is de diagnostische test succesvol (dat wil zeggen zonder concurrentie) te vermarkten. Dit vermarkten kan worden gedaan door zelf de tests te produceren (zoals veel bedrijven zullen doen) of door aan een bedrijf een licentie op het octrooi te geven (zoals door veel non-profit-instellingen zal worden gedaan). Dit laatste is de weg waarvoor wij hebben gekozen.\*

Daarbij moet niet uit het oog worden verloren dat het aanvragen van octrooi een kostbare geschiedenis is. Dit komt onder andere omdat in elk land waar men bescherming wil uiteindelijk een aparte octrooiaanvraag moet worden ingediend met alle bijbehorende kosten. Er zullen dus voldoende inkomsten moeten worden gegenereerd om in ieder geval de kosten van het octrooieren terug te verdienen. Daarnaast moet ook de kans, dat er inderdaad op de aanvraag een octrooi wordt verleend, worden ingeschat. Dat kan alleen maar door de vinding te toetsen aan de eisen die aan de octrooieerbaarheid worden gesteld.<sup>6,7</sup> Voor verkrijging van een octrooi van diagnostische testen gelden dezelfde vereisten als voor 'normale' uitvindingen: nieuwheid en inventiviteit.

De *N. gonorrhoeae*-test werd op basis van deze criteria geanalyseerd. Aangezien de kansen voor deze uitvinding op de bovenstaande punten als goed werden ingeschat, werd besloten een octrooiaanvraag in te dienen. Deze aanvraag is gepubliceerd (9 februari 2006) onder nummer WO 2006/014109.

\*Besprekingen met enkele bedrijven zijn reeds gestart.

### Nieuwheid in het algemeen

Een uitvinding is nieuw binnen het kader van het octrooi-recht als die vóór het indienen van de octrooiaanvraag nog niet publiekelijk bekend was. Publiekelijke bekendmaking kan door middel van publicatie in de (vak)literatuur en/of via internet, maar ook bijvoorbeeld door mondelinge presentaties tijdens congressen.

Het criterium van nieuwheid is hard en absoluut: het is publiek gemaakt of niet. Dat wil zeggen dat, als er kleine verschillen zijn tussen de publicatie en de uitvinding vaak toch nog van nieuwheid kan worden gesproken. Voor biologen is het dan ook nauwelijks te bevatten dat een nucleotidesequentie die slechts op één plaats verschilt van

een gepubliceerde sequentie binnen het octrooirecht toch als nieuw dient te worden opgevat. Ook wordt bijvoorbeeld een toepassing van een eiwit als nieuw beschouwd als dat eiwit weliswaar op zich bekend is, maar die nieuwe toepassing nog niet (bijvoorbeeld het gebruik van EPO als geneesmiddel).

### Inventiviteit in het algemeen

Een uitvinding wordt als inventief beschouwd als deze op grond van alle beschikbare publieke kennis ten tijde van de aanvraag niet voor een vakman voor de hand zou liggen. In tegenstelling tot nieuwheid is inventiviteit dus een subjectief criterium. Globaal gesproken kan worden gezegd dat als de 'uitvinding' kan worden bereikt door het combineren van twee of drie publicaties er dan een gereede kans bestaat dat wegens gebrek aan inventiviteit octrooi zal worden geweigerd. Er kunnen echter tal van argumenten zijn waarom een vinding wel inventief kan worden geacht. Een aantal ter verduidelijking: a) als er in de literatuur staat dat iets (waarschijnlijk) niet zal werken en het blijkt toch goed of zelfs beter te werken; b) als het probleem al heel lang bekend is en toch steeds de oplossing die door de uitvinding wordt geboden over het hoofd is gezien; en c) als er – onverwacht – synergie optreedt. Soms ook ligt de inventiviteit niet in het vinden van een oplossing voor een probleem, maar in het onderkennen van het probleem zelf.

### Nieuwheid van de *N. gonorrhoeae*-test van het Jeroen Bosch Ziekenhuis

Verschillende testen voor het detecteren van *N. gonorrhoeae* waren bekend en beschreven. De stand van de techniek zoals die in het nieuwheidsrapport stond vermeld,<sup>8</sup> bevatte dan ook enige beschrijvingen van diagnostische bepalingen.<sup>9-15</sup> De nieuwheid van de huidige test bestaat in het feit dat deze in staat is stammen te herkennen die voorheen niet met de bekende testen te herkennen waren, hetgeen is belichaamd in het gebruik van een nieuwe probe die een sequentie uit de *opa*-genen herkent. De belangrijkste stand van de techniek werd gevormd door een Amerikaans octrooi van Birkenmeyer *et al.*<sup>9</sup> Dit octrooi beschrijft sequenties uit de *opa*-genen voor het gebruik in diagnostische tests. De unieke sequentie die wordt gebruikt om de 24 stammen die niet in de oude test werden gedetecteerd toch positief te kunnen detecteren stond echter als zodanig niet in deze publicaties beschreven. Hoewel deze sequentie slechts op één punt verschilt met een sequentie die uit US 5,427,930<sup>9</sup> bekend is, is deze toch nieuw ten opzichte van die publicatie. Geclaimd worden dan ook alle voor *N. gonorrhoeae* specifieke oligonucleotiden, die deze unieke sequentie (of het complement ervan) bevatten en die in staat zijn om met het 5'-UTR van een *opa*-gen te hybridiseren.

## Inventiviteit van de *N. gonorrhoeae*-test van het Jeroen Bosch Ziekenhuis

Normaal gesproken zou een sequentie die slechts op één punt verschilt van een bekende sequentie nauwelijks inventief kunnen worden genoemd. In het onderhavige geval, echter, maakt dit ene nucleotideverschil een verschil tussen een test met een detectie van 100 procent van *N. gonorrhoeae* en een test die klinisch niet bruikbaar is vanwege zijn vele vals-negatieven. Tevens was tevoren (dat wil zeggen zonder de sequentie te bepalen van de 24 afwijkende stammen) niet in te zien dat juist deze ene mutatie verantwoordelijk zou zijn voor dit verschil. Op grond daarvan kan de uitvinding inventief worden genoemd.

## Huidige status van de octrooiaanvraag

Zoals hierboven al is aangegeven is de octrooiaanvraag onlangs gepubliceerd. Deze publicatie vindt plaats op een tijdstip van ongeveer 18 maanden na de eerste indiening, die in dit geval op 5 augustus 2004 plaatsvond. Het nieuwheidsrapport en de eerste voorlopige beoordeling over de octrooieerbaarheid geven de stand van zaken, zoals hierboven besproken, weer.

De aanvraag is nu in het zogenaamde 'internationale stadium', een gezamenlijke procedure voor meer dan 128 landen. Vóór februari 2007 zal moeten worden besloten in welke landen octrooibeschermt gewenst is en zal de aanvraag in die landen afzonderlijk moeten worden ingediend. Dan pas begint per land de definitieve beoordeling van de octrooieerbaarheid, die uiteraard gebaseerd zal zijn op het hierboven besproken nieuwheidsrapport en de voorlopige beoordeling. Gezien de daaruit volgende gunstige situatie worden de nationale procedures voor octrooiverlening dan ook met vertrouwen tegemoet gezien. Onze opinie is, dat uiteindelijk in ieder land waar de aanvraag wordt ingediend, octrooi zal worden verleend.

## Referenties

1. Boel CHE, Herk CMC van, Berretty PJM, Onland GHW, Brule AJC van den. Evaluation of conventional and real-time PCR assays using two targets for confirmation of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for *Neisseria gonorrhoeae* in clinical samples. J Clin Microbiol 2005;43:2231-5.
2. Farrell D.J. Evaluation of AMPLICOR *Neisseria gonorrhoeae* PCR using cppB nested PCR and 16S rRNA PCR. J Clin Microbiol 1999;37:386-90.
3. Katz AR, Effler PV, Ohye RG, Brouillet B, Lee MV, Whiticar PM. False-positive gonorrhea test results with a nucleic acid amplification test: the impact of low prevalence on positive predictive value. Clin Infect Dis 2004 ;38:814-9.
4. Roche Diagnostic Systems Inc. Amplicor(r), Branchburg, N.J. Chlamydia trachomatis/*Neisseria gonorrhoeae* (CT/NG). Test package insert 1999.
5. Doornum, GJ van, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnosing herpes virus infections by real-time amplification and rapid culture. J Clin Microbiol 2003;41:576-80.
6. Rijks Octrooi Wet 1995; artt. 2-5.

7. Europees Octrooi Verdrag 1978; artt. 52-56.
8. Het nieuwheidsrapport behorende bij de publicatie van de octrooi-aanvraag ingediend als PCT/NL2005/000574 en gepubliceerd als WO 06/014109 op 9 februari 2006.
9. Birkenmeyer LG, et al. US 5,427,930 uit: Amplification of target nucleic acids using gap filling ligase chain reaction, ingediend op 28-06-1991, verleend op 27-06-1995. Abbott Laboratories.
10. Connell TD, Black WJ, Kawula TH, Barritt DS, Dempsey JA, Kverneland K, et al. EMBL X06436, uit: Recombination among Protein II genes of *Neisseria gonorrhoeae* generates new coding sequences and increases structural viability in the Protein II family. Mol Microbiol 1988;2:227-36.
11. Whiley DM, Buda PJ, Bayliss J, Cover L, Bates J, Sloots TP. A new confirmatory *Neisseria gonorrhoeae* real-time PCR assay targeting the porA pseudogene. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004;23:705-10.
12. Whiley DM, LeCornec GM, Mackay IM, Siebert DJ, Sloots TP. A real-time PCR assay for the detection of *Neisseria gonorrhoeae* by LightCycler. Diagn Microbiol Infect Dis 2002;42:85-9.
13. O'Rourke M, Ison CA, Renton AM, Spratt BG. Opa-typing: a high resolution tool for studying the epidemiology of gonorrhoeae. Molec Microbiol 1995;17:865-75.
14. Durmowicz GP, et al. EP-A-o 919 633 uit: Detection of *Neisseria gonorrhoeae* by amplification and detection of its nucleic acid. Publicatiedatum: 02-06-1999. Becton, Dickinson and Company.
15. Pabich EK, et al. WO 2004/043227 uit: Polynucleotides for the amplification and detection of Chlamydia trachomatis and *Neisseria gonorrhoeae*. Publicatiedatum: 27-05-2004. Abbott Laboratories.

Bijsluiter

# Bericht van de laatste auteur van een ‘Hot Paper’

Prof. dr. B.E. de Pauw

Trefwoorden: aspergillose, voriconazol, klinisch onderzoek

## Inleiding

Ontdekkingsreizen door de nationale en internationale wetenschappelijke jungle gaan onherroepelijk gepaard met het betreden van veel dwaalwegen, die bovendien zijn voorzien van de nodige valkuilen. Soms sta je echter ineens op een licht-overgoten plek en besef je dat de inspanningen toch de moeite waard zijn geweest. Waarschijnlijk is deze ervaring voor velen herkenbaar evenals de onmiddellijk erop volgende twijfel aan het echte belang van de ontdekking.

Ik ben ervan overtuigd dat de verhandeling over voriconazol bij aspergillose in het *New England Journal of Medicine* dat in het januarinumnummer van *Medisch Contact* als één van de tien Nederlandse ‘Hot Papers’ werd geïdentificeerd, inderdaad grensverleggende en duurzame informatie bevat.

Met het onderzoek, beschreven in het bewuste artikel, is namelijk voor het eerst bewezen dat het mogelijk is om baanbrekend vergelijkend klinisch onderzoek te doen naar nieuwe behandelingsmogelijkheden van invasieve schimmelinfecties én dat intercontinentale samenwerking daarbij van doorslaggevend belang is. Een hematologische afdeling met 30 bedden kan per jaar niet meer dan vijf tot zes geschikte kandidaten met invasieve aspergillose voor een klinisch onderzoek leveren, terwijl er meer dan 250 nodig zijn voor een statistisch betrouwbare analyse van de uiteindelijke resultaten. Samenwerking tussen vele centra is dus geboden.

Bijna 20 jaar geleden werd het duidelijk dat de toenemende extreme manipulatie van het immuunsysteem van de mens, zoals bij een orgaantransplantatie, niet ongestraft kan blijven. Bovendien bleek dat door de inmiddels sterk verbeterde antibacteriële middelen niet langer bacteriën maar juist schimmels en gisten het succes van een intensieve behandeling van een kwaadaardige aandoening in de weg dreigen te staan. Naast het persoonlijk leed voor de betrokken patiënten, betekent een fataal verloopende schimmelinfectie ook een verlies van aanzienlijke personele en materiële investeringen. Enkele door schimmels veroorzaakte dramatische sterfgevallen van patiënten met een acute leukemie in remissie waren aanleiding om ons hierin in het UMC St Radboud verder te verdiepen. Een kleine werkgroep, bestaande uit Jacques Meis, Peter Donnelly en mijzelf, werd opgericht. Naast de

beperkte behandelingsmogelijkheden bleek een gebrekkige diagnostiek verantwoordelijk voor de teleurstellende behandelingsresultaten omdat schimmelinfecties meestal pas werden opgespoord als de kans op genezing vrijwel was verkeken. De werkgroep werd aangevuld met Paul Verweij, destijds arts-microbioloog in opleiding, die onderzoek ging doen naar de mogelijkheden en beperkingen van de zich aandienende nieuwe diagnostische technieken, zoals serologie en moleculaire biologie.

## Basis voor internationale samenwerking

Uiteraard waren de problemen, verbonden met diagnostiek en behandeling, eveneens in het internationale circuit gesignaleerd, waarbij de *European Organisation for Research and Treatment of Cancer* (EORTC) in Brussel zich aandienende als een goed platform voor de uitwisseling van denkbeelden. In 1992 werd ik één van de oprichters van de *Invasive Fungal Infections Group* van de EORTC en in 1995 volgde het voorzitterschap. Het doen van klinische onderzoeken op het gebied van schimmelinfecties bleek eens te meer moeilijker dan gedacht. Zo bleek onderling vergelijken van resultaten onmogelijk, omdat iedere zichzelf respecterende onderzoeksgroep er eigen definities op na hield voor hetgeen onder een schimmelinfectie moest worden verstaan.<sup>1</sup> Om dit probleem het hoofd te bieden richtte de voornoemde ‘Schimmelgroep’ van de EORTC een werkgroep op om definities te formuleren die een breed draagvlak en daarmee een voor toekomstig klinisch onderzoek verplichtend karakter zouden moeten krijgen. Een subsidie van Pfizer aan de EORTC, waaraan geen voorwaarden waren verbonden, stelde de Schimmelgroep in staat om op het hoofdkantoor in Brussel een Turkse infectioloog in opleiding aan te stellen die als trekker van het definitieproject zou optreden. Na het totstandkomen van het eerste concept werd contact opgenomen met een aantal experts uit de Verenigde Staten die het voorstel om de werkgroep uit te breiden met vertegenwoor-

Prof. dr. B.E. de Pauw  
 UMC St Radboud, afdeling voor Bloedtransfusie en Transplantie-immunologie, huispost 469, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen,  
 e-mail: b.depauw@abti.umcn.nl

digers van de *Mycoses Study Group* (MSG) met enthousiasme aanvaardden. Na enkele formele bijeenkomsten en vele gedachtewisselingen langs elektronische weg was er sprake van een consensus en konden de nieuwe definities, die alras in een behoefte bleken te voorzien, worden gepubliceerd.<sup>2</sup> Het welslagen van dit project was reden voor de firma Pfizer om de Schimmelgroep van de EORTC uit te nodigen te participeren in het ontwerp van een onderzoeksprotocol dat zou dienen om de waarde van hun nieuwe antischimmelmiddel, voriconazol, bij de behandeling van acute invasieve aspergillose te onderzoeken. Het lag in de bedoeling om twee vergelijkbare onderzoeken, één in Europa en één in Noord-Amerika, te laten lopen. Aanvankelijk waren er dan ook twee verschillende taakgroepen die onafhankelijk van elkaar bezig waren met het schrijven van protocollen. In het verloop van het traject gingen de ontwerpprotocollen een dermate grote overeenkomst vertonen dat het alle betrokkenen de moeite waard leek een poging te wagen beide onderzoeken in elkaar te schuiven. Dat bleek helaas niet mogelijk, omdat de ene groep halsstarrig vasthield aan 'overleving' als primair eindpunt, terwijl de andere niet wilde afwijken van de 'respons van de infectie op de ingestelde therapie bij het stoppen van de behandeling' als eerste parameter. Voor beide standpunten vallen steekhoudende argumenten aan te voeren. Als men uitgaat van de 'respons' krijgt men een betere indruk over de intrinsieke waarde van de geteste antischimmelmiddelen, omdat de parameter 'overleving' sterk wordt beïnvloed door de ontwikkeling van de onderliggende ziekte. Een al dan niet herstel van de gestoorde immuniteit maakt bij gedissemineerde schimmelinfecties immers dikwijls het verschil tussen leven en dood. In feite test men met 'respons' als eindpunt een medicament, en met 'overleving' een behandelingsstrategie die overigens wel voornamelijk op een bepaald medicament kan zijn gebaseerd. Beide elementen zijn belangrijk. Dat de kloof niet kon worden overbrugd werd mede veroorzaakt door verschillen in de richtlijnen voor klinisch onderzoek ten behoeve van registratie van geneesmiddelen aan beide zijden van de Atlantische oceaan. Als compromis kon iedereen zich ten slotte wel vinden in het overnemen van het primaire eindpunt van de andere groep als secundair eindpunt in het eigen protocol. Er kwamen dus uiteindelijk twee onderzoeksprotocollen tot stand die onderling alleen afweken in de definiëring van de primaire en secundaire eindpunten. Bij het opstellen van de protocollen werd er bewust naar gestreefd de behandeling volgens het onderzoeksprotocol zoveel mogelijk te laten aansluiten bij de gangbare dagelijkse praktijk. Een aantal specifieke aandachtspunten in dezen is vermeld in *tabel 1*. Na het afsluiten van de behandeling zou een lange observatieperiode volgen waarin het beloop van het onderliggend lijden en het gebruik van verdere antischimmelmiddelen goed zou worden vastgelegd. Als leider van de Europese delegatie en tevens voorzitter van

Tabel 1. Aandachtspunten in het onderzoeksprotocol.

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geen uitsluiting van ernstig zieke patiënten met kans op vroeg overlijden</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Insluiting alleen mogelijk bij aantonen van ziekte               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Actuele status presens</li> <li>– CT-scan thorax verplicht</li> <li>– Galactomannantest sterk aanbevolen</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observatieperiode tot aan het overlijden of tot 90 dagen na start behandeling</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Toelaten van alle, ook subjectief, benodigd geachte antischimmelmiddelen               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Nauwkeurige registratie van alle schimmelmedicatie met                   <ul style="list-style-type: none"> <li>~ datum</li> <li>~ dosering</li> </ul> </li> <li>– Registratie van de reden tot modificatie                   <ul style="list-style-type: none"> <li>~ intolerantie</li> <li>~ resistentie</li> <li>~ overschakeling op onderhoudstherapie</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>

de Schimmelgroep van de EORTC werd ik gekozen tot de regisseur van het project met supervisie over zowel de Europese als Amerikaanse onderzoeken.

### De onderzoeken

De instroom van patiënten was aanvankelijk boven verwachting, maar stagneerde in de Verenigde Staten nadat ruim honderd personen waren geregistreerd. Reden was dat in de Amerikaanse ziekenhuizen amfotericine B-desoxycholaat op grote schaal werd vervangen door één van de lipide formuleringen van het amfotericine B die inmiddels waren geregistreerd. Toen de instroom terugliep naar minder dan één patiënt per week besloot de Amerikaanse coördinator, in overleg met mij, het onderzoek in de Verenigde Staten te sluiten om te voorkomen dat er een selectie in de onderzoekspopulatie zou worden aangebracht. Hij nam vervolgens contact op met zijn Europese collega om na te gaan of samenvoegen van de beide populaties, zoals immers eerder was overwogen, alsnog mogelijk was. Deze wees een integratie onverbiddelijk van de hand, omdat het aantal aanmeldingen in Europa nog steeds aan de verwachtingen voldeed en het completeren van het Europese onderzoek tot het beoogde aantal van 280 patiënten zonder twijfel statistisch sterkere conclusies zou opleveren. Dit was te rechtvaardigen maar kort daarna groeide ook in Europa, op ethische gronden, langzaam verzet tegen het voortzetten van het onderzoek. Uit zogenaamd fase-II-onderzoek was inmiddels bekend geworden dat voriconazol levensreddend zou kunnen zijn voor patiënten met een aspergillose die niet op andere antischimmelmiddelen reageerden. Omdat het een onderlinge vergelijking onmogelijk zou maken konden de

in het onderzoek opgenomen patiënten die niet gunstig op amfotericine B reageerden, uiteraard niet worden behandeld met voriconazol. De oorspronkelijke klinische coördinator bleef desondanks weigeren het Europese onderzoek te beëindigen en beide populaties samen te voegen. Er was dus geen andere keus dan hem, na overleg met de statistici en de directie van de EORTC, uit zijn functie te ontheffen. Hierna was het formeel mogelijk om ook het Europese onderzoek te beëindigen en de databank met de Amerikaanse patiënten over te hevelen naar de EORTC in Brussel voor een statistische analyse aan de hand van het Europese protocol. Vanwege de grote hoeveelheid gegevens werden we gedwongen selecties te maken, waarbij er primair voor werd gekozen om eerst te rapporteren over de respons op de initiële antischimmelmiddelen, amfotericine B-desoxycholaat en voriconazol, en over de algehele overleving. Gegevens betreffende de betrouwbaarheid van de beeldvormende diagnostiek en het effect van later toegevoegde antischimmelmiddelen zouden later worden bewerkt. Door de Schimmelgroep van de EORTC werd een nieuwe Europese coördinator aangewezen die tot taak kreeg om, in overleg met de statistici en vertegenwoordigers van de onderzoeksgroepen aan beide zijden van de Atlantische oceaan, de gebundelde gegevens te analyseren en een concept-manuscript op te stellen dat, na twee ronden langs alle medeauteurs, binnen enkele weken zijn weg vond naar de pagina's van het *New England Journal of Medicine*. De commentaren van de geraadpleegde deskundigen waren verwaarloosbaar. Een nieuwe standaard voor de behandeling van acute invasieve

aspergillose was daarmee na 50 jaar een feit.<sup>3</sup> Het artikel over de bijdrage van andere antischimmelmiddelen aan de overleving van de patiënten was minder rechtlijnig en onderging de nodige bijstellingen voordat de gegevens aan de literatuur konden worden toegevoegd.<sup>4</sup>

Een lange weg met vele hachelijke momenten, waarbij beslissingen moesten genomen die nogal wat weerstand ontmoetten van mensen die zich niet voldoende realiseerden dat wetenschappelijke waarde van een onderzoek nooit verhoogd mag worden ten koste van een mogelijk, individueel patiëntenbelang.

## Referenties

1. Ascioglu S, De Pauw BE, Donnelly JP, Colette L. Reliability of clinical research on invasive fungal infections: a systematic basic review of the literature. *Med Mycol* 2001;39:35-40.
2. Ascioglu S, Rex JH, De Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. on behalf of the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group of the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: An international consensus. *Clin Infect Dis* 2002;34:7-14.
3. Herbrecht R, Denning DW, Patterson TF, Bennett JE, Greene GE, Oestman J-W, et al, for the Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer and the Global Aspergillus Study group. Voriconazole versus amphotericin B for primary treatment of invasive aspergillosis. *N Engl J Med* 2002;347:408-15.
4. Patterson TF, Boucher HW, Herbrecht R, Denning DW, Lortholary O, Ribaud P, et al, for the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Invasive Fungal Infections Group (IFIG) and the Pfizer Global Aspergillus Study Group. Strategy following voriconazole versus amphotericin B therapy with other licensed antifungal therapy for primary treatment of invasive aspergillosis: impact of other therapies on outcome. *Clin Infect Dis* 2005;41:1448-52.

## INGEZONDEN

### Geachte redactie,

Naar aanleiding van het artikel van Ewoud Sanders 'Krijg alles' in het NTMM (2006;14:20), wil ik U de cartoon, die ik al weer enige jaren geleden voor het blokboek 'Infectie en afweer' in het curricula Gneeskunde en Biomedische Wetenschappen maakte, niet onthouden. Een aantal studenten vraagt ons ieder jaar daadwerkelijk om de goede antwoorden.

Met vriendelijke groet,  
Prof. dr. J.W.M. van der Meer

Zie voor de antwoorden pagina 57.

### Oefenvraag\*



Noteer de activerende gegevens.  
Geef aan hoeveel infectieziekten in deze cartoon aan de orde komen.  
Geef van iedere infectie aan of deze:  
 in Nederland wordt verkregen;  
 als importziekte voorkomt;  
 als ziekte nog bestaat.

# *Salmonella typhimurium* en de gastheer: pathogeen-gastheerinteractie, immuunontduiking en persistentie

Dr. A. van Diepen, Dr. R. Janssen, Prof. dr. J.T. van Dissel

Trefwoorden: *Salmonella typhimurium*, pathogeen-gastheerinteractie

## Inleiding

*Salmonella* is een staafvormige bacterie die overal in de natuur voorkomt. De meeste *Salmonella*'s veroorzaken geen ziekte omdat ze niet kunnen overleven in de weefsels van dieren of mensen, en bevolken slechts de natuur of het riool. Er is echter een aantal soorten die wel het vermogen heeft in de gastheer te overleven en dit zijn de soorten die verantwoordelijk zijn voor ziekte bij mens en dier. *Salmonella*-infecties zijn een van de meest voorkomende water- en voedselgerelateerde infecties in de wereld: in ontwikkelingslanden met een slechte hygiëne- en watervoorziening vormen ze een groot algemeen gezondheidsprobleem, terwijl de bacterie in westerse landen is gelieerd aan bepaalde voedingsindustrieën en met name een bedreiging vormt voor mensen met een niet goed functionerend afweersysteem. Ziektebeelden variëren van een asymptomatisch dragerschap waarbij de bacteriën in de darm blijven en via de ontlasting worden uitgescheiden, tot gastro-enteritis, focale infectie of levensbedreigende sepsis. Het ziektebeeld is afhankelijk van de *Salmonella*-stam waarmee iemand besmet raakt en betreft meestal besmettingen met *Salmonella enterica* of *Salmonella typhimurium* via met dierlijk afval besmet voedsel of water.

Bacteriën die de natuurlijke barrières, onder andere een lage pH in de maag en competitie met natuurlijke darmflora, overleven zullen uiteindelijk in de dunne darm de Peyerse platen bereiken waarin zich de M-cellen bevinden. *Salmonella* invadeert deze M-cellen en afhankelijk van de *Salmonella*-stam, kunnen twee ziektebeelden optreden. Bij infectie met de tyfoïde stammen *Salmonella typhi* of *Salmonella paratyphi*, stammen die alleen infectie bij mensen veroorzaken, zullen de bacteriën zich verspreiden naar de onderliggende lymfoïde weefsels en zullen ze macrofagen binnentreden. De bacteriën komen vervolgens in het bloed terecht, bereiken de lever en de milt en veroorzaken een ernstige ontstekingsreactie (inflammatoire respons) die tyfoïde koorts of buiktyfus wordt genoemd en in tien procent van de gevallen dodelijk is als de patiënt niet met antibiotica wordt behandeld. Wanneer het echter een infectie met de niet-tyfoïde stammen betreft zoals

*S. typhimurium*, blijven de bacteriën in de Peyerse platen en induceren daar een inflammatoire reactie die gemedieerd wordt door cytokines, chemokines en neutrofiële granulocyten. Deze vorm van infectie wordt gastro-enteritis genoemd, leidt tot diarree en gaat na een aantal dagen vanzelf over. Bij bepaalde patiënten, zoals mensen met een minder goed functionerend immuunsysteem, kan infectie met deze in principe ongevaarlijke stam wel leiden tot ernstige ziekte. Een ander probleem van *S. typhimurium* zijn de terugkerende infecties. Patiënten krijgen dan wederkerende infecties met hetzelfde isolaat. Dit is beschreven voor onder andere patiënten met aids en mensen met een specifieke cellulair afweerstoornis, zoals IL12Rβ1-deficiënte patiënten, of zij die bestraling ondergaan of behandeld worden met glucocorticosteroiden.

Bij de meeste wetenschappelijke onderzoeken naar *Salmonella* wordt gebruikt gemaakt van een *in-vivo*-muismodel. Infectie met *S. typhimurium*, dat bij mensen meestal in gastro-enteritis resulteert, leidt bij muizen tot een ziektebeeld dat overeenkomt met tyfoïde koorts en is daarom een model voor humane infectie met *S. typhi* of *S. paratyphi*. De natuurlijke infectieroute betreft een orale besmetting, maar experimentele infecties kunnen ook intraveneus, intraperitoneaal, of subcutaan worden geïnitieerd. Zodra de bacteriën in het bloed terechtkomen, verlopen al deze infecties op dezelfde wijze en gelijken op het verloop van tyfoïde koorts bij de mens. Binnen een paar dagen verspreiden de bacteriën zich naar de lever en de milt waar ze verblijven en zich vermenigvuldigen in residente macrofagen. Dit leidt uiteindelijk, samen met de influx van immuuncellen (neutrofiële granulocyten en exsudaat macrofagen), tot een vergroting van de lever en de milt (hepatosplenomegalie). Afhankelijk van het soort muis en het inoculum zullen de muizen als gevolg van de infectie doodgaan, of er wordt een immuunrespons

Dr. A. van Diepen<sup>1</sup>, Dr. R. Janssen<sup>2</sup>, Prof. dr. J.T. van Dissel<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>UMC St Radboud, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen, <sup>2</sup>Leids Universitair Medisch Centrum, afdeling Infectieziekten, Postbus 9600, 2300 RC Leiden.

geïnduceerd waardoor de muizen in leven blijven en beschermd zullen zijn tegen een tweede infectie.

Natuurlijke bescherming tegen een *S. typhimurium*-infectie wordt onder meer bepaald door de genen *ity* en *lps*. *Ity* is het gen dat codeert voor *Nramp1*, een membraan fosfoglycoproteïne dat alleen tot expressie wordt gebracht door macrofagen van het mononucleaire fagocytensysteem in lever en milt, dat betrokken is bij de weerstand tegen *Salmonella*. Muizen die het resistente allel van *Nramp1* (*Nramp1*<sup>G169</sup>) tot expressie brengen kunnen de groeisnelheid van *S. typhimurium* *in vivo* controleren zodat er voldoende tijd ontstaat om een T-celgemedeerde immuunrespons te initiëren die nodig is voor de uiteindelijke klaring van de bacteriën. Muizen die het gevoelige allel *Nramp1*<sup>D169</sup> tot expressie brengen kunnen de bacteriegroei echter in het geheel niet beteugelen en zullen na injectie van slechts enkele bacteriën komen te overlijden. Expressie van *Nramp1* wordt verhoogd na activatie van de macrofagen door IFN $\gamma$  en LPS. Een tweede gen dat in de eerste fase van de infectie een zekere bescherming biedt is *lps*, dat codeert voor *Toll-like receptor 4* (TLR4). TLR4 is een receptor die is betrokken bij de herkenning van lipopolysacharide (LPS), een belangrijke component van de buitenmembraan van Gramnegatieve bacteriën zoals *Salmonella*. Deze receptor raakt door LPS geactiveerd en geeft hierop een signaal door dat de celkern instrueert om specifieke genen af te schrijven en bepaalde cytokines te maken, waaronder  $\gamma$ IL12, IL-18 en TNF $\alpha$ . Deze cytokines spelen een belangrijke rol bij de activatie van macrofagen tot verhoogde microbicide activiteit en dus bij de afweer tegen *S. typhimurium*. Muizen met een mutatie in het gen dat codeert voor TLR4, zoals C3H/HeJ-muizen, kunnen niet op LPS reageren als gevolg van een niet-functionerend TLR4 en blijken extreem gevoelig voor *S. typhimurium*-infecties.

Bij de afweer tegen *S. typhimurium* spelen macrofagen een centrale rol. Deze cellen, letterlijk de grote eters, nemen bacteriën op en zijn uitgerust met een scala aan mechanismen om micro-organismen intracellulair te doden. *S. typhimurium* heeft zich hieraan echter aangepast en is in staat om te overleven en zelfs te delen in dit vijandige milieu. Een belangrijk onderdeel van de bacteriedodende mechanismen van de macrofaag betreft de productie van zuurstofradicalen. Deze radicalen zijn schadelijk voor alle levende cellen, bacteriën inbegrepen, en zouden eveneens *S. typhimurium* doden ware het niet dat deze bacterie specifieke mechanismen heeft geëvolueerd om zich aan de schadelijke zuurstofradicalen te onttrekken. In het genoom van *Salmonella* bevinden zich twee pathogeniciteitseilanden (SPI-1 en SPI-2) die coderen voor type-III-secretiesystemen (TTSS). De eerste, SPI-1, is een TTSS dat betrokken is bij de opname door de cel. Het codeert voor een soort injectiespuit waarmee bacteriële eiwitten in de cel worden gebracht. Als gevolg hiervan treden veranderingen op in het cytoskelet en de membraan

van de cel en dirigeert de bacterie zijn opname, zelfs door normaal niet-fagocyterende cellen. Dit proces wordt *Salmonella*-geïnduceerde opname genoemd. *S. typhimurium* komt terecht in een vacuole, het fagosoom, waar het kan overleven doordat het tweede TTSS, gecodeerd door SPI-2, in werking treedt. Hierbij worden opnieuw bacteriële eiwitten in het cytoplasma van de gastheercel geïnjecteerd waardoor antibacteriële processen worden verstoord en *S. typhimurium* overleeft. Zo wordt via SPI-2-gecodeerde eiwitten onder andere voorkómen dat superoxide kan worden geproduceerd: de bacteriële eiwitten voorkómen translocatie en vorming van een actief NADPH-oxidase-complex. Naast SPI-1- en SPI-2-gecodeerde eiwitten spelen ook andere genen zoals *soxR/S*, *phoP/Q* een belangrijke rol in de afweer tegen superoxide en in overleving in de gastheer.<sup>1</sup> Onderzoek naar de rol van superoxidieresistentiegenen in de overleving van *S. typhimurium* in macrofagen en muizen, en onderzoek naar wederkerende *Salmonella*-infecties, leidt uiteindelijk tot meer inzicht in de strategieën die *Salmonella* heeft geëvolueerd om te kunnen overleven. Een belangrijke complicatie van *S. typhimurium*-infecties bij sommige gastheren is het steeds terugkeren van de infectie, ondanks schijnbaar adequate antibiotische behandeling. De infectie wordt opgeruimd en de patiënt herstelt, maar toch ziet *Salmonella* de kans om zich schuil te houden voor het immuunsysteem, te overleven en weer toe te slaan zodra het immuunsysteem de teugels weer laat varen. Het is nog niet precies bekend in welke cellen en waar *Salmonella* zich schuilhoudt en welke processen een rol spelen bij de onderdrukking van groei tijdens de fase waarin *Salmonella* zich stil houdt (persistentie/latentie fase). Dergelijke wederkerende *S. typhimurium*-infecties komen voor bij patiënten met een ernstige afweerstoornis, ten gevolge van onderliggend lijden, bestraling, chemotherapie, een andere infectie zoals hiv/aids of zeldzame aangeboren afweerstoornissen zoals IL12 $\beta$ 1-receptordeficiëntie. Recentelijk hebben wij een *in-vivo*-muizenmodel beschreven waarbij reactivatie van de *S. typhimurium*-infectie wordt bewerkstelligd door middel van bestraling of depletie van CD4<sup>+</sup> T-cellen.<sup>2</sup> Met dit reactivatiemodel werd aangetoond dat CD4<sup>+</sup> T-cellen een centrale rol spelen bij de voortdurende onderdrukking van replicatie van *S. typhimurium* tijdens de fase van persistentie. Sinds een aantal jaren wordt er bij de behandeling van patiënten met reumatoïde artritis en de ziekte van Crohn gebruikgemaakt van monoklonale antistoffen gericht tegen TNF- $\alpha$ , het infliximab of ethanercept. Deze vorm van behandeling werkt bij deze patiënten opmerkelijk goed, maar een belangrijke beperking van deze vorm van behandeling is het opspelen van infecties door intracellulaire pathogenen, zoals *Mycobacterium tuberculosis*. Het betreft waarschijnlijk een verhoogde gevoeligheid voor een nieuwe infectie, maar ook reactivatie van voorheen latent aanwezige infecties. Zoals vermeld bestaat de behandeling uit het toedienen van monoklonale antilichamen gericht



tegen tumornecrose factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  speelt als cytokine een belangrijke rol bij de activatie van macrofagen en opbouw van weefselgranulomen, en ook bij de afweer tegen pathogenen als *Salmonella*. In dierexperimentele modellen leidt neutralisatie van TNF- $\alpha$  tot een ernstiger beloop van een *Salmonella*-infectie, maar of deze behandeling ook tot een reactivatie van een latente *Salmonella*-infectie leidt, zoals bij latente *Mycobacterium tuberculosis*-infecties, is nog onbekend.

In het chronisch reactivatiemodel hebben wij onderzocht of TNF- $\alpha$  ook een rol speelt bij de voortdurende onderdrukking van *S. typhimurium* tijdens de fase van microbiële persistentie bij muizen. Wij vonden echter geen reactivatie van latente *S. typhimurium*-infectie na behandeling van de muizen met een antilichaam gericht tegen TNF- $\alpha$ . Evenmin had toevoeging van anti-TNF- $\alpha$  aan IFN $\gamma$ -gestimuleerde macrofagen van muizen (RAW264.7-cellen) geen nadelig effect, met andere woorden: de neutraliserende antistoffen remden de IFN $\gamma$ -gemedieerde activatie van macrofagen en inperking van intracellulaire uitgroei van *S. typhimurium* niet. Dit kan erop duiden dat TNF- $\alpha$  slechts een ondergeschikte rol speelt aan IFN $\gamma$  wat betreft de verworven afweer tegen infectie met *S. typhimurium*. Zolang het IFN $\gamma$ , geproduceerd door CD4<sup>+</sup> T-cellen aanwezig blijft, wordt de latent aanwezige *S. typhimurium* onderdrukt en wordt reactivatie van de infectie voorkomen.

Bij het onderzoek naar overlevingsstrategieën van *S. typhimurium* in gastheercellen hebben wij mutanten geselecteerd die in staat bleken langer te overleven in macrofagen. Deze mutanten werden verkregen door random MudJ-transposoninsertie met betrekking tot faag-P22-transductie. Na screening bleven er twee mutanten over op grond van inversie-PCR en sequentieanalyse die op een en dezelfde mutatie bleken te berusten, omdat het MudJ-transposon op vrijwel dezelfde plaats in het bacteriële genoom was ingebouwd. Het door MudJ-transposoninsertie geïnactiveerde gen betrof *rmlC*, een gen dat codeert voor dTDP-4-deoxyrhamnose 3,5-epimerase, een enzym dat is betrokken bij de vorming van het O-antigeen van het lipopolysaccharide (LPS). Analyse van het LPS van de mutantstammen bevestigde dat de mutanten een sterk verkort LPS hadden, en daarmee gelijkenis toonden met een *S. typhimurium*-stam met het ruwe, Ra-chemotype. Dit is een mutant die het O-antigeen mist en alleen het lipide A-deel en het core van het LPS over heeft. Bij controle bleek ook deze Ra-mutant in staat te persisteren in RAW264.7-cellen, en was deze bacterie zelfs na 48 uur incubatie nog in hoge aantallen aanwezig, klaarblijkelijk zonder de cellen te lyseren. Desondanks bleken de mutanten toch niet in staat om bij muizen een ernstige infectie te veroorzaken, een bevinding die niet kon worden verklaard door een verhoogde gevoeligheid van de bacteriën voor complement-gemedieerde lysis.

Naast bovengenoemde werd door random MudJ-transposoninsertie in *wildtype-S. typhimurium* 14028s diverse

mutanten verkregen die werden geselecteerd op een verhoogde gevoeligheid voor het superoxide-genererende agens menadione. Dit werd bewerkstelligd door na random MudJ-insertie vele kolonies te strijken op agarplaten met en zonder menadione en juist die mutanten te selecteren die niet groeiden op de platen met menadione maar wel op de controleplaat zonder menadione. Aldus geïsoleerde superoxidegevoelige mutanten werden hierna getest op hun vermogen binnen RAW264.7-macrofagen te overleven. Van de mutanten met een biologisch interessant fenotype werd met behulp van inverse-PCR en sequentieanalyse bepaald in welk gen het MudJ-transposon was ingebouwd. In één van deze mutanten bleek het MudJ-transposon te zijn ingebouwd in de promotorregio van het gen *pnp* dat codeert voor PNPase, een enzym dat betrokken is bij de afbraak van RNA en bij de adaptatie van groei bij lage temperaturen; het gen wordt algemeen gezien als een regulator van virulentie en persistentie van *S. typhimurium*. Wij beschrijven een additionele rol voor PNPase in de resistentie tegen superoxide en in overleving in macrofagen.

Bij het onderzoek naar de rol van superoxideresistentiegenen beschrijven we ook de isolatie en karakterisatie van DLG294, een *S. typhimurium*-mutant waarbij het MudJ-transposon een voorheen onbekend gen had geïnactiveerd, genaamd *sspJ*.<sup>3</sup> Het eiwit SspJ wordt niet langer in de mutant gevormd en dit zorgt ervoor dat de mutant veel gevoeliger is geworden voor menadione, een redox-cycling agens dat superoxide radicalen genereert in de bacterie. DLG294 bleek minder virulent te zijn *in vitro* in macrofagen en *in vivo* bij muizen. Door *sspJ* op een plasmide constitutief tot expressie te brengen in DLG294 werd het fenotype van de mutant hersteld tot dat van de wildtype stam. Dit bevestigde de rol van SspJ in de afweer tegen superoxide en in virulentie van de bacterie, maar de exacte rol en manier van functioneren dienen nog verder te worden onderzocht.

Uit nader onderzoek van DLG294 *in vivo* bij muizen bleek dat deze mutant bijna geen granulomateuze laesies in de lever induceert na subcutane infectie van *Salmonella*-resistente (Ity<sup>r</sup>) C3H/HeN-muizen. Ook bleken de aantallen bacteriën 3<sup>10</sup>log lager dan die van de wild-type bacteriestam, gemeten op dag 5 na start van de infectie.<sup>4</sup> Daarentegen bleek DLG294 wel even virulent als wildtype en induceerde het een vergelijkbare leverpathologie bij p47<sup>phox</sup>-muizen, die een functioneel NADPH-oxidase-systeem ontberen door het afwezigheid van p47<sup>phox</sup> en dus geen superoxide kunnen genereren. Ook in beenmerg-macrofagen van deze p47<sup>phox</sup>-muizen en in X-CGD PLB985-cellen was de uitgroei van DLG294 gelijk aan die van de wild-type stam. Deze resultaten suggereren dat SspJ een belangrijke rol speelt bij het vermogen van de bacterie om oxidatieve stress het hoofd te bieden, en daarmee in overleving van *S. typhimurium* binnen macrofagen en virulentie bij muizen.

Zoals gezegd, macrofagen spelen een belangrijke rol bij *Salmonella*-infecties. Ze spelen een dubbelrol, namelijk die van gastheer- en effectorcel. De *Salmonella*-mutant DLG294 is gevoeliger voor superoxide en geattenuëerd in macrofagen. Naast superoxide zouden andere processen eveneens een rol kunnen spelen. Immers, na een infectie met *S. typhimurium* wordt de macrofaag geactiveerd om de intracellulaire bacteriën te doden. Hierbij spelen diverse mechanismen een rol. Met behulp van Affymetrix *genechip*-analyse is nagegaan wat het effect is van wildtype- en DLG249-infectie op de genexpressie in de macrofagen. Met deze chip kunnen 6.400 genen tegelijkertijd worden bestudeerd. Wild-type *S. typhimurium* en de mutantstam DLG294 bleken beide de expressie van vele genen te beïnvloeden, maar toch waren er geen grote verschillen waar te nemen tussen beide bacteriestammen. Hieruit werd geconcludeerd dat het feit dat DLG294 nauwelijks in staat is om uit te groeien binnen macrofagen, te wijten is aan de bacterie zelf, dat is de inactivatie van *sspJ*, en secundair is aan een veranderde activatiestatus van de macrofagen ten opzichte van wild-typegeïnfecteerde macrofagen.

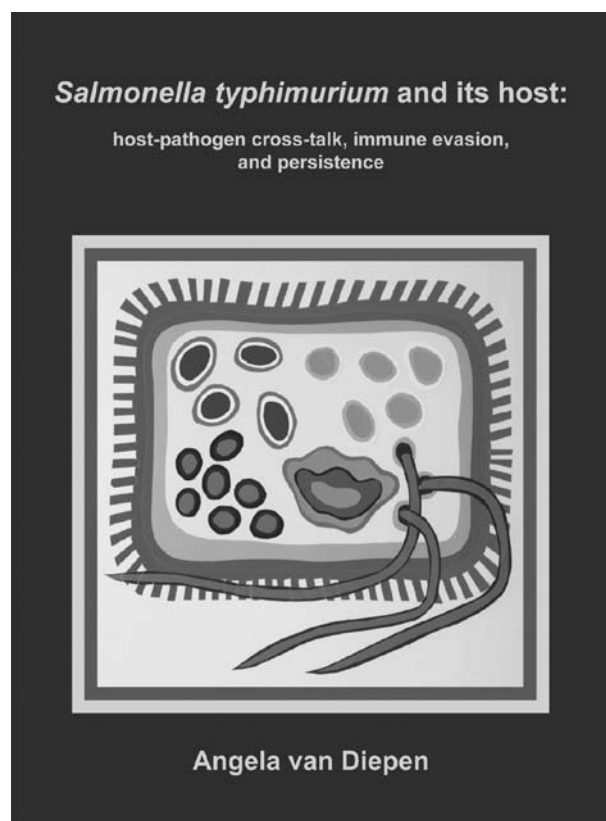
Omdat het nog steeds onduidelijk was waarom DLG294 geattenuëerd is en welke rol *SspJ* precies speelt, werd het fenotype van DLG294 nader bestudeerd met behulp van een fenotypische *array*, een methode waarbij tegelijkertijd honderden processen kunnen worden bestudeerd. Het fenotype van DLG294 is vergeleken met de wild-typestam en toonde dat DLG294 beter in staat was om stikstofbronnen te gebruiken voor groei, maar dat het daarnaast gevoeliger is voor een groot aantal antibiotica en voor hoge of lage pH. Daarnaast werd nagegaan of de genexpressie van intracellulaire gelegen DLG294 verschilde van de genexpressie van intracellulaire gelegen wild-type *S. typhimurium*. Opnieuw bleek dat er slechts een gering verschil was tussen de mutantstam DLG294 en de wild-typestam. Uit de combinatie van deze bevindingen, namelijk geen verschil in de bacteriële genexpressie na opname door de macrofaag, geen verschil in genexpressie van het macrofagenoom na opname van de bacteriën, en de fenotypische *array* van wild-type- en mutant-*Salmonella* werd geconcludeerd dat *SspJ* een belangrijke rol speelt bij het instandhouden van de membraanintegriteit van *Salmonella*. In de mutant DLG294 veroorzaakt een verlies aan membraanintegriteit het doorleken van schadelijke stoffen, zoals superoxide of menadione, of pH-veranderingen, hetgeen deze stam gevoeliger maakt voor de antimicrobiële effectormechanismen in de gastheercellen.

### Concluderende opmerkingen

*Salmonella* heeft complexe mechanismen ontwikkeld om te kunnen omgaan met antimicrobiële effectormechanismen van gastheercel de macrofaag, inbegrepen de reactieve zuurstofradicalen die worden geproduceerd bij opname van de bacteriën. *Salmonella* bezit verschillende afweerbarrières die ofwel de productie van zuurstofradicalen kunnen

voorkomen ofwel de aangerichte schade door de weinige schadelijke stoffen die toch gevormd wordt, zoveel mogelijk kunnen beperken. Daarnaast moet elk (micro)organisme (onder andere *Salmonella* en *Escherichia coli*) dat in de aanwezigheid van zuurstof (aëroob) groeit, in staat zijn zichzelf te beschermen tegen de zuurstofradicalen die nu eenmaal in het metabolisme, door het organisme, zelf worden geproduceerd. Ook kan door invloeden vanuit de omgeving de superoxideconcentratie in de cel toenemen, bijvoorbeeld na opname van redox-cycling agentia.

Uitgebreid onderzoek naar mutanten van *E. coli* en *Salmonella* heeft onze kennis over afweermechanismen tegen zuurstofradicalen belangrijk vergroot. Maar, zoals ook in het proefschrift staat beschreven, is het op dit moment niet mogelijk om aan de hand van het *in-vitro*-fenotype van een mutant te voorspellen hoe deze zich *in vivo* zal gedragen. Hoewel mutanten die extreem gevoelig zijn voor extracellulair superoxide over het algemeen geattenuëerd zijn in dierexperimentele modellen *in vivo*, is het toch onvoorspelbaar of met deze selectiecriteria inderdaad alle genen worden geïdentificeerd die essentieel zijn voor de intracellulaire overleving en virulentie van *Salmonella*. Ook is duidelijk dat er verschillende afweerbarrières tegen reactieve zuurstofradicalen zijn. Sommige van deze mechanismen zijn alleen van belang bij het omgaan met reactieve zuurstofradicalen in het milieu en bepalen de fitheid van *Salmonella*, terwijl andere mechanismen ook van cruciaal belang zijn voor virulentie en bepalen daarmee de overlevingskansen van *Salmonella*



in de gastheer. Nieuwe technieken, zoals *microarray*-analyse, hebben bijgedragen aan onze kennis over de verschillende genen en regulons die zijn betrokken bij afweer tegen oxidatieve stress. Zo kan ook de reactie van *Salmonella* op intra- of extracellulairgegenereerde superoxidestress worden onderzocht en de bijdrage van mogelijke virulentiegenen worden bevestigd.

### Summary

*Salmonella* has evolved complex mechanisms to cope with ROI (reactive oxygen intermediates), and it is clear that different defense barriers exist that either prevent production of these compounds altogether or limit the damage that is done by the low amounts of toxic compounds that are still produced. In addition, like every aerobically growing organism, *Salmonella* and *E. coli* also have to protect themselves from endogenously produced ROI or environmental conditions that increase the endogenous superoxide concentration. Several 'barriers of defense' against ROI exist. Some of these mechanisms may only be important for coping with ROI-inducing substances in the environment and may in this way determine *Salmonella* fitness, whereas other mechanisms are crucial

for virulence and determine survival of *Salmonella* within the host. Novel techniques, such as microarray analysis, have already contributed to our understanding of the various oxidative stress regulons. In the near future more extensive use of such techniques to analyze the response of *Salmonella* or *E. coli* to either intracellular or extracellular superoxide stress will give a more detailed view of the regulons induced, and from this point the contribution of candidate genes to virulence can be established.

### Referenties

1. Janssen R, Straaten T van der, Diepen A van, Dissel JT van. Responses to reactive oxygen intermediates and virulence of *Salmonella typhimurium*. Review. *Microbes Infect* 2003;5:527-34.
2. Diepen A van, Gevel JS van de, Koudijs MM, Ossendorp F, Beekhuizen H, Janssen R, et al. 2004. Gamma irradiation and CD4+ T cell depletion causes reactivation of latent *Salmonella typhimurium* infection in C3H/HeN Mice. *Infect Immun* 2004;73:2857-62.
3. Straaten T van der, Diepen A van, Kwappenberg K, Voorden S van, Franken K, Janssen R, et al. Novel *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* protein that is indispensable for virulence and intracellular replication. *Infect Immun* 2001;69:7413-8.
4. Diepen A van, Straaten T van der, Holland SM, Janssen R, Dissel JT van. A superoxide-hypersusceptible *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mutant is attenuated but regains virulence in p47(phox-/-) mice. *Infect Immun* 2002;70:2614-21.

Bijsluiter

Bijsluiter

# In gesprek met Roel Coutinho

Dr. H.F.L. Wertheim

Op vrijdagmiddag, 24 februari jl. reed ik naar het Centrum Infectieziektebestrijding (CIb) in Bilthoven voor een gesprek met Roel Coutinho (figuur 1). Een jaar na zijn aanstelling als hoofd van dit centrum was een mooi moment voor een interview.

Wat zijn de drijfveren van Roel Coutinho, zijn achtergrond, zijn visie over het CIb en de arts-microbioloog? Graag breng ik verslag uit van dit gesprek.

Vlakbij het RIVM-terrein aangekomen, tevens het huis van het CIb, verwachte ik daar behalve de bewegwijzering richting RIVM en het Nederlands Vaccin Instituut, ook een bordje Centrum Infectieziektebestrijding aan te zullen treffen. Dit was echter niet het geval (figuur 2).

Deze vrijdag werd tevens bekend gemaakt dat aviaire influenza bij een Frans pluimveebedrijf was aangetroffen. Tevoren heb ik voor de zekerheid nog even met het CIb gebeld of de afspraak wel doorging, omdat elke kip met vogelgriep voor veel mediaheisa zorgt. "Was mijn plek nu niet bezet door de NOS of andere journalisten"? Nee, het interview voor het *Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie* ging gewoon door. Op de bestemming aangekomen trof ik wel een hectische situatie aan, hetgeen wel consequenties had voor de duur, maar niet voor de inhoud van het gesprek.

## Hoe bevalt de overstap van de GGD Amsterdam naar het CIb?

Coutinho: "Bij de GGD Amsterdam was ik verantwoordelijk voor de gehele openbare gezondheidszorg. Nu houd ik mij eigenlijk alleen met de infectieziekten bezig en dat vind ik ontzettend leuk. Wel mis ik Amsterdam buitengewoon, vooral de sfeer. Ik had een fantastische werkkamer midden in de stad. Ik kon tussen de middag een broodje gaan eten met een haring. Kom daar hier maar eens mee, dat is hier wel heel anders. En dat mis ik wel heel erg. Ik heb lang in Amsterdam gewerkt (sinds 1977, red.) en dan ben je een beetje vergoed met zo'n stad."

Qua organisatie is het bij het CIb organisatorisch wat ingewikkelder omdat er zo ontzettend veel verschillende structuren zijn. Je hebt met ministeries te maken, en hier met een instituut dat niet gewend is om zelf in de frontlijn te staan. Dat is een groot probleem en dat merk je. Het instituut doet precies wat het zegt: onderzoek in dienst

Figuur 1. Roel Coutinho.



Figuur 2. Wel een Whisky-Wijnhandel, maar geen Cib!



van mens en milieu. Dat wil zeggen dat je onderzoek doet, maar veel minder gewend om meteen actie te ondernemen als er een probleem is. Als microbioloog in een ziekenhuis wordt je ineens gebeld over een probleem met een patiënt en dat moet je dan oplossen. Dan kan je niet zeggen: 'dat doe ik overmorgen wel'. Je merkt dat direct actie ondernemen hier wel wat spanningen geeft. Zelf kom ik wel uit zo'n cultuur: de GGD is een 'doe-bedrijf': verslaafden, laboratoria, ambulances, en infectieziektebestrijding.

Het is ook iets wat het LCI altijd wel heeft gedaan, maar de andere onderdelen hier, behalve de diagnostische onderdelen, zijn dit niet zo gewend. En dat geeft spanningen. En dat kan je alleen aanpakken doordat het uiteindelijk een probleem wordt. Het feit dat het een confrontatie wordt, dát is de verandering. Daar kan je geen plan voor maken, dit moeten de mensen voelen. Je ziet dat enkele mensen dat goed oppakken, maar deze cultuurverandering is lastig. Het is echt een spanningsveld hier."

#### **U bent arts-microbioloog, hoe is dat gegaan?**

"Het was eigenlijk helemaal niet mijn bedoeling; het is puur toeval. Ik ben slechts een paar maanden huisarts geweest, toen ben ik microbioloog geworden. Daarvoor was ik tropenarts in Afrika. Ik kwam terug uit Afrika en wist niet zo goed wat ik moest gaan doen. Ik wilde internist worden, maar er bleek een hele lange wachttijd voor de opleiding. Ik ben toen onderzoek gaan doen op het laboratorium van Dekking en Van der Noordaa in Amsterdam (AMC, red.). En die zeiden: "nu je hier toch zit kan je wel meteen die opleiding gaan doen". Die opleiding stelde toen niet zoveel voor; het was ook helemaal niet goed geregeld. Als de hoogleraar zei dat je daar drie jaar in opleiding was geweest, dan kreeg je gewoon je diploma. Mijn kennis over de microbiologie was onvoldoende.

Nadat ik microbioloog was geworden moest ik een keuze maken. Ik kon als microbioloog terug naar Afrika als hoofd van een laboratorium daar. Dat leek mij leuk, maar heb ik uiteindelijk toch niet gedaan omdat ik toen al een kind had, en mijn vrouw had een baan. Uiteindelijk ben ik bij de GGD gaan werken. Iedereen zei: 'Je bent gek, infectieziektebestrijding is een totaal oninteressant gebied, daar valt nooit meer iets in te beleven'. Tja, dat is wel heel anders gegaan.

Na mijn opleiding werd ik ineens verantwoordelijk voor het hele diagnostische laboratorium van de GGD. Maar daar wist ik eigenlijk veel te weinig van. Dat zou nu absoluut niet meer kunnen, en terecht. Ik ben dus eigenlijk min of meer bij toeval in de microbiologie gerold. Ik heb nu het gevoel dat het vak professioneler is geworden. Het is ook boeiender geworden omdat de microbioloog steeds meer een rol in de ziekenhuizen is gaan spelen. En veel leuke mensen; het is een ander type mens geworden, vind ik.

Verder heb ik ook in de pokkenbestrijding gezeten. Dat was ook mijn reden om in de openbare gezondheidszorg en infectieziektebestrijding te gaan werken. Ik heb dat drie maanden in Bangladesh gedaan met de CDC en vond dat ongelooflijk interessant. Ik heb nog wel heel lang klinische virologie gedaan, daar wist ik wel van. Ik heb lang het klinisch virologisch laboratorium bij de GGD gedaan; zeker een jaar of tien, totdat Gerard van Doornum kwam. Verder heb ik korte tijd bacteriologie gedaan, maar toen dacht ik 'Nee, dit gaat niet', en gelukkig is er toen iemand anders gekomen."

#### **Bent u lid van de Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie?**

Ik was daar vroeger lid van, denk ik, maar heb dat kennelijk op een gegeven moment laten zitten. Geen idee wanneer en waarom, waarschijnlijk slordigheid. Enfin, nu ben ik weer lid! (sinds 2005, red.)

#### **Hoe kijkt u nu aan tegen de arts-microbioloog en zijn toekomst?**

Coutinho aarzelt en zegt: "Dat vind ik moeilijk te beoordelen. Het lastige in de microbiologie is, dat je een enorme druk hebt van de technische kant. Zo krijg je mensen met een niet-medische achtergrond die technisch gezien veel beter op de hoogte zijn. Dat de moleculair-biologen in opmars zijn, is onvermijdelijk. Je ziet dat de arts-microbioloog de functie gaat vervullen tussen het ziekenhuis en het laboratorium. Daarvoor zou een goede vorm moeten worden gevonden, want je kunt niet zonder die andere mensen. Een medisch-microbiologisch laboratorium zonder die kennis kan eigenlijk helemaal niet.

Je ziet dus de opmars van de technici, en aan de andere kant de clinicus die zegt: "ho, wacht eens even, dat is mijn veld". Er komen ook andere antivirale middelen aan, dus ik denk dat het een boeiend vak blijft. En wat ik ook hoop is dat er artsen-microbioloog zijn met belangstelling voor de openbare gezondheidszorg. Een tijd lang was er alleen interesse in het ziekenhuis en was men helemaal niet geïnteresseerd in openbare gezondheidszorg. Nu merk ik dat dat terugkomt.

Wat ik ook erg leuk vind zijn die WOGIZ-mensen. Het is leuk om daarbij te zijn; ik heb dat in het begin wat verkeerd ingeschat. Daar zitten veel mensen die de openbare gezondheidszorg gewoon leuk vinden! En dat is precies wat wij nodig hebben natuurlijk. Want die scheiding tussen het ziekenhuis en wat daarbuiten gebeurt is soms wat kunstmatig. Die resistentieproblematiek is nu nog vooral een probleem voor het ziekenhuis, maar je ziet, zoals met de MRSA, dat dat in de omgeving gaat toenemen. De rol van de arts-microbioloog zal zich dus ook meer buiten het ziekenhuis gaan afspelen. En dat vind ik een goede ontwikkeling."

**Vorig jaar hield u een toespraak tijdens de NVMM-voorjaarsvergadering, waar u uw gedachten over het Clb ontvouwde. U noemde dat bij elke verandering het ‘venijn’ in de staart zit. Hoe staat het met dat ‘venijn’?**

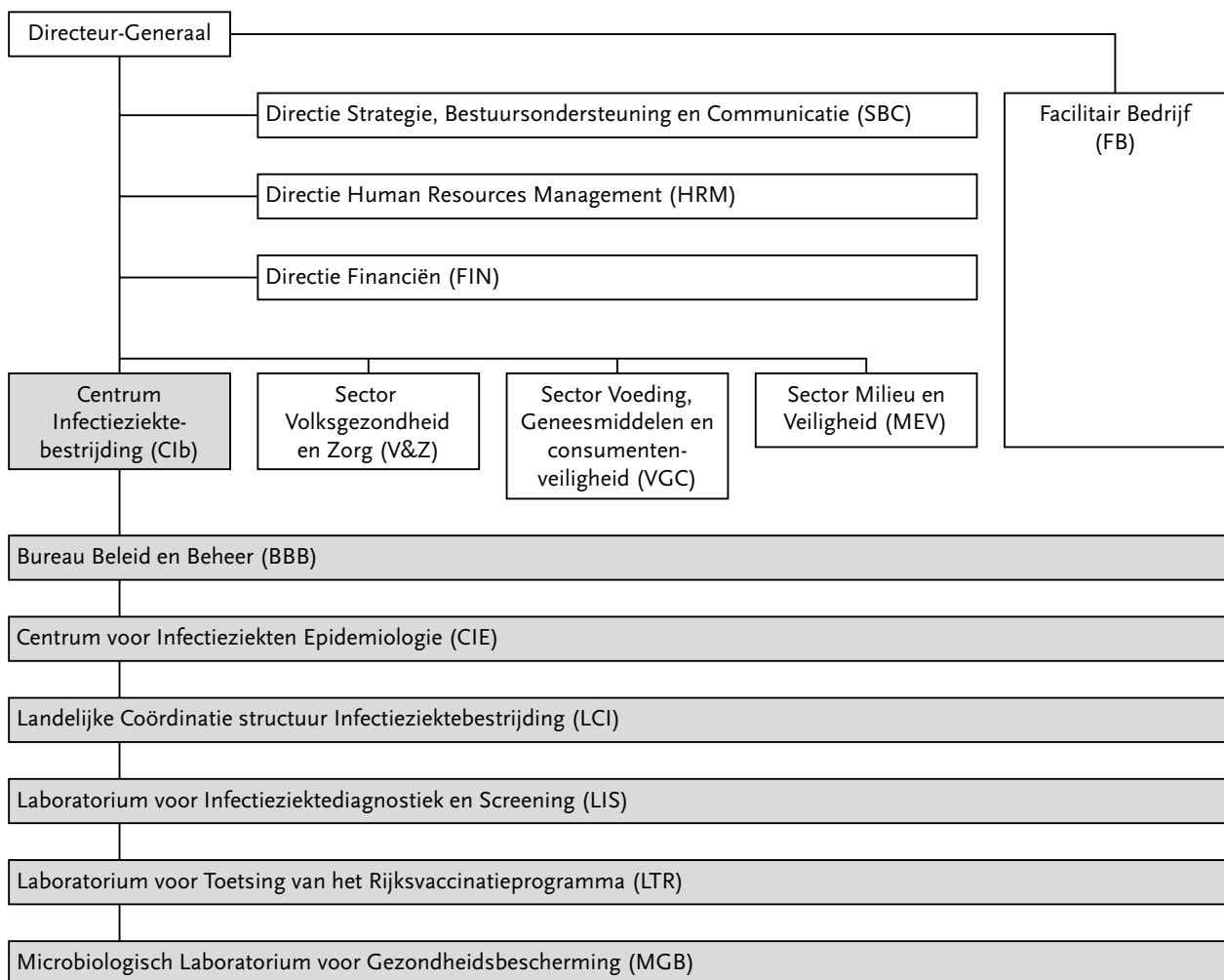
Coutinho: “Dat gaat goed. Achteraf gezien was die opmerking voorbarig. Ik heb toen aangeven hoe ik het zou willen doen, onder andere door het aantal samenwerkingen met laboratoria te beperken. Daar is veel reactie op geweest en veel mensen waren het daar ook niet mee eens. Het heeft een hoop los gemaakt, wat weer wat reparatiewerk nodig maakte. Bij de reparaties heeft Jan van den Noordaa een bemiddelende rol gespeeld.

Ik dacht gemakkelijk de streeklaboratoria te kunnen reorganiseren. Dit bleek niet zo eenvoudig te zijn. Wij zijn nu bezig, in goed overleg met de WOGIZ, een plan te maken hoe we de medische microbiologie in de regio kunnen versterken. We zijn onder andere graag willen dat er op den duur een soort microbiologisch consulent

per regio komt, en een samenwerking daarna. (Dit plan is vastgelegd in de Notitie Haringhuizen, red.). Ik denk dat dit plan een goede kans maakt en dat iedereen daar wel achterstaat.

We willen wel graag dat de regio’s meer gaan samenwerken, maar niet dat er één streeklaboratorium per regio is. Het kan heel goed zijn dat er meerdere laboratoria zijn in een bepaalde regio die bijvoorbeeld per GGD werken. Als een GGD een goede relatie heeft met een bepaald laboratorium, willen wij dat niet in de weg staan. Waarom zouden we eigenlijk? Er is helemaal geen bezwaar tegen meerdere laboratoria als ze maar aan de eisen voldoen. De idee is dat de GGD de opdrachtgever wordt en niet het Clb. Daar wil ik nu niet al te uitgebreid over praten, want dit plan ligt nu in de week. Men is daar nu over aan het nadenken en men is daar al een heel eind mee. De verhoudingen zijn nu uitstekend en iedereen zit op dezelfde lijn.”

Figuur 3. Organogram CiB.



**Het Clb is als het ware een samenraapsel van bestaande organisaties (zie organogram). Wat is nu de meerwaarde van het Clb? Is het alleen een 'brug' tussen deze organisaties, zoals beschreven op de website, of is het meer dan dat?**

“Wij zijn meer dan een brug. Onze rol is dat wij de infectieziektebestrijding in Nederland aansturen. Dat is ons werk. Wij hebben € 30 tot € 35 miljoen euro budget en nog eens € 15 tot € 20 miljoen voor subsidies, dat vooral naar de SOA-poliklinieken gaat. Daar kun je invloed mee uitoefenen, aansturen. Daar moeten wij wel met respect mee omgaan.”

Er is heel veel met enthousiasme opgebouwd, zoals de WIP en de SWAB. Wij moeten naar al die programma's goed kijken en bezien wat de waarde ervan is. De WIP en SWAB zullen voorlopig niet onder de vlag komen van het Clb. Die functioneren goed. Wij zijn subsidiegevers. Maar ik denk wel dat het nodig is dat wij erbij betrokken zijn. Ik wil wel een nauwere samenwerking dan het ministerie voorheen had. Het plan is om alle subsidies en contracten die we hebben, te evalueren de komende jaren.”

**Is het Clb voor de mensen op de vloer, bijvoorbeeld de LCI, nu niet een ambtelijk apparaat geworden?**

Coutinho: “Helemaal niet. Verreweg de meeste mensen die hier werken zijn inhoudelijk bezig. Ze werken bijvoorbeeld voor het laboratorium voor diagnostiek en screening, het LIS, of andere laboratoria. Het aantal mensen dat zich bezighoudt met beleid en beheer houden we zo klein mogelijk. Wat betreft het LCI: zij waren behoorlijk onder druk komen te staan met relatief weinig mensen en daardoor kwetsbaar. Met zijn allen hebben wij meer slagkracht, inhoudelijke versterking, en meer aansturing.”

**Komen er nog veranderingen binnen de aangifteplicht?**

De aangifteplicht wordt inmiddels aangestuurd door het Clb. De inspectie is daar helemaal uitgestapt. Er is nu een nieuwe Infectieziektewet in voorbereiding. Ik denk dat daar wel wat veranderingen in komen, maar dat kan ik nog niet goed overzien. Syfilis zal niet terugkomen in de aangifteplicht. Dat ga je niet op naam melden. Ik denk ook dat dit soort zaken niet meer via de aangifteplicht moet worden geregistreerd. Het kan ook op andere manieren,

Naam:	Roel Coutinho
Leeftijd:	60 jaar
Functie:	Hoofd Clb sinds 2005
Budget:	ongeveer € 50.000.000,-
Favoriete infectie:	HIV en Hepatitis C
Infectiebijbel:	Evans
NTMM-lezer:	'ik lees alles'

bijvoorbeeld zoals de huidige surveillancesystemen, ISIS, en mogelijk syndroomsurveillance. We willen wel iets kunnen opsporen voordat er echt iets is. De vraag is of dat kan met syndroomsurveillance. Ik ben eerder geneigd om op de oplettende dokter af te gaan, die meldt dat hij iets gekks heeft gezien. Dat vind ik zo ontzettend belangrijk. Het is wel belangrijk om goede surveillancesystemen op te bouwen, maar heel veel signalen komen gewoon uit de gezondheidszorg van iemand die zijn hersens gebruikt. Die denkt: 'hé, dat is raar'.”

**Hebben wij de kennis om dat soort gekke dingen te herkennen?**

“Wij ontberen inderdaad essentiële kennis op het gebied van bepaalde infectieziekten, waarvan wel wordt verondersteld dat wij die kennis hebben. Ik wil eigenlijk een vaste samenwerking met een laboratorium, liefst in Afrika. Omdat wij kennis moeten hebben van een aantal ziekten die hier nauwelijks voorkomen. Ik heb heel erg mijn best gedaan om dat in Ethiopië van de grond te krijgen, en om allerlei redenen is dat niet gelukt. Ik probeer het nu weer! Iedereen heeft units in het buitenland: de Engelsen, de Fransen, de Duitsers, en... de Belgen hebben het. In Antwerpen hebben ze een goed programma. Nederland is daar niet goed in en dat is jammer. Europa is gericht op Europa. Het Europese Infectieziektencentrum is zich nu met grote kracht aan het richten op hoe ze in Europa de zaken voor elkaar kunnen krijgen en dat is al ingewikkeld genoeg. Eerst moet je het in je eigen achtertuin goed geregeld hebben en dan kan je pas naar andere landen. Ik vind dat wij in Nederland wel iets moeten gaan doen. Ik mis die samenwerking ook echt!”

---

#### OPLOSSING VAN DE OEFENVRAAG (PAGINA 48)

Hier gaat het om vijf ziekten:

tering (tb), in Nederland te verkrijgen, ook importziekte, bestaat nog;

klere (cholera), niet in Nederland te verkrijgen, wel importziekte, bestaat nog;

pest, niet in Nederland te verkrijgen, wel importziekte, bestaat nog;

tyfus, niet in Nederland te verkrijgen (tenzij van een drager), wel importziekte, bestaat nog;

pokken, niet in Nederland te verkrijgen, ook niet als importziekte, want het bestaat niet meer.





## Aankondiging

Informatie over vijf nieuwe LCI protocollen op de website [www.infectieziekten.info](http://www.infectieziekten.info).

### Protocol Pneumokokkose

Het protocol 'Pneumokokkose – invasieve pneumokokkenziekte' is actueel vanwege de opname van pneumokokkenvaccinatie in het Rijksvaccinatieprogramma (RVP). Kinderen geboren op of na 1 april 2006 krijgen gelijktijdig met de DKTP-Hib-prikken een pneumokokkenvaccinatie met 7-valent conjugaatvaccin.

Bij het voorkomen van één patiënt is bronopsporing en contactonderzoek niet nodig. Bij meer gevallen in een instelling, zoals een verpleeghuis of kindercentrum, is sprake van meldingsplicht op basis van Artikel 7 van de Infectieziektewet. Geadviseerd wordt om dan over het te voeren beleid te overleggen met bureau LCI. Te overwegen maatregelen bij een cluster zijn vaccinatie van personen met een verhoogd risico op ernstig beloop (als het een in het vaccin vertegenwoordigde stam betreft) en/ of het aanbieden van antibiotische profylaxe.

Het protocol bevat een bijlage over pneumokokkenvaccinatie binnen het RVP met aanvullende informatie over de toediening van Prevenar®, de bijwerkingen en een pneumokokkenvaccinatieschema voor kinderen van 0 tot 5 jaar.

### Herziening protocol Salmonellose en protocol Campylobacter

De heer Wim Ang, medisch-microbioloog in het Erasmus MC te Rotterdam, realiseerde het afgelopen jaar het nieuwe protocol 'Campylobacter' en de herziening van het protocol 'Salmonellose (anders dan *S. typhi* en *S. paratyphi*)'. Omdat beide protocollen dezelfde auteur en, na een melding - door de GGD te nemen - overeenkomstige maatregelen hebben, volgt hier één aankondiging voor deze twee protocollen.

*Campylobacter* behoort tot de meest frequente bacteriële verwekkers van diarree. De incidentie van infecties door *Campylobacter* ligt in Nederland hoger dan van *Salmonella* en *Shigella* samen. Campylobacteriose en salmonellosen zijn meldingsplichtige ziekten, groep B, indien de patiënt in de levensmiddelen- of horecasector werkt, of beroepsmatig is belast met de behandeling, verpleging of verzorging van andere personen. Ook moet men deze infecties melden als de patiënt behoort tot een groep van twee of meer personen die binnen een tijdvak van 24 uur hetzelfde hebben gegeten of gedronken. Maatregelen bij

wering van het werk zijn bij campylobacteriose en salmonellose dezelfde: patiënten die werkzaam zijn in de levensmiddelensector of gezondheidszorg moeten zolang ze symptomen hebben, worden uitgesloten van handelingen die risico vormen voor overdracht van *Campylobacter* of *Salmonella*. Als de symptomen zijn verdwenen wordt, ondanks persisterende positieve faeceskweken in sommige gevallen, de besmettelijkheid zo klein geacht dat het risico van transmissie minimaal is. In uitzonderlijke gevallen, bijvoorbeeld bij personen die werken op een *intensive-care*-afdeling of werkzaam zijn in de grootschalige industriële productie van levensmiddelen, kan de bedrijfsarts besluiten tot aanvullende maatregelen.

### Protocol Urogenitale *Chlamydia trachomatis* en lymfogranuloma venerum

De heer De Vries, dermatoloog AMC, is auteur van het protocol 'Urogenitale *Chlamydia trachomatis* en lymfogranuloma venereum'. Het voorgaande protocol 'Chlamydia trachomatis' dateerde uit 2000. Dit is volledig herzien en aangevuld met een paragraaf lymfogranuloma venereum (LGV). Urogenitale CT-infecties zijn niet meldingsplichtig. LGV-gevallen, ook de mogelijke LGV-gevallen, kunnen vrijwillig worden gemeld ten behoeve van *surveillance* bij het RIVM.

Voor de dagelijkse praktijk van de GGD is partnerwaarschuwing en -behandeling essentieel. Na opsporing van risicopartners is onderzoek en behandeling (inclusief verdere bron- en contactopsporing) mogelijk. Dit leidt tot een daling van soa-prevalentie.

Om praktische redenen vindt bij zowel asymptomatische als symptomatische CT-infectie als ook bij LGV-infecties partnerwaarschuwing plaats van alle seksuele partners uit de zes maanden voorafgaand aan de klachten.

Partnerbehandeling is gebaseerd op het principe dat alle risicopartners **blind** worden meebehandeld. De behandeling wordt ingezet direct na afname van materiaal voor een volledige soa-screening. In het geval van LGV is de behandeling een meerdaagse kuur die gestopt kan worden zodra door soa-screening komt vast te staan dat de risicopartner niet is besmet.

### Protocol Creutzfeldt-Jakob

Het protocol 'Ziekte van Creutzfeldt-Jakob inclusief de variantvorm van de ziekte van Creutzfeldt-Jakob' is een nieuw protocol. Naar aanleiding van het eerste bewezen geval van vCJD (mei 2005) in Nederland en taakwijziging van de IGZ beschrijft het protocol de procedure na melding en de taken van het referentiecentrum te Rotterdam, het CIB en de GGD'en.

CJD en vCJD zijn beide meldingsplichtig, groep B. Er bestond een goedwerkend meldingssysteem voor CJD. Dit

is ongewijzigd en hiermee wijkt de procedure voor melding van CJD en v-CJD af van die van andere meldingsplichtige aandoeningen:

- De behandelaar stelt de diagnose 'waarschijnlijke' of 'zekere' vorm van CJD of vCJD en meldt dit aan het landelijke registratiecentrum te Rotterdam;
- Dit registratiecentrum geeft binnen twee werkdagen de melding van een bevestigde diagnose anoniem door aan het bureau LCI;
- Het bureau LCI schakelt de GGD - in de regio waar de patiënt woont - in. De GGD registreert de melding.

#### **Het protocol beschrijft maatregelen bij CJD en bij v-CJD**

Aangenomen wordt dat vCJD wordt opgelopen door consumptie van met BSE-besmette voedingsmiddelen. Gezien de lange incubatietijd is bronopsporing niet van toepassing. Wel is vanwege de mogelijkheid van iatrogene overdracht uitgebreid contactonderzoek noodzakelijk. Organen en weefsels met de hoogste concentratie prionen zijn hersenen, ruggenmerg en zenuwen. Maar ook lymfklieren, milt, amandelen en darmen vormen een risico. Recent is beschreven dat twee mensen in het Verenigd Koninkrijk vermoedelijk vCJD hebben opgelopen via een bloedtransfusie.

Dr. Bert Mulder, secretaris WOGIZ (WOGIZ@labmicta.nl)

Bijsluiter  
165 x 125

# Intensive Care & Infection

Dr. N.L.A. Arents, R. Klont, E.M. Kraan, B.J.M. Vlamincx, J.J.C. de Vries

Op 16 februari 2006 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. Dit jaar stond het thema infectiologie op de intensive-care centraal. Dit artikel geeft een samenvatting van de voordrachten.

Trefwoorden: arts-assistenten, NVAMM, intensive care, infectiologie

**Prof. dr. Paul Verweij** (arts-microbioloog, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen) beet het spits af met een voordracht over de benadering van invasieve *Candida*-infecties op de *intensive care unit* (ICU). Candidemie en *Candida*-infecties zijn belangrijke oorzaken van morbiditeit en mortaliteit op de ICU. Risicofactoren die een rol spelen bij deze infecties zijn onder andere chirurgische procedures, behandeling met diverse antibioticaklassen, kolonisatie van de patiënt met *Candida* en katheters voor het toedienen van medicijnen en vloeistoffen. Het aantonen van een invasieve *Candida*-infectie is moeilijk aangezien bloedkweken negatief kunnen blijven en het nut van het aantonen van circulerend *Candida*-DNA beperkt is. De betrouwbaarheid van *assays* die *Candida*-antigenen kunnen aantonen, inclusief mannan en (1-3)- $\beta$ -D-glucan, is wisselend. Een snelle start van de behandeling is van levensbelang en direct geassocieerd met het succes van de behandeling. Hoewel *in vitro* gevoeligheidsbepalingen beschikbaar zijn, blijft de determinatie van het exacte species de belangrijkste factor voor de bepaling van het antimycoticum. De epidemiologie van *Candida*-infecties is de laatste vijf jaar in Nederland en andere Europese landen onveranderd gebleven waarbij ongeveer 55 procent berust op een *Candida albicans*-infectie. Veel klinieken gebruiken fluconazol als eerste keuzetherapie bij een *Candida*-infectie, hoewel er bezorgdheid bestaat over de effectiviteit van deze therapie bij patiënten met een infectie met *Candida glabrata* en *Candida krusei*, die een verminderde *in-vitro*-gevoeligheid voor fluconazol hebben. De echinocandine caspofungin is een belangrijk alternatief geworden met goede activiteit tegen fluconazolresistente *Candida*-stammen. Caspofungin heeft relatief hoge MIC-waarden voor *Candida parapsilosis*-stammen, maar de

klinische relevantie daarvan is niet duidelijk en een relatie tussen MIC-waarde en klinisch resultaat ontbreekt. Het is aangetoond dat voriconazol net zo effectief is als amfotericine B gevolgd door fluconazol voor de behandeling van invasieve *Candida*-infecties. Bij patiënten met verminderde nierfunctie wordt intraveneuze toediening van voriconazol afgeraden omdat het oplosmiddel cyclodextrine dan mogelijk kan gaan stapelen. Bij laatstgenoemde patiënten is caspofungin dan een beter alternatief aangezien bij dit middel de dosis niet hoeft te worden aangepast aan de nierfunctie. Van een nieuwe echinocandine, anidulafungin, is recent aangetoond dat het duidelijk effectiever is dan fluconazol indien het gebruikt wordt als eerste behandeling voor invasieve *Candida*-infecties. Aangezien dit middel ook effectiever bleek bij infecties met *C. albicans* zal het misschien een belangrijke invloed hebben op de behandelingsstrategie van deze infectie.

Samengevat geeft de behandeling van *Candida*-infecties teleurstellende resultaten met het uitblijven van een respons bij 25 tot 35 procent van de patiënten. De mate van respons is afhankelijk van de conditie van de patiënt waarbij patiënten met een hoge APACHE II-score een zeer lage respons laten zien. Combinatietherapie is misschien een optie bij bepaalde patiënten, hoewel dit slechts in een beperkt aantal onderzoeken is onderzocht.

**Dr. Harry van Goor** (chirurg, Universitair Medisch Centrum St. Radboud, Nijmegen) hield een betoog over de behandeling van abdominale infecties met een overzicht van trends en tips. De beslissing 'hoe en wanneer een abdominale infectie te behandelen' is één van de meest belangrijke uitdagingen voor chirurgen met speciale

Dr. N.L.A. Arents<sup>1</sup>, R. Klont<sup>2</sup>, E.M. Kraan<sup>3</sup>, B.J.M. Vlamincx<sup>4</sup>, J.J.C. de Vries<sup>1</sup>

<sup>1</sup>arts-assistent medische microbiologie, Universitair Medisch Centrum Groningen; <sup>2</sup>arts-assistent medische microbiologie, UMC St Radboud, Nijmegen; <sup>3</sup>arts-assistent medische microbiologie, VU medisch centrum, Amsterdam; <sup>4</sup>arts-assistent medische microbiologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht

\*Correspondentieadres: Dr. N.L.A.Arents, arts-assistent medische microbiologie, Universitair Medisch Centrum Groningen, Afdeling Medische Microbiologie, Postbus 30001, 9700 RB Groningen. Telefoon: 050-3610458, e-mail: n.l.a.arents@mmb.umcg.nl.

interesse voor abdominale sepsis. De minimaal invasieve procedure voor de benadering van intra-abdominale infecties, zowel voor diagnostiek als behandeling, heeft in de afgelopen jaren sterk aan populariteit gewonnen; de oorzaak van de infectie wordt zo vroeg mogelijk vastgesteld met verfijnde radiologische technieken en minimaal invasieve procedures, patiënten met intra-abdominale infecties worden behandeld met zo min mogelijk chirurgisch letsel om te voorkomen dat de systemische respons verergert (*second hit*) en artsen vertrouwen op klinische scoresystemen gecombineerd met nieuwe beeldvormingstechnieken om te besluiten tot een re-interventie. Bij sommige patiënten met ernstige intra-abdominale infecties lijkt het noodzakelijk de schade te beperken door middel van een klein aantal geplande re-laparotomieën zodat een stabiele uitgangssituatie wordt verkregen voor de start van het herstel. Zorgvuldige controle van deze patiënten bij wie vitale orgaanfuncties maximaal worden ondersteund en lokale complicaties worden voorkomen, lijkt cruciaal voor hun uiteindelijk prognose. Binnen deze context worden belangrijke chirurgische onderwerpen zoals primaire resectie en anastomose bij geperforeerde appendicitis, geplande re-laparotomie versus re-laparotomie 'on-demand', intra-abdominale hypertensie en technieken voor primaire en uitgestelde sluiting van de buikwand voor de behandeling van diverse abdominale infecties besproken.

**Prof. dr. Christina Vandenbroucke – Grauls** (arts-microbioloog, VU medisch centrum en Academisch Medisch Centrum, Amsterdam) hield een voordracht over kathetergerelateerde infecties. Zij ging in op de epidemiologie, pathogenese, microbiologie, diagnostiek en preventie van kathetergerelateerde infecties. Ondanks veelvuldig voorkomen van lijninfecties is diagnostiek niet zo eenvoudig. Het kan soms lastig zijn om te differentiëren tussen kolonisatie van een katheter en een lijninfectie. Een kathetergerelateerde infectie kan een lokale infectie (infectie van de insteekopening, flebitis, infectie van het reservoir of een tunnelinfectie) zijn, maar ook een systemische infectie (bacteriëmie/sepsis). Wanneer er met de semikwantitatieve 'rolplaat'-methode meer dan 15 cfu's worden gedetecteerd of  $\geq 100$  cfu's in de kwantitatieve kweek, is de kans dat er werkelijk sprake is van een infectie groter dan kolonisatie. Het onderzoek van Maki (NEJM, 1977) laat zien dat van de 225 katheters met  $< 15$  cfu's geen enkele katheter tot infectie leidde en van de 25 met  $\geq 15$  cfu's er vier tot sepsis leidden. Sherertz *et al.* (J Clin Microbiol, 1990) toonden aan dat er voor  $\geq 102$  cfu's een sterke relatie bestaat tussen het aantal gedetecteerde cfu's na sonicatie/vortex en de aanwezigheid van een positieve bloedkweek. In dat onderzoek was de frequentie in voorkomen van hetzelfde organisme op de lijn als in de bloedkweek als volgt: *C. albicans* 68,4 procent, *Staphylococcus aureus* 60 procent,

*Escherichia cloacae* 42,9 procent, *Staphylococcus epidermidis* 32,1 procent, *Pseudomonas aeruginosa* 27,7 procent en *Streptococcus faecalis* 23,3 procent. Ook werd aangetoond dat de voorspellende waarde van de relatie tussen positieve bloedkweken en de kweek van de lijn voor *C. albicans* en *S. aureus*  $\geq 60$  procent was, ongeacht het aantal cfu's dat van de lijn werd gekweekt. Voor de andere vier organismen gold die relatie pas bij  $\geq 10^5$  cfu's. De voorspellende waarde van een negatieve katheterkweek was groot voor al deze micro-organismen. Deze laatste bevinding suggereert dat wanneer er door middel van sonicatie weinig *S. epidermidis* van de kathetertip wordt verkregen en de bloedkweek positief is voor *S. epidermidis*, een van de twee waarschijnlijk een contaminant is. De kans op bacteriëmie/sepsis is het grootst bij centraalveneuze katheters, namelijk twee tot 17 per 1.000 katheterdagen. Voor een aantal andere soorten katheters is de kans veel kleiner, namelijk voor perifere katheters  $< 0,2$ , voor getunnelde katheters 0,2 tot één en voor arteriële katheters twee tot vier per 1.000 katheterdagen. Een infectie kan ontstaan via de huid (insteekplaats gecontamineerd), via de *hub* (handen van het personeel), via gecontamineerde infuusoplossingen en door hematogene verspreiding van bacteriën van elders in het lichaam.

Microbiologisch gezien spreekt men van een kathetergerelateerde bacteriëmie als twee bloedkweken positief zijn voor hetzelfde micro-organisme als van de kathetertip wordt gekweekt en er geen ander focus voor infectie is en de kweek van de infuusvloestof negatief is. In de kliniek houdt men aan dat, als na het verwijderen van de lijn de koorts is verdwenen, het dan waarschijnlijk een lijninfectie is geweest. Om onnodig verwijderen van de katheter te vermijden hebben Raad *et al.* een methode beschreven om lijninfecties te diagnosticeren zonder de lijn te verwijderen, de zogenoemde *differential time to positivity*-methode (Ann Intern Med, 2004). *Differential time to positivity* is de tijd tussen het positief worden van de perifere kweek en de centrale kweek. Raad *et al.* beschrijven dat wanneer het verschil 120 minuten of meer is, deze methode een sensitiviteit van 81 procent en een specificiteit van 92 procent voor kortverblijf-katheters heeft en voor langverblijf-katheters een sensitiviteit van 93 procent en een sensitiviteit van 75 procent. Wellicht is kwantitatieve PCR een methode voor de toekomst. De meeste verwekkers van lijninfecties zijn onderdeel van de huidflora, namelijk tweederde van de verwekkers zijn Grampositieve kokken, waarvan 60-70 procent coagulase-negatieve stafylokokken zijn en vijf tot 15 procent *S. aureus*. Ook Gramnegatieve staven (bij patiënten op de ICU) en *Candida*-species (*emerging pathogen*) kunnen lijninfecties veroorzaken. Zeer belangrijk in het voorkomen van lijninfecties blijft het om altijd goede handhygiëne toe te passen. Ook zouden kortverblijf-katheters op de operatiekamer onder steriele condities moeten worden ingebracht en dat geldt altijd voor langverblijf-katheters. De duur van

de verblijfskatheter is van invloed op het infectierisico. Routinematig verwisselen van centraalveneuze katheters is echter niet geïndiceerd mits de insteekplaats dagelijks nauwkeurig wordt geïnspecteerd en men alert is op tekenen van bacteriëmie of sepsis. Bij verdenking van een infectie zal de katheter moeten worden verwijderd.

**Dr. Dennis Bergmans** (Academisch Ziekenhuis Maastricht, Maastricht Intensive Care Centrum, Maastricht). Ernstig zieke, beademde patiënten op de *intensive-care*-afdeling lopen kans een *ventilator-associated pneumonia* (VAP) te ontwikkelen. Deze infectie leidt tot langere opname, toename van antibiotica, kosten, morbiditeit en mortaliteit. Van de pathogenese van VAP is bekend dat VAP meestal wordt voorafgegaan door orofaryngeale kolonisatie. De gastro- en rectorpulmonale route van kolonisatie zijn minder belangrijk, terwijl kruiskolonisatie vanuit exogene bronnen dat wel is. In het verleden zijn diverse preventieve strategieën ontwikkeld. Algehele hygiënemaatregelen blijven de hoeksteen van infectiepreventie. Ook factoren als *cohorting* en kolonisedruk spelen een rol en zijn een potentieel aangrijppunt voor preventie. Selectieve darmdecontaminatie (SDD) is zeer effectief gebleken ter preventie van VAP. Door het potentiële gevaar van selectie en inductie van antibioticaresistentie en een voorsnog onopgehelderd effect op mortaliteit is SDD momenteel geen standaard zorg. Bovendien blijkt decontaminatie van alleen de orofarynx (met topicale antibiotica of chloorhexidine) even effectief. Beïnvloeding van maagkolonisatie met antacida, sucralfaat of door voeding is weinig effectief. Wetenschappelijk onderzoek naar subglottische aspiratie, lichaamshouding (liggend/halfzittend) en houdingsdrainage rapporteren wisselend effect op de incidentie. Het gebruik van probiotica ter preventie van nosocomiale infecties wordt bestudeerd. De diagnostiek van VAP zal moeten differentiëren tussen kolonisatie en infectie. Klinische parameters als koorts, leukocytose, afwijkingen op thoraxröntgenfoto's zijn sensitief maar weinig specifiek voor VAP. De gouden standaard is een positieve kwantitatieve kweek ( $> 10^4$  cfu/ml) of histologie van longparenchym verkregen via open-longbioptie of bij obductie, maar dus weinig praktisch. De Memphis-criteria voor *probable pneumonia* zijn momenteel state-of-the-art met een goede sensitiviteit en specificiteit.

Nieuwe ontwikkelingen in de diagnostiek zijn het gebruik van CRP en procalcitonine, bepaling van sepsismarkers in BAL-vloeistof (cytokines, sTREM-1, eiwitten, etc.) alsook de leukocytendifferentiëring in BAL-vloeistof met bepaling van het percentage intracellulaire organismen kunnen snel richting geven aan behandeling in afwachting van kweken. De behandeling van VAP is weinig onderzocht. Empirische therapie kan worden gericht op eerdere (surveillance-) kweken van sputum, maar eerder antibioticagebruik, voorgeschiedenis en lokale epidemiologie en resistenties

spelen een rol. Belangrijk is de opnameduur in het ziekenhuis. Een episode van VAP binnen vijf dagen na opname wordt als *early-onset* beschouwd met verwekkers als *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* en *S. aureus*. Een VAP vanaf dag vijf na opname is *late-onset*, meestal veroorzaakt door *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. en *Enterobacteriaceae*. *Early-onset* werd zeven tot tien dagen en *late-onset* 14 tot 21 dagen behandeld. Klinische respons op behandeling treedt meestal al na zes dagen op, eradicatie van de *early-onset*-micro-organismen uit het sputum wordt bereikt na drie dagen. Terwijl na drie dagen sputumeradicatie van *Enterobacteriaceae* slechts bij 50 procent en van *P. aeruginosa* nog helemaal niet heeft plaatsgevonden. De tendens is om episodes van VAP korter te behandelen, rekeninghoudend met de verwekker en ernst van de ziekte. In enkele onderzoeken bleek dat geen gevolgen te hebben voor mortaliteit, beademingsduur en recidief VAP.

**Dr. Malgosia Verboon-Macielek** (neonatoloog, Wilhelmina Kinderziekenhuis, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht) vertelde over 'Klinische en epidemiologische karakteristieken van virale infecties op een neonatale *intensive care unit* (NICU)'. Data van NICU-patiënten van het WKZ met laboratoriumbewezen virale infecties voor de periode 1992-2003 werden retrospectief geanalyseerd. Incidentie, klinische manifestaties, en uitkomst van virale infecties werden bepaald. Een virusinfectie was bewezen bij 51 van de 5.396 NICU-kinderen (1 procent); 20 kinderen (39 procent) hadden een enterovirus- en parechovirus (EV/PEV)-infectie, 15 (29 procent) een respiratoir syncytieel virusinfectie (RSV-infectie), vijf kinderen (10 procent) een rotavirusinfectie, drie kinderen (zes procent) een cytomegalovirusinfectie (CMV-infectie), twee (vier procent) een adenovirusinfectie, twee (vier procent) een parainfluenza-virusinfectie, twee (vier procent) een herpes-simplex-virusinfectie (HSV-infectie), één kind (twee procent) een rhinovirusinfectie en één kind (twee procent) een rubella-virusinfectie. Drie kinderen presenteerde zich bij de geboorte met symptomatisch rubellavirus-, CMV- of HSV-infectie. RSV-infectie ontwikkelde zich met name bij gehospitaliseerde patiënten (60 procent), en 93 procent van de infecties presenteerden zich in de winter (november - maart). De klinische presentaties van EV/PEV-infecties betroffen sepsisachtige beelden, aanhoudende insulpen bij *à-terme*-kinderen en gastro-intestinale ziekte bij premature kinderen. RSV, het parainfluenzavirus, rhinovirus en CMV veroorzaakten respiratoire ziekte, met name bij premature kinderen. Gastro-intestinale ziekte werd alleen gezien bij premature kinderen met adenovirus-, rotavirus- of EV/PEV-infectie. Mortaliteit was hoog en ernstige restafwijkingen waren veel voorkomend bij patiënten geïnfecteerd met EV/PEV (respectievelijk 10 en 15 procent). Geconcludeerd werd dat de incidentie van virale infecties op de NICU

één procent is. Enterovirale infecties werden het meest frequent gediagnosticeerd, troffen met name thuis geboren *à-termé*-kinderen en presenteerden zich met sepsisachtige ziekte of insulden. Preterme kinderen, opgenomen sinds de geboorte, ontwikkelden met name gastro-intestinale ziekte veroorzaakt door rotavirus- en adenovirusinfectie of respiratoire ziekte veroorzaakt door RSV-, parainfluenza- en CMV-infectie. Enterovirussen waren verantwoordelijk voor de hoogste mortaliteit en ernstige restafwijkingen.

**Drs. Wil van der Zwet** (arts-microbioloog Deventer Ziekenhuis, Deventer) hield een zeer duidelijke presentatie over zijn onderzoek naar nosocomiale infecties op de neonatale *intensive care*. De incidentie van nosocomiale infecties op de neonatale *intensive care unit* (NICU) is hoog. Risicofactoren voor neonatale infecties zijn een suboptimale functie van de afweermechanismen, frequent gebruik van invasieve technieken, intensieve verzorging en veel gebruik van antibiotica. Het doel van het onderzoek van Van der Zwet, dat heeft plaatsgevonden in het VU medisch centrum, was de incidentie te meten en risicofactoren te identificeren voor ziekenhuisinfecties op de NICU. Daartoe was van 1998-2000 een surveillance-onderzoek (prospectief) gedaan. De infectiedefinities werden gemaakt door enkele aanpassingen te maken op de CDC-criteria voor kinderen van < 1 jaar. Het geboortegewicht werd gecategoriseerd in vier groepen (< 1.000, 1.000-1.499, 1.500-2.499 en > 2.500) en andere risicofactoren in twee groepen (man/vrouw, vaginale bevalling of sectio caesarea, etc.). Aan de hand van die factoren werd een zogenoemde klinische risico-index berekend. De relatie tussen de klinische risico-index voor baby's en nosocomiale infecties werd geanalyseerd. 742 neonaten werden opgenomen in het onderzoek; 191 neonaten (26 procent) ontwikkelden 264 infecties. Bloedbandinfecties en pneumonieën waren de meest voorkomende infecties. Van de bloedbaaninfecties werd 59 procent veroorzaakt door coagulase-negatieve stafylokokken; bij 21 procent van de neonaten bleven de bloedkweken negatief. Bij 25 procent van de pneumonieën was *Enterobacteriaceae* de verwekker; *S. aureus* bij 13 procent en *Ureaplasma urealyticum* 12 procent. 26 procent bleef negatief. De grootste risicofactoren voor een bloedbaaninfectie waren laag geboortegewicht, parenterale voeding en toediening van intraveneus antibiotica. Risicofactoren voor pneumonie waren een laag geboortegewicht en beademing. Intraveneuze toediening van antibiotica bleek beschermend. De klinische risico-index was geen voorspeller voor infectie. De incidentie van nosocomiale infecties op de NICU, gemeten door Van der Zwet *et al.* was hoger dan in de Amerikaanse literatuur wordt aangegeven. De CDC-criteria werden opnieuw beoordeeld en het bleek dat op basis van die criteria 75 procent van de bloedbaaninfecties en 87,5 procent van de pneumonieën zouden worden gediagnosticeerd. Dat

verklaart waarschijnlijk (deels) het verschil. De verwekkers die werden aangetoond waren conform literatuurgegevens. Al met al een prachtig overzicht van een epidemiologisch onderzoek.

**Prof. dr. Andreas Voss** (Canisius-Wilhelmina Ziekenhuis, Nijmegen) hield een voordracht over hygiëne op de *intensive care*. Het doel van hygiëne en infectiepreventie is het voorkomen van infecties die zijn opgelopen in de gezondheidszorg door optimalisering van processen (bijvoorbeeld desinfectie en sterilisatie) en evaluatie en toepassen van biomedische producten (bijvoorbeeld *needleless connectors*); voorkomen van directe en indirecte transmissie (bijvoorbeeld handhygiëne en controle van het 'milieu'); *outbreak control*, etc. Hoewel door veranderingen van de gezondheidszorg ook het veld van de infectiepreventie van toenemend transmuraal belang is, is er een uitzondering binnen het ziekenhuis: de *intensive care*-afdeling. Patiënten op deze afdeling zijn bijzonder gevoelig voor nosocomiale infecties (door onderliggende ziektes en een groot aantal risicofactoren zoals wonden, katheters, *drains*, etc.) Naast het feit dat IC-patiënten intrinsiek *at risk* zijn, hebben ze in vergelijking met andere ziekenhuispatiënten het hoogste aantal verrichtingen per uur nodig voor hun verzorging (20 keer per uur versus acht keer per uur op een kinder-afdeling). Hierdoor wordt de kans op exogene infecties groter. *Outbreaks* komen dan ook gemiddeld vaker voor op *intensive-care*-afdelingen. Tijdens de voordrachten werd ingegaan op bovengenoemde problemen en interventies.

**Prof. dr. Marc Bonten** (internist-infectioloog, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht).

Selectieve Darm Decontaminatie (SDD) is een infectiepreventiestrategie bij beademde patiënten op de ICU. De rationale van SDD is gebaseerd op klinische observaties die meer dan dertig jaar geleden zijn gedaan door Waldemar Johanson. Hij beschreef de toegenomen kans op kolonisatie van de bovenste luchtwegen met Gramnegatieve micro-organismen met progressie van de ernst van ziekte en het feit dat met deze kolonisatie de kans op een pneumonie met deze micro-organismen toenam. Met SDD beoogt men de primair en secundair verkregen potentieel pathogene micro-organismen te bestrijden en de kolonisatieresistentie uitgaande van de anaerobe flora ongemoeid te laten. Alhoewel een onderzoek van Stoutenbeek een indrukwekkend resultaat liet zien van SDD in combinatie met systemische therapie en SOD (Selectieve Orofaryngeale Decontaminatie), is deze strategie nog immer zeer controversieel. Ondanks een duidelijk effect op de incidentie van VAP's lieten tot 2001 alleen meta-analyses een gunstig effect van SDD op mortaliteit zien. Sedertdien zijn de data van een drietal onderzoeken verschenen die bij bepaalde patiëntencategorieën een indrukwekkend effect laten zien van SDD op de mortaliteit. Het betreft allemaal

*single-centre*-onderzoek dat moet worden bevestigd in *multi-centre*-verband. Derhalve is in Nederland een gerandomiseerd *cross-over*-onderzoek gestart waaraan dertien centra deelnemen. Hierin zal het effect van SDD worden vergeleken met SOD en met geen enkele interventie. Als in dit grote *multi-centre*-verband een soortgelijke effect op mortaliteit wordt gezien, zal SDD de standaard worden in settings met een relatief lage resistentieprevalentie. Zo niet, dan zal SDD controversieel blijven.

**Prof. dr. Hajo Grundmann** (arts-microbioloog, Universitair Medisch Centrum Groningen & RIVM) verhaalde over 'Transmissie van antibioticaresistente pathogenen op *intensive care units* (ICU)'. Op ICU's is het moeilijk gedetailleerde informatie te verkrijgen over de epidemiologie van nosocomiale infecties veroorzaakt door antibioticaresistente pathogenen. Dit is onverwacht, gezien het typisch kleine aantal patiënten, de beschikbaarheid van minuut-tot-minuut-monitordata van elke patiënt en de hoge densiteit van microbiologische onderzoeken zoals gebruikelijk in deze setting. Toch zijn verhelderende variabelen voor het oplopen van een infectie moeilijk te bepalen. Statistische analyse is onderhevig aan conceptuele moeilijkheden. De presentatie stelde deze moeilijkheden aan de orde en gaf richting aan de opzet van epidemiologische ICU-onderzoek. Ten slotte werd met behulp van een statistisch model voor MRSA op de ICU de effectiviteit voorspeld van infectiebeperkende maatregelen zoals handhygiëne en cohortisolatie.

**Prof. dr. Marc Struelens** (arts-microbioloog, Hôpital Erasme-Université Libre de Bruxelles, Belgium) was gevraagd een overzicht te geven van de surveillance en beheersing van het aantal resistente, pathogene micro-organismen op de *intensive care unit* (ICU). Kolonisatie en infectie met resistente micro-organismen is een toenemend probleem in de gezondheidszorg. Met name op ICU's, waar patiënten met diverse risicofactoren liggen die aanleiding kunnen geven tot een infectie of het verspreiden van resistente micro-organismen, heeft het resistentieprobleem grote gevolgen. Resistente micro-organismen die op dit moment in Europa de grootste zorgen baren zijn de methicillineresistente *Staphylococcus aureus*, de glycopeptide-intermediairgevoelige *S. aureus*, vancomycine- en ampicillineresistente *Enterococcus faecium* en multi-

resistente stammen van de Gramnegatieve staven *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* en *Acinetobacter baumannii*. Op de ICU is overdracht tussen patiënten de belangrijkste oorzaak van het toenemend aantal resistente micro-organismen. Meestal vindt deze overdracht tussen patiënten plaats via besmette handen van gezondheidszorgwerkers. Incidenteel vinden uitbraken van met name multi-resistente *Pseudomonas* spp. en *Acinetobacter* spp. hun oorsprong in gecontamineerd voedsel, gebruiksvorwerpen, medicijnen of vloeistoffen, die bijvoorbeeld worden gebruikt tijdens invasieve procedures zoals mechanische beademing of endoscopie. De meeste patiënten die op de IC verblijven ontvangen verschillende kuren antibiotica. Soms als therapie en soms in het kader van profylaxe. Ziekenhuisartsen schrijven vaak te veel en niet rationele antibiotica voor. Antibiotische therapie geeft aanleiding tot selectie van resistente mutanten en bevordert de verspreiding van deze micro-organismen doordat de gevoelige endogene microflora vervangen wordt door de resistente ziekenhuisflora. Factoren die de toename en verspreiding van resistente micro-organismen tussen IC-patiënten bevorderen zijn gastheer- en zorggerelateerd. De gastheerfactoren omvatten de ernst van het onderliggend lijden van de patiënt en de staat van het immuunsysteem. De zorggerelateerde factoren omvatten de opnameduur in het ziekenhuis en op de IC, de intensiteit en duur van blootstelling aan breed spectrum antibiotica, het gebruik van invasieve technieken en procedures, slechte *compliance* van gezondheidszorgwerkers aan de hygiënerichtlijnen en een tekort aan verpleegkundigen. Strategieën als onderdeel van het ziekenhuisbeleid voor de *surveillance* en het beperken van het aantal resistente micro-organismen op de ICU zijn: (1) strikte naleving van hygiënerichtlijnen, met name de handhygiënerichtlijn; (2) rationeel en spaarzaam gebruik van antibiotica; (3) detectie, typering, *surveillance* en melding van epidemische verheffingen van resistente stammen door het laboratorium; (4) het nemen van additionele maatregelen om de verspreiding van resistente stammen te voorkomen; en (5) *surveillance* en terugkoppeling als ondersteuning voor en effect-indicator van strategieën (1) en (4). In dit heldere betoog heeft prof. Struelens de invloeden en effecten van bovengenoemde punten aan de hand van voorbeelden laten zien voor de Europese situatie.



# Improving the efficacy of antifungal therapy: preclinical studies

Dr. D.T.A. te Dorsthorst

De effectiviteit van de op dit moment beschikbare antischimmelige middelen voor de behandeling van invasieve schimmelinfecties is beperkt. Het aantal patiënten met een gunstige respons is laag en de sterftecijfers zijn hoog. Bovendien hebben geneesmiddelgerelateerde toxiciteit en interacties met andere geneesmiddelen de behandeling bemoeilijkt. In dit proefschrift hebben wij verschillende eigenschappen van antischimmelige middelen bestudeerd met als doel het verbeteren van de effectiviteit van deze geneesmiddelen.

Wij hebben gekeken naar de voorspellende waarde van de *in-vitro*-gevoeligheidsbepaling voor de *in-vivo*-effectiviteit, in het bijzonder naar het effect van de pH van het medium op de *in-vitro*-activiteit van verschillende antischimmelige middelen tegen verschillende schimmels en gisten. De *in-vitro*-activiteit bleek pH afhankelijk te zijn. Het effect van de pH van het medium op de *in-vitro*-activiteit was zowel afhankelijk van het geteste antischimmelige middel als van de geteste schimmel of gist. Bij een lage pH van het medium (pH 5,0 en 6,0) bleek flucytosine bijvoorbeeld actiever tegen *Aspergillus fumigatus* dan bij een pH van 7,0. Amfotericine B bleek juist minder actief te zijn bij een lage pH. Om te bestuderen of de gevonden *in-vitro*-resultaten in overeenstemming zijn met de *in-vivo*-effectiviteit, dat wil zeggen of flucytosine ook actief is tegen *A. fumigatus in vivo*, is de *in-vivo*-effectiviteit van flucytosine monotherapie bepaald bij een niet-neutropeen muismodel van invasieve aspergillosis. De muizen werden geïnfecteerd met een *A. fumigatus*-stam die *in vitro* gevoelig was voor flucytosine bij een lage pH van het medium (pH 5,0 en 6,0), maar ongevoelig bij een pH van 7,0. Flucytosine bleek effectief *in vivo*. De gevonden effectiviteit bleek voornamelijk afhankelijk van de totale dagdosis. Tevens hebben wij de *in-vivo*-effectiviteit van flucytosine monotherapie bepaald tegen een *A. fumigatus*-stam die *in vitro* ongevoelig was voor flucytosine bij zowel een lage pH (pH 5,0 en 6,0) als bij een pH van 7,0. Tegen deze stam was flucytosine niet actief.

De conclusies van dit onderzoek zijn dat de pH van het medium de resultaten van *in-vitro*-gevoeligheidsbepaling beïnvloedt en dus is het voor de voorspellende waarde van de *in-vitro*-gevoeligheidsbepaling van belang dat de juiste pH van het medium wordt gekozen. Voor de *in-vitro*-gevoeligheidsbepaling van flucytosine tegen *A. fumigatus* lijkt een lage pH van het medium (pH 5,0 of 6,0) resultaten te geven die de *in-vivo*-effectiviteit voorspellen. Flucytosine lijkt zelfs effectief tegen *A. fumigatus in vivo* en kan, in tegenstelling tot wat algemeen wordt aangenomen, mogelijk worden gebruikt voor de behandeling van invasieve schimmelinfecties veroorzaakt door *A. fumigatus*.

Tevens hebben wij gekeken naar de *in-vitro*-interactie tussen antischimmelige middelen, in het bijzonder naar de gebruikte benadering voor de analyse van de resultaten. De meest gebruikte benadering in de huidige praktijk is het fractioneel remmende concentratie-indexmodel (FIC-indexmodel). Alternatieve modellen zijn gebaseerd op de benadering van de oppervlakterespons. De *in-vitro*-interactie tussen verschillende antischimmelige middelen tegen verschillende schimmels en gisten werd bepaald. De resultaten werden geanalyseerd met behulp van de verschillende modellen. De geschiktheid alsmede de voor- en nadelen van de verschillende modellen werd onderzocht.

Er werd aangetoond dat het FIC-indexmodel een aantal belangrijke nadelen heeft en dat het, hoewel veel gebruikt, geen goed model is voor het beschrijven van *in-vitro*-interacties tussen antischimmelige middelen. Het gebruik van een model dat is gebaseerd op de benadering van de oppervlakterespons lijkt aantrekkelijker.

Dr. D.T.A. te Dorsthorst, medisch-microbiologisch analist,  
Slingeland Ziekenhuis, Postbus 169, 7000 AD Doetinchem,  
e-mail: dtedorsthorst@gmail.com.

## PERSONALIA

### Nieuwe leden

- J.E.M. de Steenwinkel, Schiekade 123 F, 3033 BK Rotterdam.
- Mw. dr. A. Hagendorf, Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium, Oostereind 115, 1212 VH Hilversum.
- A.J. Schel, Kanaalstraat 173-1, 1054 XE Amsterdam.
- R.R. Jansen, Mauritskade 19-G, 1091 GC Amsterdam
- Mw. Dr. N.M. van Maarseveen, LUMC, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden.
- P.J.A. Haas, UMCU, Eijkman-Winkler Instituut, Go4.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht.
- Dr. P.J. Burghout, Citroenvlinderstraat 73, 6533 SX Nijmegen.
- Mw. dr. M.C. de Vries, RIVM, LIS/Cib, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven.

### Adreswijzigingen

- Mw. C. van Mieghem, Biotest Seralc NV, Essenestraat 16, B-1740 Ternat, België (voorheen A. de Concichstraat 13, Kortenberg).
- Dr. J.A. Jacobs, Instituut Tropische Geneeskunde, Departement Klinische Wetenschappen, Nationalestraat 155, B-2000 Antwerpen, België (voorheen Academisch Ziekenhuis Maastricht).
- Dr. M.F.C. Beersma, Groene Hart Ziekenhuis, afdeling Medische Microbiologie, Postbus 576, 2800 AN Gouda (voorheen LUMC te Leiden).
- Mw. dr. A. van der Zee, Regionaal Lab. Medische Microbiologie Dordrecht/Gorinchem, Albert Schweitzerplaats 25, 3318 AT Dordrecht (voorheen Streeklaboratorium Tilburg).
- Dr. C.H.E. Boel, UMCU, Eijkman-Winkler Instituut, Go4.614, Heidelberglaan 100, 3584 CX Utrecht (voorheen Stichting PAMM te Veldhoven).

## PROMOTIES

### 13 december 2005 – M. Voorend

Any role for *Chlamydia pneumoniae* in ischaemic stroke?  
Promotores: prof. dr. C.A. Bruggeman, prof. dr. M. Limburg.  
Co-promotores: dr. A.J.A.M. van der Ven en dr. J. Lodder.  
Academisch Ziekenhuis Maastricht, Universiteit Maastricht, afdeling Medische Microbiologie en afdeling Neurologie.

### 15 december 2005 – F.D. Ernst

Transcriptional regulation of the nickel and iron metabolism in *Helicobacter pylori*.  
Promotor: prof. dr. E.J. Kuipers.  
Co-promotores: dr. A.H.M. van Vliet, dr. J.G. Kusters.  
Erasmus MC, Rotterdam, afdeling Maag, Darm en Leverziekten.

### 27 januari 2006 – M. Hijnen

The *Bordetella pertussis* protein pertactin: role in immunity and immune evasion.  
Promotor: prof. dr. F.R. Mooi.  
Co-promotor: dr. G. Berbers.  
Universiteit Utrecht, Faculteit Geneeskunde.

### 10 februari 2006 – D. Diavatopoulos

Evolution and host-adaptation of the mammalian bordetellae.  
Promotores: prof. dr. F.R. Mooi, Prof. dr. J. Verhoef.  
Co-promotor: dr. L Schouls.  
Universiteit Utrecht, Faculteit Geneeskunde.

### 17 februari 2006 – T. Vainas

On the inflammatory and infectious aspects of atherosclerosis: a serological, molecular biological & clinical treatise.  
Promotores: prof. dr. C.A. Bruggeman, prof. dr. P.J.E.H.M. Kitslaar.  
Co-promotores: dr. F.R.M. Stassen, dr. H.A.J.M. Kurvers.  
Academisch Ziekenhuis Maastricht, Universiteit Maastricht, afdeling Medische Microbiologie en afdeling Chirurgie.

### 10 maart 2006 – T. Gijzen

*Chlamydia trachomatis* antibody testing in screening for tubal factor subfertility. Clinical application and the pathogenesis paradigm.  
Promotores: prof. dr. C.A. Bruggeman en prof.dr. J.L.H. Evers.  
Co-promotor: dr. J.A. Land.  
Academisch Ziekenhuis Maastricht, Universiteit Maastricht, afdeling Medische Microbiologie en afdeling Gynaecologie/Obstetrie.

## ORATIE

### **16 juni 2006 – Prof. dr. A.P. Oranje**

Titel: 'De kinderhuid spreekt'

Bijzonder hoogleraar kinderdermatologie.

Erasmus Medisch Centrum/Sophia Kinderziekenhuis,  
afdeling Dermatologie, Venereologie, Kinderdermatologie.

## AGENDA

### **7 – 10 juni 2006**

#### ***North European conference on travel medicine***

Edinburgh, Schotland.

Informatie: e-mail: nectm@in-conference.org.uk.

### **13 juni 2006**

#### ***Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie***

VieCurie Medisch Centrum, Venlo.

Informatie: S.M. Bruisten, tel: 020-555 53 76.

### **15 – 18 juni 2006**

#### ***12<sup>th</sup> International congress on infectious diseases***

Lissabon, Portugal.

Informatie: website: www.isid.org.

### **19 juni 2006**

#### ***314<sup>e</sup> bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie***

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

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

### **21 – 23 juni 2006**

#### ***14<sup>th</sup> International symposium on HIV and emerging infectious diseases***

Toulon, Frankrijk.

Informatie: website: www.isheid.com.

### **25 – 29 juni 2006**

#### ***16<sup>th</sup> Congress of the International Society for Human and Animal Mycology***

Parijs, Frankrijk. Les Palais des Congres de Paris.

Informatie: e-mail: meetings@imdedex.com,

website: www.imdedex.com.

### **2 – 5 juli 2006**

#### ***14<sup>th</sup> International symposium on infections in the immunocompromised host***

Crans-Montana, Zwitserland.

Informatie: website: www.ichs.org.

### **6 – 11 augustus 2006**

#### ***11<sup>th</sup> International Congress of Parasitology (ICOPA)***

Glasgow, Schotland.

Informatie: website: www.icopa-xi.org.

### **13 – 18 augustus 2006**

#### ***The XVI international AIDS conference***

Toronto, Canada.

Informatie: website: www.aids2006.org.

### **3 – 6 september 2006**

#### ***9<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology (ESCV) Birmingham, Engeland.***

Informatie: J. Schirm, Streeklab. Volksgezondheid,

Postbus 30039, 9700 RM Groningen, tel: 050-521 51 60,

e-mail: cb.accommodation@marketingbirmingham.com,

website: www.escv2006.co.uk.

### **3 – 6 september 2006**

#### ***12<sup>th</sup> International symposium on staphylococci and staphylococcal infections***

Maastricht.

Informatie: Congress Care, tel: 073-683 12 38, fax: 073-690 14 17,

e-mail: info@congresscare.nl, website: www.issis2006.org.

### **6 – 8 september 2006**

#### ***International conference on surgical infections***

Stockholm, Zweden.

Informatie: website: www.icsio06.se.

### **9 – 13 september 2006**

#### ***2<sup>nd</sup> ASM conference on salmonella: from pathogenesis to therapeutics***

Victoria, Canada.

Informatie: website: www.asm.org.

### **11 september 2006**

#### ***2<sup>e</sup> gezamenlijke bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West***

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur.

Informatie: J.A. Kaan, tel: 030-256 67 48; L.C. Smeets,

tel: 015-260 45 84.

Advertentie  
Viread

**27 – 30 september 2006**

**46<sup>th</sup> ICAAC**

San Francisco, Californië.

Informatie: website: [www.icaac.org](http://www.icaac.org).

**15 – 18 oktober 2006**

**6<sup>th</sup> Hospital Infection Society Conference**

RAI Amsterdam.

Informatie: e-mail: [info@his2006.com](mailto:info@his2006.com),

website: <http://www.his2006.com>.

**12 – 16 november 2006**

**55<sup>th</sup> American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH) Annual Meeting**

Atlanta, Georgia, Verenigde Staten.

Informatie: website: [www.astmh.org](http://www.astmh.org).

**12 – 16 november 2006**

**CXXXIV American Public Health Association (APHA) Annual Meeting**

Boston, Massachusetts, Verenigde Staten.

Informatie: website: [www.apha.org](http://www.apha.org).

**22 november 2006**

**156<sup>e</sup> bijeenkomst van de Werkgroep West, medische microbiologie**

Aanvang 14.00 uur.

Informatie: L.C. Smeets, tel: 015-260 45 84.

**4 december 2006**

**315<sup>e</sup> bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie**

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

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

Advertentie  
Cubicin

Advertentie  
Candidas