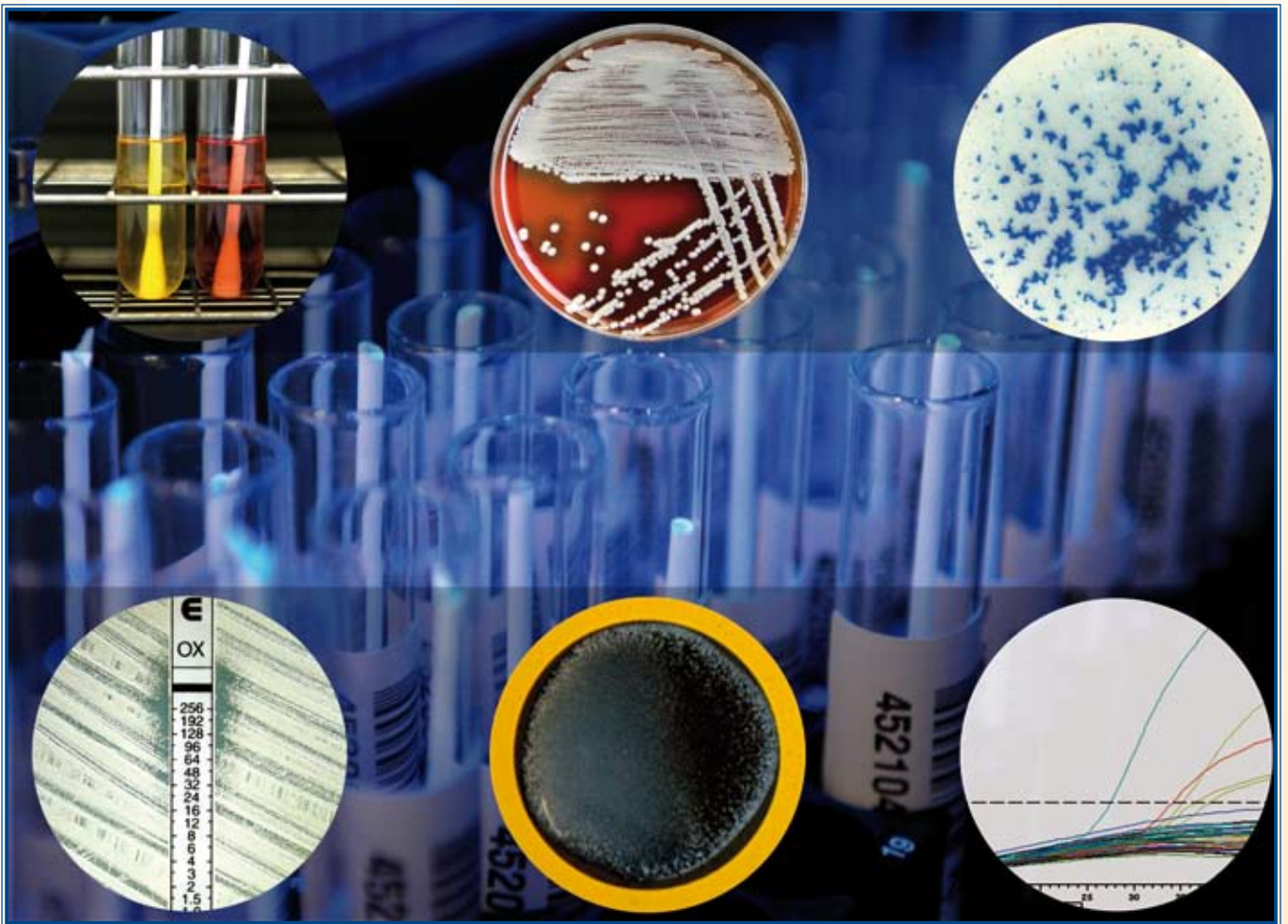


NEDERLANDS TIJDSCHRIFT VOOR
MEDISCHE MICROBIOLOGIE



Detectie van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

•
Diagnostiek van resistentie van *Mycobacterium tuberculosis*

•
Hiv-behandeling door de jaren heen

•
Publish or Perish: een 'aaHaa-erlebnis' voor wetenschappers!

•
Kwantumvirologie

•
Mycoplasma pneumoniae en antigene variatie

Advertentie C2 UCB (Hepsera)

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. C.W. Ang en dr. M. van Rijn
Redactie
Mw. dr. I.A.J.M. Bakker-Woudenberg,
dr. A. Fleer, dr. J.G. den Hollander,
J.A. Kaan, dr. 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, dr. H.F.L. Wertheim

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 frequentie
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



© 2007, 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	94
Groeten uit Vietnam	
Konijnenbloed	95
<i>H.F.L. Wertheim</i>	
'Transmissieroute'	
The rise of the machines	96
<i>M.G.R. Hendrix</i>	
Artikelen	
Directe en snelle detectie van meticillineresistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	97
<i>R.H. Deurenberg, C. Vink, S. Sebastian, M.W.M. Wassenberg, E.E. Stobberingh</i>	
Diagnostiek van resistentie van <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	104
<i>H.R. van Doorn</i>	
Hiv-behandeling door de jaren heen	109
<i>J.G. den Hollander, M.E. van der Ende</i>	
Publish or Perish: een 'aaHaa-erlebnis' voor wetenschappers!	113
<i>H.A. Verbrugh</i>	
Kwantumvirologie. Verbetering van het klinische beleid bij virale infecties door middel van kwantitatieve virusmetingen	116
<i>J.S. Kalpoe</i>	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> en antigene variatie	121
<i>C. Vink, A.M.C. van Rossum, N.G. Hartwig</i>	
Rubrieken	
Samenvatting proefschrift	125
Personalia	126
Promoties	126
Agenda	127

Foto omslag: © Loes van Damme, Roel Verkooijen, Erasmus MC, afdeling Medische Microbiologie & Infectieziekten, Rotterdam.

(Eerste rij)

Links: PHMB (PhenylMannitolBroth)	- geel is positief (groei <i>Staphylococcus aureus</i>)	- na 24 uur
Midden: <i>Staphylococcus aureus</i>	- bloedagar	- groei na 24 uur
Rechts: Slidex Staph Plus test	- positieve latex-agglutinatie voor <i>Staphylococcus aureus</i>	

(Tweede rij)

Links: E.test oxacilline	- <i>Staphylococcus aureus</i> , verdenking MRSA
Midden: Latex PBP2	- positieve latex-agglutinatie voor MRSA

Rechts: Rapportage kwantitatieve PCR SSSA gen

Achtergrond: Hamilton pipetteerrobot

Komkommertijd



Buiten is het een van de schaarse zomerse dagen van deze vakantieperiode. Door mijn openstaande raam waait de Rotterdamse bedrijvigheid naar binnen. Auto's, ambulances, pratende mensen

en die ene persoon die op dit soort dagen altijd bezig schijnt te moeten zijn met een schuurmachine. Kent u dat: altijd met mooi weer, nooit als het regent, nooit als het waait, maar altijd bij mooi weer urenlang het zoemende geluid van een Black & Decker? Het erge is dat deze persoon overal voorkomt, bij mij thuis (zowel in het oude als ook in het nieuwe huis) en zelfs dus op het werk. Want daar zit ik nu. Het herinnert mij er wel aan dat ik nog vlonders moet schuren.

Komkommertijd dus. Benieuwd overigens hoe ze dat in Vietnam noemen (en of daar zoiets bestaat). Mogelijk kan onze man in Hanoi, Heiman Wertheim, er in een van zijn columns op terugkomen. Even googelen leert mij overigens dat er in Vietnam blijkbaar vooral zeekomkommers worden gegeten, levert mij gelijk een leuk plaatje op voor bij dit verhaal. Gelukkig is de stroom aan kopij nog niet zodanig ingedampt dat wij u in deze tijd van het jaar komkommernieuws moeten brengen. Deurenberg *et al.* schrijven over een *hot topic* binnen ons vak: snelle detectie van MRSA, Den Hollander en Van den Ende over hiv-ontwikkelingen door de jaren heen, er is een artikel over resistente *Mycobacterium tuberculosis*... Enfin, slaat u ons blad er maar op na.

Figuur 1. Gedroogde Vietnamese zeekomkommers



Eén bijdrage leverde enige discussie op binnen de hoofdredactie: de 'aaHaa-erlebnis' van Henri Verbrugh. Verbrugh verwijst naar het programma 'Publish or Perish' waarmee de H-index van wetenschappers kan worden berekend. Voor de precieze uitleg verwijs ik u naar het betreffende artikel. Uiteraard werden op de hoofdredactionele burelen gelijk de H-indices van de redactie van het NTMM uitgerekend. Daarbij stuitte wij echter al gelijk op een nadeel van het programma. Het veronderstelt namelijk wel dat u van uw 'slachtoffer' weet binnen welke disciplines hij of zij werkzaam is geweest. Wie – om maar wat te noemen – zoekt naar 'Van Rijn' en 'microbiology', zal snel klaar zijn. Wie weet dat hij in een vorig leven binnen een andere medische discipline is gepromoveerd op totaal onmicrobiologisch onderzoek, komt tot een (ietsje) hogere index. Niet dat dat overigens iets zegt over 's mans bekwaamheid als arts-microbioloog (maar daar ging het ook niet om). Vandaar dat wij hebben afgezien van het plaatsen van een lijstje met indices van de redactie. Zou ook dubbelop zijn geweest aangezien een aantal van hen al in de 'lijst van Verbrugh' staat. Het zou overigens wel prima komkommernieuws zijn geweest, bedenk ik me nu.

Lijstjes... Tegenwoordig staat er minimaal één in ieder zichzelf respecterend (dag)blad. Vooral zorglijstjes zijn populair: wat is het beste ziekenhuis, waar werken de beste specialisten, wie levert de snelste zorg. Op zich niets mis mee: *benchmarking* was in laboratoria al een begrip voordat de buitenwereld het kon spellen. Wij hebben nu ook een lijst, dus we horen er bij. Wat dacht u overigens van deze: China (60%), Turkije, Rusland, Iran en de VS... Nee, niet de top 5 van landen met de hoogste prevalentie van MRSA. Het is de top 5 van komkommerproducenten wereldwijd. De Black & Decker is zowaar opgehouden met schuren. Onwillekeurig gaan mijn gedachten naar de schuurder. Wat doet hij nu in stilte? Beoordeelt hij zijn werk? Vergelijkt hij zijn werk met de schuurprestatie van de buurman (*benchmarking*)? Is hij klaar of is de stilte slechts de opmaat naar een nog urenlang gebrom? Ik zal het nooit weten want mijn vakantie begint nu! Maar voor ik morgen vertrek zal ik eerst nog even de vlonders...

Dr. Michiel van Rijn, hoofdredacteur

Konijnenbloed

H.F.L. Wertheim

Wat moet een arts-microbioloog zonder schapenbloed? Ik werk nu ruim een half jaar in Vietnam zonder de beschikking te hebben over schapenbloed. Het aantal schapen is hier op één hand te tellen en daardoor is het lastig om aan schapenbloed te komen. Een goed alternatief voor schapenbloed in agar media ten behoeve van de medische microbiologische diagnostiek is varkensbloed.¹ En in Vietnam aan varkens geen gebrek: maar liefst 30 miljoen. In de microbiologische praktijk wordt in Vietnam echter geen varkens- maar konijnenbloed gebruikt. Volgens een lokale collega is de reden daarvoor dat het makkelijker is om bloed van een konijn te verkrijgen dan van een varken. Maar is konijnenbloed wel geschikt?

Het beoordelen van micro-organismen op media met konijnenbloed werpt je terug op de basis van de medisch-microbiologische diagnostiek. Immers, op een konijnenbloedplaat kunnen bacteriën er heel anders uitzien dan op een schapenbloedplaat. Het uiterlijk van een enterokok lijkt soms verdacht veel op een bètahemolytische streptokok. Ook *Haemophilus influenzae* groeit zonder problemen op een konijnenbloedplaat, en dat zonder toevoegen van X- of V-factor of een *Staphylococcus aureus*-streep. Maar voor de overige bacteriën leerde een lokale evaluatie van konijnenbloedagarplaat versus schapenbloedagarplaat ons dat konijnenbloed, net als varkensbloed, een redelijke vervanger is van schapenbloed (een evaluatie voor gevoeligheidsbepalingen dient nog plaats te vinden). Dat is goed nieuws voor de lokale microbioloog, maar geen goed nieuws voor het Vietnamese konijn.

Deze bloeddonorkonijnen komen rechtstreeks van de markt. Eens per kwartaal gaat één van de analisten vroeg in de morgen naar de markt om daar voor een schappelijke

prijs konijnen te kopen. De konijnen worden keurig één voor één verpakt in een doos en achterop de brommer van de analist naar het lab vervoerd, wat gepaard gaat met veel getoeter. Aldaar aangekomen zijn de konijnen volledig suf door oververhitting. Eenmaal uit hun doos verwijderd worden zij op hun rug vastgebonden op een tafel op het balkon van het lab. Door middel van hartpunctie wordt het bloed van de konijnen afgetapt. Wat er daarna met de kadavers gebeurt...?

Het was me al eerder opgevallen dat je in Vietnam beter geen dier kunt zijn. Alles wat beweegt komt uiteindelijk tussen twee eetstokjes terecht, variërend van rauwe slakken tot hond. Sinds de uitbraak van de vogelgriep zijn vogeltjes wat beter af. Die laat men voorlopig maar liever met rust. Sinds de vogelgriep-epidemie hoor je overal in Hanoi weer vogeltjes fluiten.

Het konijn hopen we ook een beter toekomstperspectief te bieden. Op het terrein van het Nationaal Veterinair Onderzoeks Instituut leeft een schaap waarvan wij straks voor een paar honderdduizend Vietnamese dong (€ 1 = ca. 16.000 dong) de nodige milliliters schapenbloed kunnen krijgen. Kan ik straks analisten hier laten zien hoe een enterokok er op een schapenbloedplaat uitziet.

Literatuur

1. Anand C, et al. Pig and Goat Blood as Substitutes for Sheep Blood in Blood-Supplemented Agar Media. *J Clin Microbiol* (2000) 38;2:591-4.

Dr. H.F.L. Wertheim, Oxford University Clinical Research Unit, National Institute of Infectious and Tropical Diseases, Bach Mai Hospital, 78 Giai Phong Street, Hanoi, Vietnam.

The rise of the machines

M.G.R. Hendrix

Jaren geleden moest ik beslissen welk specialisme ik in mijn verdere arbeidzame leven zou gaan beoefenen. Medische microbiologie werd het. Immers, de combinatie van technische vaardigheden, gekoppeld aan de dagelijkse advisering van collega-specialisten en huisartsen, is in weinig andere vakken zo prominent aanwezig. Techniek was sterk in opkomst in de vorm van de polymerasekettingreactie (PCR) en de introductie van de serologie-analysers, maar ook bleef er een vleugje mystiek aanwezig. Kijken naar de platen, eraan ruiken, en dan besluiten wat ermee te doen gaf je een gevoel van verbondenheid met pioniers als Koch en Pasteur. Er waren ook negatieve geluiden, want door de ontwikkelingen in de moleculaire chiptechnologie zou de microbiologie snel obsoleet worden, maar daar geloofde ik niet in.

Ondanks de introductie van geautomatiseerde technieken, vooral binnen de moleculaire diagnostiek en de serologie, was de gedachte dat de klinische microbiologie nog lange tijd een ambachtelijk vak zou blijven. Mycobacteriën kunnen moleculair worden gedetecteerd, maar de rest van de bacteriologie, nog steeds het grootste deel van een laboratorium, blijft handwerk waarbij de beoordeling van de platen sterk afhankelijk is van het gepresenteerde klinische probleem. In bedrijfseconomische termen betekent dit dat *human resources* de belangrijkste kostenpost is. Exploitatie en voorzieningen zijn in vergelijking hiermee een relatief bescheiden post. Sinds mijn keuze heeft niet alleen de microbiologie zich sterk ontwikkeld, ook de wereld om ons heen heeft veranderingen ondergaan. Enerzijds zijn dit veranderingen binnen Nederland, anderzijds zijn dit veranderingen op Europees niveau. Binnen Nederland is een onstuitbare verandering in de financieringsstructuur van de gezondheidszorg doorgevoerd. Grofweg van budgetsystematiek naar diagnosebehandelcombinatie (DBC), waarbij het streven van de Nederlandse overheid is om in 2012 de hele gezondheidszorg zelf te laten regelen waar verrichtingen worden uitgevoerd. Op Europees niveau wordt afgedwongen deze pakketten aan verrichtingen Europees aan te besteden. Vooral in de grensgebieden kan dit aanleiding geven tot forse concurrentie met buitenlandse laboratoria. In bedrijfseconomische termen betekent dit dat de prijs-kwaliteitsverhouding zeer scherp moet zijn en we dus goed op de kostenpost *human resources* moeten letten. In de praktijk kunnen alleen vergaande automatisering en robotisering, functiedifferentiatie en schaalvergroting de component personeel per productie-eenheid verminderen.

De technische vraag die me dan ook al enkele jaren bezighoudt, is hoe de ambachtelijke bacteriologie kan worden geautomatiseerd en gerobotiseerd zonder de relatie klinisch beeld en beoordeling petrischaal los te laten. Dit zal niet lukken met chiptechnologie, maar wel door het huidige analyseproces, zoals handmatig uitgevoerd door een analist, te robotiseren. Dit lijkt ver gezocht maar is reeds operationeel in een aantal Nederlandse en buitenlandse laboratoria met als werkgebied de voedselindustrie en de drinkwateranalyse. Deze laboratoria hebben het hele proces van enten van platen tot uiteindelijke beoordeling van platen, conform vigerende standaarden, volledig gerobotiseerd. Ook binnen ons laboratorium hebben we een proefopstelling staan die geautomatiseerd platen met klinische materialen beënt, incubeert en met behulp van digitale camera's vastlegt, waarna analyse volgt van de foto's met fotoverwerkingssoftware en expert-systemen, met minimale inzet van personeel. Het leuke is dat we de meeste programma's zelf hebben geschreven (op basis van standaard beschikbare programmatuur) zodat niet een firma de interpretatie levert maar een individuele arts-microbioloog de interpretatieregels kan opstellen en zelfs de opgeslagen primaire foto's kan oproepen. Door invoering van deze technieken is het mogelijk een deel van de bacteriologie zonder tussenkomst van een analist uit te voeren. Te denken valt vooral aan screenings (MRSA, VRE, salmonella, shigella, enzovoort), urines en sputa waarbij vooral chromogene media een belangrijke rol gaan spelen. Nadeel van deze aanpak zijn de investeringskosten. Deze zijn bij voldoende schaalgrootte echter goed te dragen. Tevens zit er een fors terugverdieneffect in reductie van de factor arbeid voor deze productie-eenheden.

Blijf ik de medische microbiologie leuk vinden? Ja natuurlijk!! De rol van de arts-microbioloog verandert niet wezenlijk. Alleen de technische kennis, nodig om een laboratorium goed te kunnen bestieren, neemt weer toe. En het vleugje mystiek? Dat zal altijd blijven want 'the machine' kan nooit alles aan.

De transmissieroute leidt naar mevrouw dr. A.M.W. van Elsacker-Niele, Laboratorium voor de Volksgezondheid in Friesland.

Dr. M.G.R. Hendrix, arts-microbioloog, Laboratorium Microbiologie Twente Achterhoek, Postbus 377, 7500 AJ Enschede, e-mail: info@labmicta.nl.

Directe en snelle detectie van meticillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

R.H. Deurenberg, C. Vink, S. Sebastian, M.W.M. Wassenberg, E.E. Stobberingh

Samenvatting

Het voorkomen van de verspreiding van meticillineresistente *Staphylococcus aureus*-stammen (MRSA) vormt een uitdaging voor gezondheidszorginstellingen, omdat MRSA-infecties moeilijk zijn te behandelen met antibiotica. Het Nederlandse *search and destroy*-beleid, gericht op het voorkomen van MRSA-transmissie, brengt hoge kosten voor de gezondheidszorg met zich mee, onder andere door infectiepreventiemaatregelen. Snelle detectie van MRSA-stammen, voor bronopsporing en het vastleggen van transmissieroutes is dan ook noodzakelijk. De detectie van MRSA met fenotypische microbiologische methoden kan echter tot vijf dagen duren, omdat eerst de *S. aureus*-stam dient te worden geïsoleerd uit een complex klinisch monster. Hoewel moleculair-biologische technieken, zoals de detectie van het *mecA*-gen met behulp van (*real-time*) *polymerase chain reaction* (PCR), in principe veel sneller zijn, kunnen deze niet direct op patiëntenmateriaal worden toegepast. Deze testen maken immers geen onderscheid tussen MRSA en meticillineresistente coagulase-negatieve stafylokokkenstammen (MRCNS). Recent zijn echter nieuwe moleculaire testen op de markt gekomen waarmee MRSA wel direct in patiëntenmateriaal kan worden aangetoond. In dit artikel zal een aantal van deze testen worden besproken. Daarnaast zal kort een landelijk onderzoek worden toegelicht, het *MRSA Direct*-onderzoek, waarin een snelle diagnostische test is gebruikt in het kader van het *search and destroy*-beleid, en waarvan de resultaten momenteel worden geëvalueerd.

Trefwoorden: GeneOhm™ MRSA (IDI-MRSA™), MRSA, SCCmec, *S. aureus*, snelle detectie.

Introductie

Staphylococcus aureus komt bij de mens onder meer voor in de neus en op de huid. Veel personen zijn drager van *S. aureus*. Ongeveer 30 procent van de bevolking is altijd gekoloniseerd met *S. aureus*, 40 procent is periodiek drager en de overige 30 procent is nooit drager. *S. aureus* kan

oppervlakkige of diepe infecties veroorzaken, zoals huidinfecties of postoperatieve wondinfecties. *S. aureus*-infecties met een ernstig karakter, zoals pneumonie, sepsis of *toxic shock*-syndroom (TSS), kunnen levensbedreigend zijn. Binnen zorginstellingen kan *S. aureus* worden verspreid door gezondheidsmedewerkers en patiënten, maar omgevingsfactoren kunnen ook een rol spelen.¹

Vanaf 1940 werd penicilline gebruikt voor de behandeling van *S. aureus*-infecties. Twee jaar later werden de eerste *S. aureus*-stammen geïsoleerd die penicillineresistent waren.¹ Doordat in de jaren vijftig een groot deel van de *S. aureus*-isolaten resistent was voor penicilline, werd in september 1960 meticilline, een penicillinaseresistent penicilline, geïntroduceerd voor de behandeling van *S. aureus*-infecties. In 1961, een aantal maanden na de introductie van meticilline, werd echter de eerste meticillineresistente *S. aureus*-stam (MRSA) in Engeland geïsoleerd.² Vrij snel hierna werden MRSA-stammen geïsoleerd in andere Europese landen, Afrika en Australië, en vervolgens, in de jaren zeventig, in Japan en de Verenigde Staten van Amerika. Momenteel is MRSA een wereldwijd probleem in ziekenhuizen. Sinds het midden van de jaren negentig wordt MRSA tevens in de open populatie bij gezonde individuen (zonder verminderde weerstand) gevonden.³

Een hoge prevalentie van MRSA in ziekenhuizen is geassocieerd met hogere kosten voor de gezondheidszorg en mogelijk een lichtverhoogde mortaliteit van patiënten. Het

Dr. R.H. Deurenberg, postdoc, ing. S. Sebastian, research analist, dr. E.E. Stobberingh, medisch-microbioloog, afdeling Medische microbiologie, academisch ziekenhuis Maastricht, Maastricht, dr. C. Vink, moleculair bioloog, Erasmus MC, Laboratorium Kindergeneeskunde, Rotterdam, dr. M.W.M. Wassenberg, internist-infectioloog, Eijkman-Winkler Instituut, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Utrecht.
Correspondentieadres: Dr. R.H. Deurenberg, postdoc, afdeling Medische microbiologie, academisch ziekenhuis Maastricht, P. Debyelaan 25, 6229 HX Maastricht, e-mail: rde@lmib.azm.nl.

Sentry Antimicrobial Surveillance Program heeft aangetoond dat de MRSA-prevalentie in ziekenhuizen wereldwijd verschilt. Tussen 1997 en 1999 was de prevalentie 23 procent in Australië, 67 procent in Japan, 35 procent in Latijns-Amerika, 40 procent in Zuid-Amerika, 32 procent in de Verenigde Staten van Amerika en 26 procent in Europa.^{4,5} De prevalentie van MRSA in Europa varieert per land. De prevalentie van MRSA in landen met een *search and destroy*-beleid, de Scandinavische landen en Nederland, is laag (2 procent) in vergelijking met de andere Europese landen waar een MRSA-prevalentie tot 45 procent is aange- toond.⁶ De lage MRSA-prevalentie in Nederland is mede te danken aan de screening van patiënten met een hoog risico voor MRSA-dragerschap, zoals personen die in een buitenlands ziekenhuis zijn behandeld voordat ze worden opgenomen in een Nederlands ziekenhuis, of gezondheids- medewerkers uit het buitenland (*search and destroy*-beleid). Verder kan verspreiding van MRSA worden voorkomen door effectieve desinfectieprocedures, goede handhygiëne en strikte isolatie van personen die zijn gekoloniseerd met MRSA.⁷ Strikte naleving van deze werkwijze heeft de MRSA-prevalentie in Denemarken verlaagd van 30 procent in de jaren zestig tot minder dan één procent op dit moment.⁸

Het wereldwijd toenemende probleem van MRSA in de open populatie en het toenemend aantal Nederlandse patiënten dat in buitenlandse ziekenhuizen wordt behandeld, maakt continue aandacht voor het voorkómen van verspreiding van MRSA en het uitvoeren van preva- lentieonderzoeken in Nederland noodzakelijk. Zeker nu grensoverschrijdende gezondheidszorg en vrije toegang tot gezondheidszorginstellingen een belangrijk aandachtsgebied binnen de Europese Unie (EU) zijn en multiresistente bacteriën zich via de patiënten kunnen verspreiden tussen de verschillende gezondheidszorg- instellingen. Verder dient aandacht te worden besteed aan de verspreiding van nosocomiale MRSA-stammen in gezinnen door gezondheidsmedewerkers, en de verspreiding van MRSA via huis- en landbouwdieren.^{9,12} De beschikbaarheid van een snelle detectiemethode voor MRSA is van groot belang voor zowel inperking van de verspreiding van MRSA als voor beperking van de duur dat patiënten in strikte isolatie dienen te blijven, hetgeen aanzienlijke kostenbesparingen kan opleveren

Mechanisme van resistentie van MRSA

Het aangrijpingspunt van meticilline en andere bètalactamantibiotica is de penicillinebindende proteïne-2 (PBP2). PBP2 heeft een hoge affiniteit voor bètalactam- antibiotica en is betrokken bij de peptidoglycaan- synthese van de celwand. Een alternatief PBP2, PBP2a, gecodeerd door het *mecA*-gen, heeft een lage affiniteit voor bètalactamantibiotica, waardoor de peptidoglycaansynthese van de celwand doorgaat ondanks de aanwezigheid van

bètalactamantibiotica. Het gevolg hiervan is dat *S. aureus*- stammen die het *mecA*-gen hebben, niet kunnen worden gedood door bètalactamantibiotica.¹³

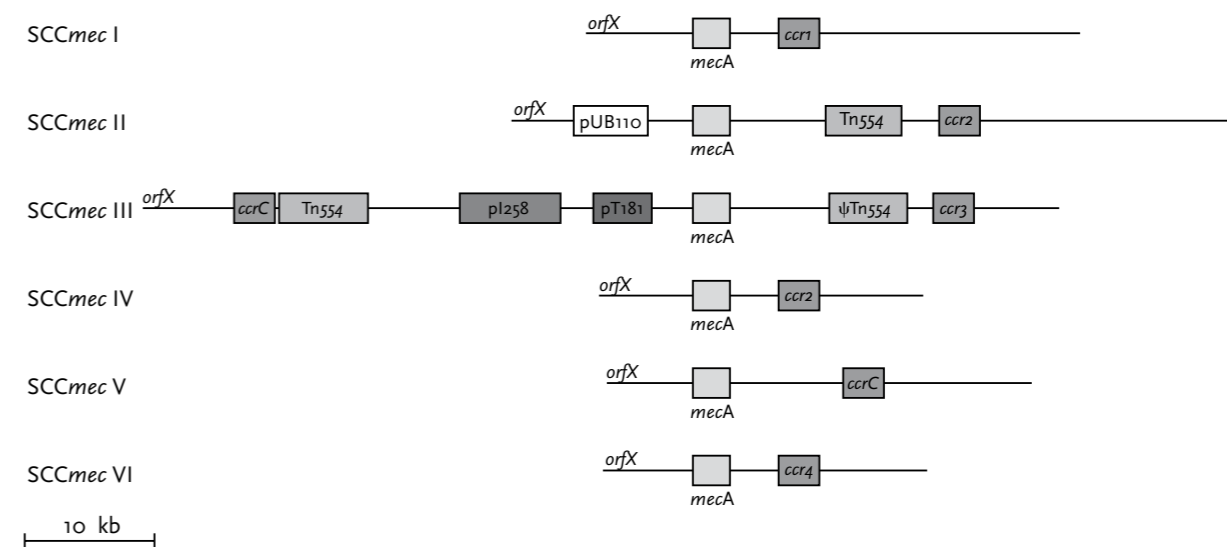
Het *mecA*-gen is gelegen op een mobiel genetisch element, het *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). Zes SCC*mec*-typen (I t/m VI) zijn beschreven (figuur 1). SCC*mec*-typen I, IV, V en VI hebben alleen resistentie- genen tegen bètalactamantibiotica. SCC*mec*-typen II en III hebben behalve resistentiegenen tegen bètalactamanti- biotica, ook resistentiegenen tegen andere klassen antibiotica doordat deze SCC*mec*-typen ingebouwde plasmiden en/of transposonen bevatten. Deze resisten- tiegenen gelegen op SCC*mec*-typen II en III, zijn p1258 (codeert voor resistentie tegen penicilline en zware metalen, zoals kwik), pT181 (codeert voor tetracyclineresistentie), pUB110 (codeert voor aminoglycosidenresistentie) en Tn554 (codeert voor induceerbare macrolide, lincosamide en streptogramineresistentie (MLS)) (figuur 1). Verder zijn op het SCC*mec*-element de *cassette chromosome recombi- nase*-genen (*ccr*) gelegen die zorgen voor de integratie en excisie van SCC*mec* in en uit het genoom van *S. aureus*. SCC*mec*-typen I, II, III, IV en VI zijn geassocieerd met MRSA-isolaten die afkomstig zijn uit ziekenhuizen (*hospital acquired* (HA)-MRSA), terwijl SCC*mec*-typen IV en V zijn geassocieerd met MRSA-isolaten afkomstig uit de open populatie (*community acquired* (CA)-MRSA). SCC*mec*-type IV kan dus zowel in HA-MRSA- als in CA-MRSA-isolaten aanwezig zijn. Behalve de zes standaard SCC*mec*-typen zijn er momenteel minimaal 16 varianten beschreven en dit aantal zal naar verwachting alleen maar toenemen in de komende jaren. Naast MRSA bezitten meticillineresistente coagulase-negatieve stafylokokken (MRCNS) eveneens een SCC*mec*-element en het daarop gelegen *mecA*-gen.¹⁴⁻¹⁷

Detectiemethoden voor MRSA

MRSA wordt momenteel gedetecteerd met behulp van fenotypische microbiologische methoden, al dan niet gevolgd door moleculaire biologische technieken zoals de PCR of de *real-time* PCR-techniek, voor detectie van het *mecA*-gen. Een nadeel van conventionele PCR in verge- lijking met *real-time* PCR is dat deze laatste gebruikmaakt van een gesloten systeem, waardoor de kans op contami- natie met vreemd materiaal kleiner is. Verder is *real-time* PCR twee tot drie keer zo snel in vergelijking met de conventionele PCR.¹⁸

Voor de isolatie van MRSA maken de fenotypische micro- biologische methoden gebruik van selectieve media die oxacilline of een ander bètalactamantibioticum bevatten, die de productie van PBP2a induceren. Na isolatie van MRSA wordt de aanwezigheid van PBP2a aangetoond met behulp van een latexagglutinatie-test, een immunolo- gische test waarbij anti-PBP2a monoklonale antilichamen worden gebruikt. Deze test duurt enkele minuten.

Figuur 1. Vereenvoudigde weergave van SCC*mec*-typen I t/m VI. De belangrijkste genen van de SCC*mec*-elementen (*ccr*, *mecA*, *orfX*, p1258, pT181, pUB110 en Tn554) zijn weergegeven.¹⁷



In sommige laboratoria wordt de aanwezigheid van *mecA* bevestigd met behulp van (*real-time*) PCR. Een nadeel van dergelijke methoden is de analysetijd, omdat de isolatie van *S. aureus* uit een complex monster een aantal dagen in beslag kan nemen. Daardoor kan het minimaal drie dagen duren voordat de uitslag bekend is. Patiënten die worden verdacht van MRSA-dragerschap dienen dus zeker drie dagen in isolatie te blijven, wat extra kosten met zich kan meebrengen.¹⁹

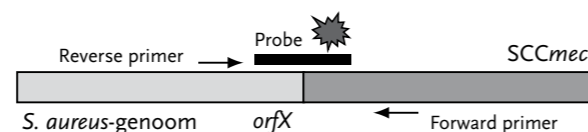
Een andere methode voor de detectie van MRSA is het aantonen van het *mecA*-gen met behulp van de (*real-time*) PCR-techniek. Bij *real-time* PCR wordt het geamplificeerde PCR-product gedetecteerd met behulp van een probe die een fluorescerend label heeft. De detectie van het *mecA*-gen kan worden gecombineerd met de detectie van *S. aureus*- specifieke genen, zoals *femA*,²⁰ *femB*,²¹ *nuc*²² of *SA442*.²³ Momenteel zijn in Nederland verschillende *in-house*-testen in gebruik of in ontwikkeling die op dit principe berusten. Een commerciële test die berust op de detectie van *mecA* en twee *S. aureus*-specifieke genen (coagulase en een *house- keeping*-gen) met behulp van probes in een ELISA-formaat is de StaphyloResist®-test van AlphaOmega (Bouwel-Goibbendonk, België). Deze test maakt echter gebruik van een open conventioneel PCR-systeem, waardoor de kans op contaminatie met vreemd materiaal groter is. Deze test kan in circa twee uur worden uitgevoerd, mits men de beschikking heeft over snelle *real-time* PCR-apparatuur. Deze en andere methoden die gebruikmaken van de detectie van *mecA* kunnen echter niet worden toegepast voor de detectie van MRSA direct op patiëntenmateriaal, aangezien zowel *S. aureus* als MRCNS gelijktijdig aanwezig kunnen zijn in klinische monsters die zijn genomen uit bijvoorbeeld de neus of van de huid. Er kunnen dus vals-positieve resultaten worden verkregen door de aanwe- zigheid van *mecA* in MRCNS-stammen en *femA*, *femB*, *nuc* of *SA442* in meticilline-gevoelige *S. aureus* (MSSA)- stammen.²⁴ Recent onderzoek in Duitsland, waar de prevalentie van MRSA 19 procent bedraagt, heeft echter aangetoond dat cokolonisatie van MRCNS en MSSA in de neus relatief laag is (3,4 procent). Toch zou een onaccep- table positief voorspellende waarde van 40 procent worden verkregen bij gebruik van een test waarin zowel *mecA* als een *S. aureus*-specifiek gen wordt gedetecteerd.²⁴ De orde van grootte van cokolonisatie van MRCNS en MSSA kan sterk variëren per afdeling; op de afdeling Neonatologie is de prevalentie meer dan 3,4 procent. Een selectieve verrijking voor MRSA vooraf of selectie van *S. aureus* met immunomagnetische deeltjes, kan bovenstaand probleem slechts gedeeltelijk oplossen.^{19,25} Francois *et al.* hebben een test ontwikkeld die berust op dit laatste principe. Bij deze test wordt *S. aureus* geprecipiteerd met behulp van een *S. aureus*-specifiek (*S. aureus* protein A (*spa*)) magnetisch gelabeld antilichaam, gevolgd door een kwantitatieve *real-time* PCR voor het *mecA*-gen en het *femA*-gen van *S. aureus* en *Staphylococcus epidermidis*. Bij een hoge concentratie van *mecA* en het *S. aureus*-specifieke *femA*-gen is MRSA aanwezig. Met deze test is het mogelijk zes uur na monsternamen van een neuswat een uitslag te hebben. Een evaluatie met 48 monsters leverde een gevoeligheid van 100 procent en een specificiteit van 64 procent op.²⁵ Bovenstaande in overweging nemende is het beter een test te gebruiken die MRSA direct en specifiek kan aantonen in klinische monsters.

Directe en snelle detectiemethode voor MRSA

Momenteel is een aantal testen commercieel beschikbaar voor de directe en snelle detectie van MRSA in patiën- temateriaal. Een test die berust op de niet-moleculaire

detectie van MRSA is de BacLite® Rapid MRSA-test (3M, Salisbury, Groot-Brittannië). Bij deze test wordt een neuswat in een selectief medium geïncubeerd, gevolgd door de precipitatie van *S. aureus* met behulp van een *S. aureus*-specifiek magnetisch gelabeld antilichaam. De detectie met behulp van ATP-bioluminescentie berust op de reactie $2 \text{ ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$, gekatalyseerd door het enzym adenylaatkinaze (AK), een voor cellen essentieel *house-keeping* enzym. Het vrijgekomen ATP wordt vervolgens gemeten met behulp van een luciferaseassay.^{19,26} De voordelen van deze test zijn de lage kostprijs (7 euro), de relatief gemakkelijke uitvoerbaarheid en het feit dat er geen PCR-apparatuur nodig is. De nadelen van deze test zijn dat deze test alleen is gevalideerd op neuswatten en een analysetijd heeft van vijf uur. De eerste evaluatieonderzoeken van deze test hebben een gevoeligheid van 90,4 procent, een specificiteit van 95,7 procent en een negatiefvoorspellende waarde van 98,7 procent aangetoond.²⁶ De GeneOhm™ MRSA-test (IDI-MRSA™; BD, Quebec, Canada) is gebaseerd op de amplificatie van het linker-gedeelte van SCCmec-typen I, II, III, IVa, IVb en IVc waarop *mecA* is gelegen, en een specifiek gedeelte van het *S. aureus*-genoom, genaamd *orfX*. In de test wordt gebruikgemaakt van vijf *forward primers* die kunnen binden aan de verschillende typen SCCmec-elementen en een enkele *reverse primer* die bindt aan het *S. aureus*-specifieke *orfX*-gen. Het geamplificeerde DNA wordt vervolgens gedetecteerd met behulp van drie fluorescerende probes (figuur 2). Omdat deze test gebruikmaakt van de snelle *real-time* PCR-techniek, kan de uitslag bekend zijn binnen één tot twee uur na monstername. De onderste detectiegrens van deze test is ongeveer 25 kolonievormende eenheden (KVE).²⁷ Er zijn negen evaluatieonderzoeken met de GeneOhm™ MRSA-test gepubliceerd. Deze toonden aan dat de GeneOhm™ MRSA-test

Figuur 2. Schematische weergave van het principe van de GeneOhm™ MRSA-test. In werkelijkheid maakt deze test gebruik van een set van *primers* en *probes* (oligonucleotiden met een fluorescente groep die worden gebruikt voor detectie door middel van *real-time* PCR).



een snelle en eenvoudige test is voor de detectie van MRSA met een gevoeligheid tussen 90 en 100 procent, een specificiteit tussen 91,7 en 98,8 procent, een positiefvoorspellende waarde tussen 56,3 en 98 procent en een negatiefvoorspellende waarde tussen 90 en 100 procent (tabel 1).²⁷⁻³⁵ Deze onderzoeken zijn uitgevoerd in landen met een hogere MRSA-prevalentie dan in Nederland, zoals Canada en de Verenigde Staten, hetgeen invloed heeft op de (positief) voorspellende waarde (die in Nederland mogelijk lager is).

De GeneOhm™ MRSA-test is verder verbeterd met als resultaat de GeneXpert® MRSA-test. Deze test die op hetzelfde principe berust als de GeneOhm™ MRSA-test, combineert de monstervoorbereiding en de *real-time* PCR in één apparaat. Door de automatische monstervoorbereiding is de monsterverwerkingstijd slechts vijf minuten en kan deze test worden uitgevoerd door personeel dat niet is gekwalificeerd voor laboratoriumwerkzaamheden, zoals het verplegend personeel. Met deze methode is het mogelijk om een monster dat MRSA bevat met SCCmec-type I t/m V binnen twee uur op te sporen. De fabrikant geeft een detectiegrens aan van 50 CFU, een gevoeligheid van 95,6 procent en een specificiteit van 93,8 procent. Momenteel zijn er nog geen evaluatieonderzoeken van deze test uitgevoerd.

Tabel 1. Overzicht van de negen evaluatieonderzoeken van de GeneOhm™ MRSA-test.

ONDERZOEK	PREVALENTIE MRSA (%)	AANTAL MONSTERS	GEVOELIGHEID (%)	SPECIFICITEIT (%)	PPV (%)	NPV (%)
Huletsky et al. ²⁷	16 (Canada)	1.657	98,7	98,4	-	-
Warren et al. ²⁹	57 (USA)	288	91,7	93,5	82,5	97,1
Huletsky et al. ³⁰	16 (Canada)	331	100,0	98,4	95,3	100,0
Wren et al. ³⁵	45 (UK)	1.879	95,0	98,8	84,4	99,6
Desjardins et al. ³²	16 (Canada)	287	96,0	96,0	98,0	90,0
Nhuyen Van et al. ³³	29 (Frankrijk)	682	100	96,0	70,0	100,0
Bishop et al. ³¹	22 (Australië)	192	90,0	91,7	56,3	98,8
Drews et al. ²⁸	16 (Canada)	307	96,0	96,0	-	-
Oberdorfer et al. ³⁴	19 (Duitsland)	320	92,3	98,6	75,0	99,6

Prevalentie van MRSA: () het land waar het betreffende onderzoek is uitgevoerd

PPV = positief voorspellende waarde

NPV = negatief voorspellende waarde

Op dit moment is ook een andere PCR-test beschikbaar die op het hetzelfde principe berust als de GeneOhm™ MRSA-test. In deze test, de GenoType® MRSA Direct-test (Hain Lifescience, Nehren, Duitsland), wordt een conventionele PCR-test gevolgd door een hybridisatiestap, waarbij het MRSA-specifieke PCR-fragment bindt aan probes die zijn gebonden aan een zogenaamde DNA-STRIP®. Deze test zou ongeveer vier uur in beslag nemen en biedt tevens de mogelijkheid om SCCmec-typen I t/m IV te detecteren. Deze test heeft een onderste detectiegrens tussen de 20 en 30 KVE. In een Duitse evaluatieonderzoek (MRSA-prevalentie 19 procent) met 508 monsters werd een gevoeligheid van 94,6 procent, een specificiteit van 98,7 procent, een positiefvoorspellende waarde van 85,4 procent en een negatiefvoorspellende waarde van 99,6 procent gevonden.³⁶ Deze testen hebben echter nadelen. Bij de deletie van SCCmec kunnen delen van de cassette achterblijven in het *S. aureus*-genoom. Indien alleen een deel van het linker-gedeelte van de SCCmec-cassette achterblijft maar niet het *mecA*-gen, zou een vals-positief resultaat kunnen worden verkregen.³⁷ Een recent onderzoek beschrijft een dergelijk vals-positief signaal met behulp van de GenoType® MRSA Direct-test bij een MSSA-stam. Aangetoond werd dat een fragment van circa 400 bp aanwezig was dat bestond uit het linker-gedeelte van SCCmec en *orfX*.³⁸ Het niet direct aantonen van *mecA*, zoals met de GeneOhm™ MRSA en de GenoType® MRSA Direct-test kan dus leiden tot vals-positieve resultaten. Een ander nadeel is dat er steeds vaker nieuwe SCCmec-typen worden beschreven, vooral in MRSA-stammen in de open populatie. Nieuwe SCCmec-typen zoals type V, vereisen een steeds verdere ontwikkeling van de *primers* die binden op het SCCmec-element. Dit laatste probleem zou echter kunnen worden omzeild door gebruik te maken van een andere, conventionele PCR die is beschreven door Cuny et al.³⁹ Deze test maakt gebruik van slechts twee *primers*, één voor elk SCCmec-element en één voor *orfX*. Deze test werd geëvalueerd op 100 MRSA-, 100 MSSA- en 100 MRCNS-isolaten en gaf een gevoeligheid van 100 procent en een specificiteit van 100 procent. In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van de directe en

snelle detectiemethoden van MRSA waarbij het target, de benodigde apparatuur, de monsterverwerkingstijd, de analysetijd en de kosten worden vergeleken. De BacLite® Rapid-test en de GeneXpert® MRSA-test worden beide gekenmerkt door een korte monsterverwerkingstijd; de GeneXpert® MRSA-test heeft daarentegen een veel kortere analysetijd, maar is ook de duurste test.

De eerste evaluaties van de GeneOhm™ MRSA-test, zoals weergegeven in tabel 1, zijn veelbelovend. Deze resultaten zijn echter afkomstig van onderzoeken in situaties met een relatief hoge prevalentie van MRSA. Om deze test ook in een situatie met een relatief lage prevalentie te evalueren is recent een Nederlandse onderzoek gestart, het MRSA-Direct-onderzoek, waarin 12 Nederlandse ziekenhuizen participeren. Dit onderzoek heeft als primair doel de kosteneffectiviteit van het routinematige gebruik van de GeneOhm™ MRSA-test in het kader van het Nederlandse *search and destroy*-beleid in kaart te brengen. Het onderzoek dat een periode van een jaar in beslag heeft genomen, bevindt zich momenteel in de evaluatiefase. De resultaten zullen openbaar worden gemaakt in een wetenschappelijke publicatie. Op dit moment is ook een evaluatieonderzoek gaande met de GeneXpert® MRSA-test.

Summary

The prevention of the dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) poses a challenge to healthcare facilities since MRSA is hard to combat with antibiotics. As a consequence, the presence of MRSA in healthcare facilities leads to an increase of the cost of patient care due to infection control measurements. Therefore, rapid identification of MRSA strains, before they can disseminate, is crucial. However, the identification of MRSA using phenotypical microbiological methods may take up to five days, because *S. aureus* has to be isolated from a complex biological sample. Although molecular detection methods, such as the determination of the *mecA* gene by (real-time) PCR, are generally faster, they could previously not be used directly on patient samples, since these tests could not discriminate between MRSA

Tabel 2. Overzicht van de verschillende directe en snelle detectiemethoden voor MRSA.

TEST	TARGET	APPARATUUR	MONSTER-VERWERKINGSTIJD (MIN)	ANALYSETIJD (UUR)	KOSTPRIJS PER MONSTER (€)
StaphyloResist®	<i>mecA</i>	PCR	90	2	10
BacLite® Rapid MRSA	MRSA	BacLite®	5	5	7
GeneOhm™ MRSA	SCCmec	SmartCycler	60	3	15
GeneXpert® MRSA	SCCmec	GeneXpert	5	2	35
GenoType® MRSA Direct	SCCmec	PCR	60	4	25

De monsterverwerkingstijd, de analysetijd en de kosten zijn schattingen.

and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCNS). However, novel molecular assays have recently been launched which are able to detect MRSA directly in patient material. In this paper, these tests will be discussed. In addition, a Dutch multi-center study, the MRSA-Direct study, will be described in which a rapid diagnostic test was used in a ‘search and destroy’ setting, and of which the results are currently being evaluated.

Literatuur

- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998;339:520-32.
- Jevons MP. Celbenin-resistant staphylococci. BMJ 1961;1:124-5.
- de Sousa MA, de Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. FEMS Immunol Med Microbiol 2004;40:101-11.
- Bell JM, Turnidge JD. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:879-81.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis 2001;32 Suppl 2:S114-32.
- Tiemersma EW, Bronzwaer SL, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. Emerg Infect Dis 2004;10:1627-34.
- Pittet D, Hugonnet S, Harbarth S, Mourouga P, Sauvan V, Touveneau S, et al. Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme. Lancet 2000;356:1307-12.
- Faria NA, Oliveira DC, Westh H, Monnet DL, Larsen AR, Skov R, et al. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol 2005;43:1836-42.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. Emerg Infect Dis 2003;9:978-84.
- Deurenberg RH, Vink C, Oudhuis GJ, Mooij JE, Driessen C, Coppens G, et al. Different clonal complexes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* are disseminated in the Euregio Meuse-Rhine region. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:4263-71.
- Witte W, Strommenger B, Stanek C, Cuny C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. Emerg Infect Dis 2007;13:255-8.
- Wagenvoort JH, De Brauer EI, Sijstermans ML, Toenbreker HM. Risk of re-introduction of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into the hospital by intrafamilial spread from and to healthcare workers. J Hosp Infect 2005;59:67-8.
- Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol 2002;178:165-71.
- Chongtrakool P, Ito T, Ma XX, Kondo Y, Trakulsomboon S, Tiensasitorn C, et al. Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for SCC*mec* elements. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1001-12.
- Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCC*mec* in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol 2006;46:8-20.
- Oliveira DC, Milheirico C, de Lencastre H. Redefining a structural variant of Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*, SCC*mec* type VI. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:3457-9.
- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007;13:222-35.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989;339:237-8.
- Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005;56:1000-18.
- Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, et al. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. J Clin Microbiol 1995;33:2864-7.
- Towner KJ, Talbot DC, Curran R, Webster CA, Humphreys H. Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Med Microbiol 1998;47:607-13.
- Barski P, Piechowicz L, Galinski J and Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. Mol Cell Probes 1996;10:471-5.
- Grisold AJ, Leitner E, Muhlbauer G, Marth E and Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. J Clin Microbiol 2002;40:2392-7.
- Becker K, Pagnier I, Schuhen B, Wenzelburger F, Friedrich AW, Kipp F, et al. Does nasal cocolonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains occur frequently enough to represent a risk of false-positive methicillin-resistant *S. aureus* determinations by molecular methods? J Clin Microbiol 2006;44:229-31.
- Francois P, Pittet D, Bento M, Pepey B, Vaudaux P, Lew D, et al. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. J Clin Microbiol 2003;41:254-60.
- Johnson G, Millar MR, Matthews S, Skyrme M, Marsh P, Barringer E, et al. Evaluation of BacLite Rapid MRSA, a rapid culture based screening test for the detection of ciprofloxacin and methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) from screening swabs. BMC Microbiol 2006;6:83.
- Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, et al. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. J Clin Microbiol 2004;42:1875-84.
- Draws SJ, Willey BM, Kreiswirth N, Wang M, Ianes T, Mitchell J, et al. Verification of the IDI-MRSA assay for detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in diverse specimen types in a core clinical laboratory setting. J Clin Microbiol 2006;44:3794-6.
- Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM, Jr. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay. J Clin Microbiol 2004;42:5578-81.
- Huletsky A, Lebel P, Picard FJ, Bernier M, Gagnon M, Boucher N, et al. Identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage in less than 1 hour during a hospital surveillance program. Clin Infect Dis 2005;40:976-81.
- Bishop EJ, Grabsch EA, Ballard SA, Mayall B, Xie S, Martin R, et al. Concurrent analysis of nose and groin swab specimens by the IDI-MRSA PCR assay is comparable to analysis by individual-specimen PCR and routine culture assays for detection of colonization by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006;44:2904-8.
- Desjardins M, Guibord C, Lalonde B, Toye B, Ramotar K. Evaluation of the IDI-MRSA assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from nasal and rectal specimens pooled in a selective broth. J Clin Microbiol 2006;44:1219-23.
- Nguyen Van JC, Kitzis MD, Ly A, Chalfine A, Carlet J, Ben Ali A, et al. Detection of nasal colonization methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a prospective study comparing real-time genic amplification assay vs selective chromogenic media. Pathol Biol (Paris) 2006;54:285-92.
- Oberdorfer K, Pohl S, Frey M, Heeg K, Wendt C. Evaluation of a single-locus real-time polymerase chain reaction as a screening test for specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ICU patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;25:657-63.
- Wren MW, Carder C, Coen PG, Gant V, Wilson AP. Rapid molecular detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006;44:1604-5.
- Holfelder M, Eigner U, Turnwald AM, Witte W, Weizenegger M, Fahr A. Direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens by a nucleic acid-based hybridisation assay. Clin Microbiol Infect 2006;12:1163-7.
- Corkill JE, Anson JJ, Griffiths P, Anthony Hart C. Detection of elements of the staphylococcal cassette chromosome (SCC) in a methicillin-susceptible (*mecA* gene negative) homologue of a fucidin-resistant MRSA. J Antimicrob Chemother 2004;54:229-31.
- Rupp J, Fenner I, Solbach W, Gieffers J. Be aware of the possibility of false-positive results in single-locus PCR assays for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2006;44:2317.
- Cuny C, Witte W. PCR for the identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCC*mec* elements and the neighbouring chromosome-borne *orfX*. Clin Microbiol Infect 2005;11:834-7.

Diagnostiek van resistentie van *Mycobacterium tuberculosis*

H.R. van Doorn

Samenvatting

In de jaren '90 van de vorige eeuw bestond, mede naar aanleiding van een epidemie onder hiv-patiënten in New York, de angst dat resistentie bij *Mycobacterium tuberculosis* een toenemend probleem zou worden. Inmiddels is gebleken dat in Nederland het voorkomen van resistentie zo goed als gelijk is gebleven. In bepaalde landen is resistentie echter wel een groot probleem en men moet bedacht zijn op resistentie wanneer patiënten deze gebieden hebben bezocht of daar zijn geboren. De verschillende bestaande methoden van resistentiebepaling en de toepasbaarheid ervan, zullen in dit artikel worden besproken, waarbij de nadruk ligt op nieuwe snelle technieken. Tevens zullen de indicaties voor versnelde resistentiediagnostiek worden besproken.

Trefwoorden: Resistentiebepaling bij tuberculose, multidrugresistentie (MDR), MDR-tuberculose

Inleiding

Resistentie is een spontaan optredend verschijnsel in *M. tuberculosis*, de verwekker van tuberculose. Puntnmutaties leidend tot resistentie tegen de twee sterkstwerkende middelen – isoniazide (INH) en rifampicine (RIF) – treden op met een frequentie van respectievelijk 10^{-7} tot 10^{-9} en 10^{-10} per deling. Dit leidt dan tot een prevalentie van resistente bacteriën van respectievelijk één per 10^6 en één per 10^8 . Omdat een gemiddelde tuberculeuze caverne ongeveer 10^7 bacteriën bevat, zullen resistente bacteriën vaak spontaan ontstaan zonder antibiotische druk en zullen ze tijdens therapie worden uitgeselecteerd.¹ Multidrugresistentie (MDR), gedefinieerd als resistentie tegen ten minste RIF en INH, zou dan dus optreden in één per 10^{14} ($10^6 \times 10^8$) bacteriën.

In de jaren '40 en '50 van de vorige eeuw viel op dat resistentie snel optrad tijdens monotherapie met streptomycine of INH.²⁻⁸ Vanaf dat moment was duidelijk dat tuberculose alleen succesvol kon worden bestreden als een behandelingsregime met meerdere middelen werd gebruikt, zowel voor de individuele patiënt als voor de volksgezondheid.

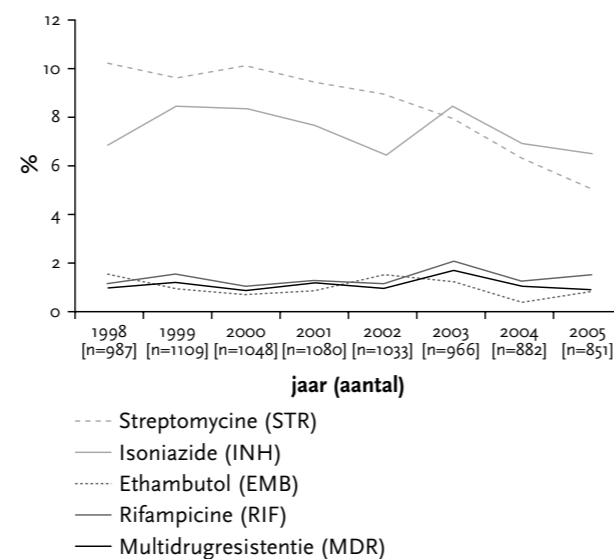
Naast het voorschrijven van een te smal of te kort regime zijn slechte *compliance*, slechte kwaliteit van de tuberculo-

statica (vooral in ontwikkelingslanden) en onvoldoende supervisie van de patiënt door de behandelende arts oorzaken van het ontstaan van resistentie.

Resistentie en MDR zijn in Nederland een relatief klein probleem. Hoewel er angst bestond dat het resistentieprobleem enorm zou toenemen, zijn de percentages de laatste jaren hoogstens ongeveer gelijk gebleven (figuur 1). Voor INH, RIF en ethambutol waren de percentages voor onbehandelde tuberculose in 2005 respectievelijk 6,6, 1,5 en 0,8. MDR kwam in 0,9 procent van de gevallen voor (figuur 1).⁹

Omdat in Nederland de behandeling met vier middelen wordt gestart, zal resistentie tegen één middel geen directe

Figuur 1. Prevalentie van resistentie voor vier tuberculostatika in Nederland van 1998 tot en met 2005 van isolaten die naar het RIVM werden opgestuurd.⁹



H.R. van Doorn, afdeling Medische microbiologie, Kamer L1-245, Academisch Medisch Centrum, Postbus 22660, 1100 DD Amsterdam, email: h.r.vandoorn@amc.uva.nl.

consequenties hebben. Bij MDR werken de twee meest effectieve middelen niet meer en komt het succes van de behandeling in gevaar.

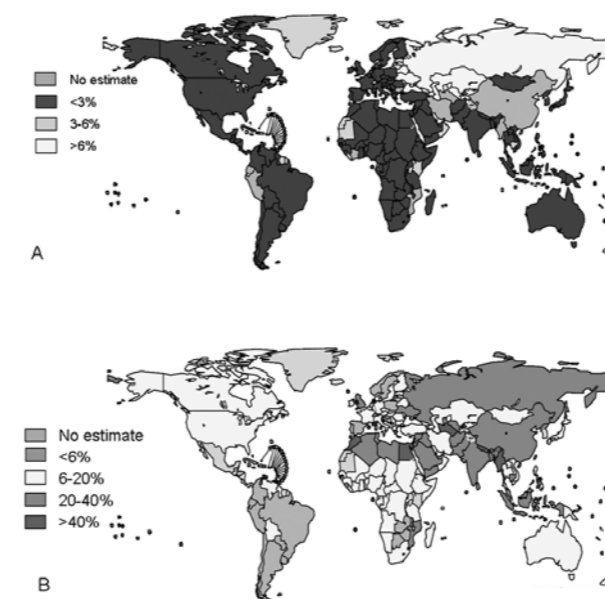
In 2003 werd eenmalig een kleine epidemie van MDR-tuberculose gezien, waarbij vanuit één bronpatiënt uit Oost-Europa tien mensen besmet raakten, van wie er tot nu toe vier tuberculose ontwikkelden.⁹

Ondanks de lage prevalentie in Nederland moeten behandelaars zich realiseren dat die percentages in sommige landen beduidend hoger liggen (figuur 2). Landen met een hoge incidentie zijn de Baltische staten (Estland, Letland, Litouwen) en andere voormalige Sovjetrepublieken en Oostbloklanden, Rusland zelf, Iran en Zuidoost-Azië. Als immigranten uit die landen of toeristen die deze landen hebben bezocht, zich met tuberculose melden, moet aan (multidrug)resistentie worden gedacht (figuur 2). In Noord-Amerika, West-Europa en Japan, maar ook in Afrika en Zuid-Amerika is de prevalentie van (multidrug)resistentie aanzienlijk lager.¹⁰

Vanuit Zuidoost-Azië heeft zich recent een hypervirulente stam over de rest van de wereld verspreid: het Beijing-genotype of clade. Deze stam is in de meeste landen van Zuidoost-Azië inmiddels het meest voorkomende genotype. Hoewel deze stam in Zuidoost-Azië niet met resistentie is geassocieerd, worden sporadisch in andere delen van de wereld epidemieën met MDR-bacteriën van dit genotype gezien.¹¹ In Nederland is vijf tot tien procent van de isolaten van het Beijing-genotype, maar ook hier wordt geen associatie met resistentie gezien.¹²

Globaal kan worden gezegd dat aan (multidrug)resistentie moet worden gedacht wanneer patiënten eerder zijn

Figuur 2. Prevalentie van multidrugresistente tuberculose onder onbehandelde (A) en eerder behandelde (B) patiënten. Bron: World Health Organization (WHO, 2006).



behandeld, falen op therapie of wanneer ze uit Oost-Europa en Azië komen. In deze gevallen is het van belang snel in kaart te brengen met welke middelen de bacterie nog kan worden behandeld. Vooral het bepalen van de gevoeligheid voor RIF is van belang: RIF is één van de middelen waar MDR-isolaten ongevoelig voor zijn en RIF-resistentie wordt in het merendeel van de gevallen in combinatie met INH-resistentie gezien. RIF-resistentie is dus een marker voor MDR (figuur 1).

De recent beschreven epidemische verheffing van *extensively drug resistant* (XDR)-isolaten in zuidelijk Afrika¹³, die behalve voor INH en RIF ook ongevoelig zijn voor ten minste één van de fluorochinolonen en voor één van de drie *injectables* (amikacine, kanamycine of capreomycine) noopt ook tot waakzaamheid bij patiënten afkomstig uit die regio. In Nederland zijn dergelijke isolaten uitermate zeldzaam; bij het RIVM wordt er gemiddeld één per jaar gezien (Kremer, persoonlijke mededeling).

In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de verschillende beschikbare methoden om resistentie vast te stellen: de conventionele methode en een aantal manieren om de gevoeligheid versneld te bepalen, waarbij de nadruk op commercieel verkrijgbare methoden zal liggen.

Conventionele gevoeligheidsbepalingen

Bij het RIVM wordt van alle in Nederland geïsoleerde *M. tuberculosis*-complexisolaten het resistentieprofiel bepaald met de minimaal remmende concentratiemethode (MIC) op 7H10-medium volgens een agardilutie. Hierbij wordt op kwantitatieve wijze (proportioneel) gemeten bij welke concentratie van tuberculostatika de groei van mycobacteriën wordt geremd. De MIC is die concentratie waarbij de groei van meer dan 99 procent van het inoculum wordt geremd.¹⁴ Hiervoor dient een gekweekt isolaat te worden ingestuurd waarna de uitslag circa twee tot vier weken later volgt.

Colorimetrische gevoeligheidsbepalingen

Tijdwinst kan worden behaald door van gekweekte kolonies van vaste voedingsbodems of medium van positieve vloeibare culturen een zogenaamde éénpuntsbepaling in vloeibaar MGIT- of BACTEC-medium te doen. Hierbij wordt de groei van mycobacteriën gemeten bij een breekpuntconcentratie van een tuberculostaticum.¹⁴ Resistentie wordt aangetoond wanneer in aanwezigheid van een tuberculostaticum sneller groei wordt gezien dan bij een honderdmaal kleiner inoculum zonder tuberculostaticum. Deze bepalingen zijn binnen 7 tot 21 dagen uit te voeren.

Er is ook een aantal niet commerciële alternatieven beschreven om colorimetrisch de gevoeligheid vast te stellen. Zo is er de *nitrate reductase assay* (NRA) waarbij gebruik wordt gemaakt van het vermogen van mycobacteriën om nitraat in nitriet om te zetten.¹⁵ Andere methoden om levende bacteriën in aanwezigheid van

tuberculostatica aan te tonen zijn Alamar Blauw¹⁶ of een tetrazoliumzout (MTT).¹⁷ Deze methoden zijn simpel en goedkoop en de snelheid, sensitiviteit en specificiteit zijn vergelijkbaar met de commerciële systemen.

Mycobacteriofagen

Mycobacteriofagen zijn viruspartikeltjes die alleen levende mycobacteriën kunnen infecteren. Van deze eigenschap wordt op twee verschillende manieren gebruikgemaakt. In de *luciferase reporter phage assay* worden fagen gebruikt die luciferase tot expressie brengen. De fagen worden toegevoegd aan mycobacteriën in aanwezigheid van een tuberculostaticum. Aangezien de fagen zich alleen kunnen vermenigvuldigen in levende mycobacteriën duidt detectie van licht op resistentie en afwezigheid op gevoeligheid. Bij de commercieel verkrijgbare methode FASTPlaqueTB™ (Biotec Laboratories Ltd., Ipswich, Verenigd Koninkrijk) worden fagen ook toegevoegd aan mycobacteriën in aanwezigheid van een tuberculostaticum. Vervolgens worden de fagen geïnactiveerd. Fagen die al in het genoom van een resistente bacterie zijn geïntegreerd, zullen echter overleven en hun gastheer lyseren. Deze vrijkomende fagen worden vervolgens aan een plaat met sensorcellen toegevoegd waardoor duidelijk herkenbare plaques ontstaan. Met deze methoden kan vanuit een primair isolaat de gevoeligheid in twee tot vier dagen worden bepaald. Een direct op sputum toepasbare variant (FASTPlaque-Response™) is inmiddels ook verkrijgbaar. In een meta-analyse laten Pai *et al.* zien dat de sensitiviteit van de FASTPlaqueTB goed is, bij vijf van de zes evaluaties is deze hoger dan 95 procent, terwijl de specificiteit van drie van de zes evaluaties lager is dan 90 procent.¹⁸ Ongestandaardiseerde afkapwaardes en vermenigvuldiging van fagen in atypische mycobacteriën zouden de oorzaak van de teleurstellende specificiteit zijn. Een voordeel van deze test is de relatief lage kostprijs.

Microscopic Observation Drug Susceptibility assay

Microscopic Observation Drug Susceptibility assay (MODS) is een kweekmethode waarbij klinisch materiaal van een patiënt in een 3x4-well microtiterplaat in vloeibare Middlebrook-7H9-bouillon wordt geïncubeerd. Aan de verschillende wells kunnen verschillende concentraties tuberculostatica worden toegevoegd. De microtiterplaat wordt vervolgens in een plastic zak geseald waarna regelmatig onder de microscoop wordt gekeken of er groei van *M. tuberculosis* is te zien. Door de vorming van *cord factor* hebben *M. tuberculosis*-mikrokolonies een zeer karakteristiek uiterlijk dat zowel van banale bacteriën als van niet-tuberculeuze mycobacteriën is te onderscheiden. *Mycobacterium chelonae* vormt als enige van de niet-tuberculeuze mycobacteriën ook *cord factor*, maar deze is door de groeisnelheid (aanzienlijk sneller) van *M. tuberculosis* te onderscheiden. In 2000 werd MODS voor het eerst beschreven en sindsdien verschijnen er met enige regelmaat positieve publicaties.¹⁹

In een recente publicatie in *The New England Journal of Medicine* wordt deze methode prospectief vergeleken met conventionele kweek op vaste en vloeibare media.²⁰ Kweken werden met MODS gemiddeld positief in zeven dagen (tegenover 13 en 26 dagen in respectievelijk vloeibare en vaste media) en de gevoeligheid was ook in gemiddeld zeven dagen bekend. Zowel sensitiviteit als specificiteit waren voor RIF 100 procent, voor INH was dat respectievelijk 84,6 en 99,6 procent. MODS lijkt dus een aantrekkelijk sneller alternatief voor zowel kweek als gevoeligheidsbepaling. Er zijn echter ook nadelen. Het op het oog leren beoordelen van de microkolonies vereist de nodige training. Onvoldoende ervaring kan aanleiding geven tot fout-positieve uitslagen (Maxine Caws en Dang Thi Minh Ha, persoonlijke mededeling). Mede hierom is het ook niet aan te bevelen MODS te implementeren in een lab waar maar weinig positieve kweken met *M. tuberculosis* worden gezien. Verder is het beoordelen van de microtiterplaten op groei veel arbeidsintensiever dan het op groei beoordelen van vaste media of het werken met geautomatiseerde vloeibare kweeksystemen.

PCR

Resistentie kan ook worden gedetecteerd door het met behulp van PCR amplificeren van genen van de bacterie waarin zich met resistentie geassocieerde mutaties bevinden. Voor de meeste tuberculostatica zijn deze mutaties in kaart gebracht. Puntmutaties in *rpoB* geven aanleiding tot 95 procent van de gevallen van RIF-resistentie, INH-resistentie wordt veroorzaakt door mutaties in *katG* (55 procent), *inhA* (15 procent) en andere genen.^{21,12} De aanwezigheid van mutaties kan worden aangetoond door bijvoorbeeld hybridisatie met probes tijdens *real-time* PCR of na amplificatie (bijvoorbeeld *line probe assay*, zie hierna), door de gehele sequentie te bepalen (*sequencing*), door gebruik te maken van restrictie-enzymen die een gemuteerd gen wel of niet knippen (*restriction endonuclease assay*, REA) of door verschillende migratiesnelheden in een gel van wildtype en mutant DNA. Het voordeel van PCR is dat het in principe direct op klinisch materiaal kan worden toegepast. De sensitiviteit is echter hoger op gekweekte isolaten. Nadelen zijn dat voor elk gen een aparte PCR moet worden opgezet en dat deze methoden experimenteel en niet gestandaardiseerd zijn, met uitzondering van *line probe assays*. Bij deze *line probe assays* wordt PCR-product op een stripje aangebracht waarop probes zijn geïmmobiliseerd die met wildtype of mutant DNA hybridiseren. Hybridisatie wordt vervolgens met een kleurreactie zichtbaar gemaakt. Innogenetics (Gent, België) produceert de Inno-LiPA-RIF om RIF-resistentie geassocieerde mutaties in het *rpoB*-gen vast te stellen en Hain Lifescience (Nehren, Duitsland) de Genotype MTBDR, waarmee zowel RIF- als INH-resistentie kan worden aangetoond in respectievelijk *rpoB* en *katG*. De

testen zijn in principe ontwikkeld om te gebruiken op DNA van gekweekte isolaten, maar ook het directe gebruik op uit sputum geïsoleerd DNA is beschreven. Voor RIF is de sensitiviteit van beide testen meer dan 95 procent en de specificiteit nagenoeg 100 procent.^{22,23} Voor INH is de sensitiviteit afhankelijk van de lokale prevalentie van de *katG*-mutatie die met de test wordt aangetoond. In Nederland is dit slechts 55 procent.¹² Voor direct gebruik op sputum wordt voor die mutatie een sensitiviteit tussen 80 en 100 procent gevonden.²³ De testen zijn relatief gemakkelijk uit te voeren, vooral voor laboratoria die al ervaring hebben met het gebruik van *line probe assays* voor de determinatie van mycobacteriën. Knelpunten zijn de strikte temperatuurcondities bij de hybridisatiestap en de mogelijkheid van kruiscontaminatie bij de verschillende incubatie- en wasstappen die moeten worden uitgevoerd, terwijl de strips in een meegeleverd plastic bakje naast elkaar in verschillende welletjes liggen. Dit laatste risico is kleiner bij de Inno-LiPA-RIF, omdat daarbij losse welletjes voor één strip op enige afstand van elkaar in een houder kunnen worden geplaatst.

Conclusie

Vanwege de lage prevalentie van MDR in Nederland is het maar zelden geïndiceerd om versneld de gevoeligheid van *M. tuberculosis*-isolaten te bepalen. De hier beschreven fenotypische methoden hebben allemaal een uitstekende sensitiviteit en specificiteit. Omdat het in de praktijk hooguit een paar keer jaar per laboratorium voor zal komen dat er vraag is naar versnelde gevoeligheidsbepaling, lijkt het aan te bevelen methoden te gebruiken die verwant zijn aan methoden waarmee in het eigen laboratorium al ervaring is opgedaan, bijvoorbeeld éénpuntsbepaling in een geautomatiseerd systeem voor kweek in vloeibaar medium. Laboratoria die al *line probe assays* gebruiken voor determinatie van mycobacteriën kunnen gemakkelijk een *line probe assay* voor gevoeligheidsbepaling implementeren. Het succesvolle gebruik op direct materiaal is weliswaar een aantal keren beschreven, maar omdat de testen hiervoor niet zijn gevalideerd, dienen resultaten in de praktijk met het nodige voorbehoud te worden behandeld. De resultaten uit de verschillende MODS-onderzoeken zijn zeer hoopgevend. Het gebruik hiervan lijkt echter alleen zinvol in gespecialiseerde laboratoria waar zeer vaak positieve tuberculosekweken worden gezien.

Summary

In the last decennium of the 20th century, when an epidemic among HIV patients in New York City was seen, an increase of resistance among *Mycobacterium tuberculosis* was anticipated. However, since then the prevalence of resistance in The Netherlands has remained stable. But in some countries there has been an increase in resistant isolates

and physicians should be aware of this when their patients develop tuberculosis after a visit to such a country, or when they were born there. The different available methods of resistance diagnostics and the applicability in the routine microbiology lab will be discussed in this article, with an emphasis on newer, rapid technologies. Furthermore, the indications for ordering a rapid test will be discussed.

Dankbetuiging

Ik dank Caroline Visser voor het meedenken en het nalezen van dit manuscript.

Literatuur

1. David HL. Probability distribution of drug-resistant mutants in unselected populations of *Mycobacterium tuberculosis*. Appl Microbiol 1970;20:810-4.
2. Youmans GP, Williston EH, Feldman WH, Hinshaw HC. Increase in resistance of tubercle bacilli to streptomycin: a preliminary report. Proc Staff Meeting Mayo Clinic 1946;21:126-7.
3. Hobby GL, Lenert TF. Resistance to isonicotinic acid hydrazide. Am Rev Tuberc 1952;65:771-4.
4. Middlebrook G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli; a preliminary report. Am Rev Tuberc 1954;69:471-2.
5. Pansy F, Stander H, Donovick R. In vitro studies on isonicotinic acid hydrazide. Am Rev Tuberc 1952;65:761-4.
6. Steenken W, Meade GM, Wolinsky E, Coates EO. Demonstration of increased drug resistance of tubercle bacilli from patients treated with hydrazines of isonicotinic acid. Am Rev Tuberc 1952;65:754-8.
7. Szybalski W, Bryson V. Bacterial resistance studies with derivatives of isonicotinic acid. Am Rev Tuberc 1952;65:768-70.
8. Buck M and Schnitzer RJ. The development of drug resistance of *M. tuberculosis* to isonicotinic acid hydrazide. Am Rev Tuberc 1952;65:759-60.
9. van Soolingen D, Kremer K, Erkens CGM, et al. Surveillance van tuberculosetransmissie en resistentie in Nederland. Infectieziekt Bull 2007;18:12-8.
10. Aziz MA, Wright A, Laszlo A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis. Lancet 2006;368:2142-54.
11. Glynn JR, Kremer K, Borgdorff MW, Rodrigues MP, van Soolingen D. Beijing/W genotype *Mycobacterium tuberculosis* and drug resistance. Emerg Infect Dis 2006;12:736-43.
12. Doorn HR van, Haas PEW de, Kremer K, et al. Public health impact of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains with a mutation at amino-acid position 315 of *katG*: a decade of experience in The Netherlands. Clin Microbiol Infect 2006;12:769-75.
13. Emergence of *Mycobacterium tuberculosis* with extensive resistance to second-line drugs--worldwide, 2000-2004. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2006;55:301-5.
14. Vlaspolder F, Gageldonk-Lafeber RAB van, Kuijper EJ, Soolingen D van. Laboratoriumdiagnostiek van tuberculose in Nederland; inventarisatie van de situatie in 2001 getoetst aan de richtlijn Mycobacteriële laboratoriumdiagnostiek. Infectieziekt Bull 2007;18:45-54.
15. Angeby KA, Klintz L, Hoffner SE. Rapid and inexpensive drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* with a nitrate reductase assay. J Clin Microbiol 2002;40:553-5.
16. Palomino JC, Martin A, Camacho M, et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2720-2.
17. Abate G, Mshana RN, Miorner H. Evaluation of a colorimetric assay based on 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) for rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis 1998;2:1011-6.

18. Pai M, Kalantri S, Pascopella L, Riley LW, Reingold AL. Bacteriophage-based assays for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a meta-analysis. *J Infect* 2005;51:175-87.
19. Caviedes L, Lee TS, Gilman RH, et al. Rapid, efficient detection and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum by microscopic observation of broth cultures. The Tuberculosis Working Group in Peru. *J Clin Microbiol* 2000;38:1203-8.
20. Moore DA, Evans CA, Gilman RH, et al. Microscopic-observation drug-susceptibility assay for the diagnosis of TB. *N Engl J Med* 2006;355:1539-50.
21. Ramaswamy S and Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998;79:3-29.
22. Makinen J, Marttila HJ, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H. Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2006;44:350-2.
23. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005;5:62.

Hiv-behandeling door de jaren heen

J.G. den Hollander, M.E. van der Ende

Samenvatting

In juni 2006 was het 25 jaar geleden dat aids voor het eerst werd beschreven. Van een in die tijd dodelijke ziekte is het steeds meer een chronische ziekte geworden, althans in de westerse wereld. Dit ging echter niet zonder bijwerkingen zoals lipodystrofie, cholesterol- en vetzuurproblemen, verhoogd cardiovasculair risico en een verhoogde kans op bepaalde vormen van kanker. Ondanks het grote succes van de antiretrovirale therapie blijft ontwikkeling van nieuwe middelen en basale research nodig, omdat er tegen de bestaande therapieën toch steeds weer resistentie ontstaat. De langetermijn-bijwerkingen van de verschillende middelen worden langzaamaan duidelijk en deze zijn dan weer aanleiding tot nieuwe research.

Trefwoorden: hiv-behandeling, antiretrovirale therapie, NRTI's, NNRTI's

Inleiding

In juni 2006 was het 25 jaar geleden dat een uiting van het *acquired immune deficiency syndrome* (aids) voor het eerst werd beschreven. Vijf homoseksuele patiënten in Los Angeles, Californië presenteerden zich met een pneumonie veroorzaakt door *Pneumocystis carinii* (tegenwoordig aangeduid als *Pneumocystis jiroveci*).¹ Sinds die tijd is er veel onderzoek verricht naar de pathogenese van hiv en de mogelijke aangrijpingspunten voor therapie en is er veel duidelijk geworden. Gedurende de eerste 15 jaar was aids een aandoening met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Inmiddels is het een ziekte die met medicatie goed onder controle is te houden. De mogelijke bijwerkingen van de medicamenteuze behandeling op langere termijn zijn echter deels nog onbekend en tot nu toe onbegrepen (verhoogd cardiovasculair risico, lipodystrofie, osteopenie en maligniteiten). In schril contrast hiermee is de situatie in de ontwikkelingslanden waar aids nog steeds een belangrijke doodsoorzaak is. Er worden vijf miljoen nieuwe infecties met het humaanimmunodeficiëntievirus (hiv) per jaar geregistreerd, 50 procent treft vrouwen en meer dan 40 procent van nieuwe hiv-geïnfecteerden zijn jongeren tussen 15 en 24 jaar. De gevolgen van een falende preventie en onvoldoende infrastructuur van de

gezondheidszorg in veel ontwikkelingslanden vormen een belemmering om een adequate behandeling van grote patiëntenpopulaties mogelijk te maken.

Pathogenese hiv-infectie

Hiv infecteert specifiek de CD4⁺-T-cellen. Door een voortschrijdend inzicht in de virale replicatie van hiv zijn antiretrovirale middelen ontwikkeld die op verschillende punten van de cyclus aangrijpen. In 1986 kwamen de eerste werkzame middelen beschikbaar in een *research setting*. Dit waren alleen middelen uit de groep nucleoside reverse transcriptaseremmers (NRTI's) waarvan zidovudine (AZT) de eerste was. Hiermee werd slechts één stap in de cyclus afgeremd, het reverse transcriptase (*figuur 1*). Monotherapie en/of duotherapie van NRTI's resulteerde(n) in onvoldoende virale suppressie en daardoor tot selectie van voor NRTI's ongevoelige gemuteerde stammen. In 1995 werd het mogelijk antiretrovirale therapie te monitoren door het aantal hiv-virusdeeltjes in het bloed (virale *load*) te meten met behulp van hiv-PCR (*polymerase chain reaction*). In 1996 werden op grote schaal twee groepen nieuwe antiretrovirale middelen ingevoerd met een ander aangrijpingspunt: proteaseremmers (PI's) en non-nucleoside reverse transcriptaseremmers (NNRTI's). Bij combinatie van ten minste drie middelen uit twee groepen bleek volledige suppressie van hiv mogelijk. PI's remmen het protease-enzym dat nodig is bij de essemblage van nieuwe viruspartikels uit de CD4-cel (*figuur 1*). De eerste generatie middelen uit deze groep (indinavir, ritonavir en saquinavir) leidde voor het eerst tot het langere tijd ondetecteerbaar houden van de virale *load* (hiv-RNA). Dit resulteerde in normalisatie of in elk geval verbetering van het CD4⁺-T-

Bijsluiter

Dr. J.G. den Hollander, afdeling Interne geneeskunde, Medisch Centrum Rijnmond Zuid (MCRZ) Rotterdam, dr. M.E. van der Ende, internist, afdeling Inwendige Geneeskunde, sectie infectieziekten, Erasmus MC Rotterdam.
Correspondentieadres: Dr. J.G. den Hollander, internist-infectioloog, afdeling Interne geneeskunde, Medisch Centrum Rijnmond Zuid (MCRZ), locatie Clara, Olympiaweg 350, 3078 HT, Rotterdam, e-mail: HollanderJ@MCRZ.nl.

celaantal. Een belangrijk probleem bij de toen beschikbare regimes waren de gastro-intestinale bijwerkingen. De laatste vijf jaar zijn er verschillende proteaseremmers ontwikkeld, met minder ernstige bijwerkingen en een patiëntvriendelijker doseringsregime. De middelen uit de groep van NNRTI's (nevirapine en efavirenz) hebben een lage *pilcount* en een gunstig bijwerkingenprofiel.

De laatste jaren zijn er nieuwe antiretrovirale middelen ontwikkeld die hun aangrijpingspunt buiten de cel hebben. Het eerste middel was enfuvirtide (T20), dat de fusie tussen hiv en de CD4⁺-T-cel remt (figuur 1). Hiermee ontstond voor patiënten met resistentie tegen verschillende klassen antiretrovirale middelen een mogelijkheid voor behandeling. Nadelen van dit middel zijn de toedieningswijze via een subcutane injectie en de lokale bijwerkingen. Naast de fusieremmers werden ook remmers van voor hiv belangrijke receptoren ontwikkeld, zoals de CCR5- en de CXCR4-receptor. Van de eerste CCR5-remmer maraviroc (Celsentri) zijn de 48-weeksresultaten bekend; de registratieaanvraag volgt binnenkort. Blokkers van de CXCR4-receptor zijn nog te ver van klinische toepassing om daarover veel te kunnen zeggen. De laatste ontwikkeling in de markt is de aankomende registratie van raltegravir (Isentress). Dit middel remt het virale enzym integrase (figuur 1). De eerste resultaten in fase-I- en

fase-II-onderzoeken tonen een zeer sterk en snel antiretroviraal effect. Vergelijkende fase-III-onderzoeken lopen momenteel. Tevens komt er dit jaar een *early-access*-programma.

Bijwerkingen

Het succes van *Highly Active Anti Retroviral Therapy* (HAART), de drastische daling van de morbiditeit en mortaliteit, had een prijs. Naast de initiële bijwerkingen zoals maag- en darmbijwerkingen (vooral diarree en misselijkheid), huiduitslag (nevirapine), anemie (AZT), medicamenteuze hepatitis (nevirapine) en een overgevoeligheidsreactie (abacavir), herkende men geleidelijk aan steeds meer bijwerkingen op de lange termijn (tabel 1).

Zo bleken vooral een aantal NRTI's op langere termijn nadelige effecten te hebben op de mitochondriën van de menselijke cellen.² Hierdoor wordt het metabolisme van de menselijke cellen geremd. Mogelijk dat dit *in-vitro*-effect is geassocieerd met bijwerkingen *in vivo*. Aanvankelijk werd lipodystrofie toegeschreven aan het gebruik van PI's. Later ontstond de hypothese dat lipodystrofie een gevolg zou kunnen zijn van mitochondriale toxiciteit en dus een bijwerking van NRTI's. Met name de thymidineanalogen stavudine (d4T) en in mindere mate ook zidovudine (AZT) zijn geassocieerd met lipodystrofie. De werkelijke pathogenese van deze bijwerking is echter nog steeds onzeker.

Naast de effecten op de vetverdeling blijken hiv-remmers ook invloed te kunnen hebben op de vetstofwisseling (cholesterol- en triglyceridenveranderingen). Zoals in de CBO-richtlijn *Antiretrovirale behandeling* wordt aangegeven, kunnen proteaseremmers hyperlipoproteïnemie luxeren waardoor het nodig kan zijn de proteaseremmer te vervangen door een ander middel uit een andere klasse. Verder is ook bekend dat bij mensen met een pre-existent verminderde glucosetolerantie diabetes

mellitus kan worden geluxeerd door het gebruik van een proteaseremmer.

Uit het recent gepubliceerde DAD-onderzoek lijken hiv-patiënten een hogere kans te hebben op cardiovasculaire incidenten.³ Dit zal met behulp van cohortonderzoeken met *matching* op leeftijd, ras, geslacht en roken moeten worden aangetoond.

In de nieuwere registratieonderzoeken krijgt de ontwikkeling van osteopenie en osteoporose steeds meer aandacht. Er zijn onderzoeken opgezet met onder andere sequentiële botdichtheidsonderzoeken (DEXA-scans) om het ontstaan van osteoporose te onderzoeken tijdens de behandeling met HAART. Aanleiding hiervoor is de hoge prevalentie van osteoporose en osteopenie in cross-sectionele onderzoeken bij hiv-geïnfecteerde patiënten met en zonder behandeling.

Een andere belangrijke 'bijwerking' van hiv of van de therapie is de mogelijk hogere kans op de ontwikkeling van maligniteiten. Zo komt non-hodgkinlymfom vaker voor bij hiv-positieve patiënten, ook in het HAART-tijdperk. De waargenomen hoge prevalentie van afwijkende cervixcytologie en anuscarcinoom bij hiv-positieve patiënten is gerelateerd aan de hoge prevalentie van multipel oncogene types van het humaan papillomavirus dat ook met HAART niet verdwijnt. Zo wordt geadviseerd bij hiv-positieve vrouwen jaarlijks een cervixuitstrijk te maken. Een geschikte screening op anuscarcinoom is nog niet beschikbaar en bevindt zich momenteel nog in een klinische onderzoeksfase. Bij gelijke antiretrovirale effectiviteit is het voor de individuele patiënt van belang bij het voorschrijven rekening te houden met de verschillende bijwerkingen van de diverse middelen.

Therapietrouw

Het effect van de antiretrovirale therapie wordt bewerkstelligd door remming van de replicatie van hiv. Voor dit effect is het van belang dat de antihiv-medicatie zo nauwkeurig mogelijk wordt ingenomen. Een in 2000 gepubliceerd onderzoek toonde aan dat 95 tot 100 procent therapietrouw noodzakelijk is voor therapie succes. Therapietrouw is onder andere geassocieerd met ziekteinzicht, motivatie, doseringsregimen, dieetrestricties en bijwerkingen. Patiënten met psychiatrische problematiek, bijvoorbeeld met een verslaving, en allochtone patiënten hebben een verhoogd risico op falen.⁴ Voordat een hiv-geïnfecteerde patiënt start met antiretrovirale therapie wordt er uitgebreid informatie verstrekt. De verpleegkundig aidsconsulent speelt hierin een belangrijke rol. Gedurende de eerste maanden treden de initiële bijwerkingen en de meeste complicaties van immunoreconstitutie op. Vroegtijdige interventie voorkomt virologisch falen en het selecteren van resistente gemuteerde stammen.

Resistentie

De volledige populatie van hiv-viruspartikels (quasi-species) wordt zonder behandeling vooral overheerst door het zogenaamde wildtypevirus. Er is echter een grote turn-over van hiv-partikels aangezien de replicatiesnelheid circa 10¹⁰ replicaties per dag is. Dit gaat gepaard met 10⁵ - 10⁶ "vergissingen" tijdens replicatie. Zo ontstaan spontane mutaties waarvan vele gelukkig niet levensvatbaar zijn. De wel levensvatbare spontaan ontstane mutaties kunnen zo echter wel een virale resistentie voor bepaalde groepen hiv-remmers tot gevolg hebben. Het ontstaan van primaire virale mutaties tegen een antiretroviraal middel heeft vaak tot gevolg dat de virale fitness daalt, wat zich uit in een lagere replicatiesnelheid. In reactie hierop selecteert het virus de zogenaamde secundaire mutaties die de fitness weer verbeteren. Inadequate therapie en/of te lage spiegels van antiretrovirale middelen zijn de belangrijkste oorzaak voor de selectie van mutaties.

De kans op zogenaamde primaire resistentie bij een nieuwgeïnfecteerde individu blijkt onder homoseksuele mannen tien procent te zijn.⁵ Bij deze groep patiënten wordt daarom geadviseerd in het eerste bloedmonster een resistentiebepaling te verrichten. Hiermee kan rekening worden gehouden als de patiënt met antiretrovirale medicatie moet beginnen.

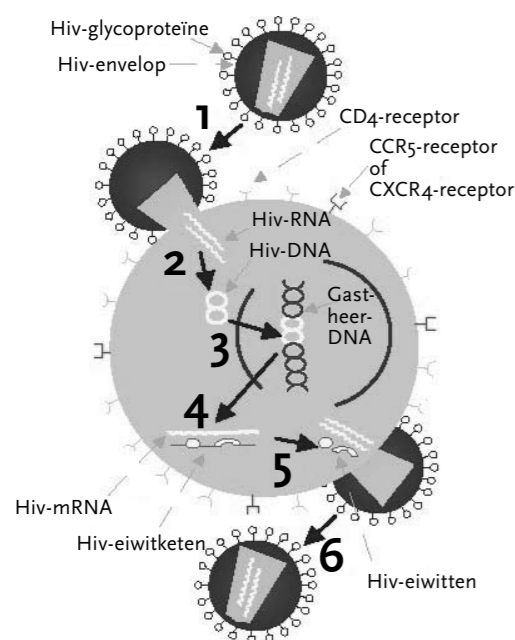
Conclusie

Er is in 25 jaar met betrekking tot hiv veel veranderd. Van een dodelijke ziekte lijkt hiv een meer chronische ziekte te worden met nog steeds veel bijkomende problemen, maar wel met een beter toekomstperspectief. De keuze van het antiretrovirale regime wordt steeds meer bepaald op basis van bijwerkingen en resistentiepatroon. Ontwikkeling van nieuwe medicatie zal belangrijk blijven voor de toekomst.

Summary

In June 2006, hiv/aids had its 25 years anniversary. In these years, it changed from a disease with a high mortality to a more chronic disease, at least in the developed world. This success came with the price of a higher morbidity of other medical problems like lipodystrophy, cholesterol metabolism interactions, higher cardiovascular risk, and a higher incidence of certain types of cancer. Notwithstanding the great success of the developed anti-retroviral treatment which is accomplished, basic research and the development of new therapy strategies is still needed. Development of resistance and growing knowledge about long term adverse effects of therapy are two main reasons for new research projects.

Figuur 1. Stappen in de hiv-replicatie: 1. binding en fusie van hiv aan de CD4-receptor (remming via enfuvirtide en CCR5-blokkers) 2. reverse transcriptase (omzetten van hiv-RNA in ds-DNA, remming via NRTI's en NNRTI's) 3. integratie van hiv-DNA in humaan DNA van de CD4-cel (remming via integraseremmers) 4. transcriptie van hiv-DNA (geen remmers bekend) 5. assemblage, door protease-enzymen gereguleerd proces (remming via proteaseremmers) 6. budding van nieuwe viruspartikels uit de CD4-cel (geen remming bekend).



Tabel 1. Bijwerkingen die worden waargenomen onder antiretrovirale therapie en verhoogde kansen op bepaalde ziekten door een hiv-infectie op zich.

KORTETERMIJNEFFECTEN	LANGETERMIJNEFFECTEN
Gastro-intestinale bijwerkingen	Medicamenteuze hepatitis
Huidrash	Lipoatrofie/-dystrofie
Anemie	Cholesterol-/vetstofwisselingsproblemen
Medicamenteuze hepatitis	Diabetogeen
Hypersensitiviteitssyndroom	Osteopenie/osteoporose
Cholesterol-/vetstofwisselingsproblemen	Verhoogd risico op cardiovasculaire incidenten
Diabetogeen	Hogere kans op lymfom, cervixcarcinoom en rectumcarcinoom

1. CDC. Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. MMWR 1981;30:250-2.
2. Valk M van der, Casula M, Weverlingz GJ, Kujik K van, Eck-Smit B van, Hulsebosch HJ, et al. Prevalence of lipotrophy and mitochondrial DNA of blood and subcutaneous fat in HIV-1-infected patients randomly allocated to zidovudine or stavudine based therapy. Antivir Ther 2004;9(3):385-93.
3. Friis-Moller N, Sabin CA, Weber R, d'Armino Monforte A, El-Sadr WM, Reiss P, et al. Data collection on adverse events of anti-HIV drugs (DAD) study group. Combination antiretroviral therapy and the risk of myocardial infarction. N Engl J Med 2003;349(21):1993-2003.
4. Low-Beer S, O'Shaughnessy MV, Hogg RS, Montaner JS. Adherence to triple therapy and viral load response. J Acquir Imm Def Syndr 2000;1:23(4):360-1.
5. Wensing AM, Vijver DA van de, Angrarano G, Asjo B, Boeri E, Camacho R, et al. SPREAD programme. Prevalence of drug-resistant HIV-1 variants in untreated individuals in Europe: implications for clinical management. J Infect Dis 2005;192(6):958-66.

Publish or Perish: een 'aaHaa-erlebnis' voor wetenschappers!

H.A. Verbrugh

Trefwoorden: H-index, citatiescore, prestatie-indicator, 'publish and perish'

In de uitgave van NTMM mei 2006 maakte redacteur dr. Jacques Meis ons attent op de mogelijkheid om via Google™ Wetenschap (<http://scholar.google.nl>) snel en eenvoudig na te gaan hoe het staat met de impact van de publicaties van een bepaalde wetenschapper. Door de initialen en achternaam van de wetenschapper in het zoekvenster van Google™ Wetenschap in te vullen en vervolgens op *Zoeken* te drukken, verschijnt een lijstje van de publicaties van die wetenschapper in de volgorde van hun citatiescore; het meest geciteerde artikel staat bovenaan, daarna het op één na meest geciteerde artikel, etc. Voor elk artikel staat het aantal citaties vermeld. Het gaat niet alleen om wetenschappelijke artikelen die in PubMed zijn te vinden, maar om alle publicaties die de zoekmachine Google™ via het internet kan vinden (bijvoorbeeld ook patenten). Analyse en vergelijking van dergelijke citatielijstjes van verschillende wetenschappers is daarmee in beginsel mogelijk. Dergelijke analyses van prestatie-indicatoren zijn in toenemende mate populair in de wetenschap en de gezondheidszorg, omdat ze bijdragen aan het afleggen van verantwoording van wetenschappers en zorgverleners aan de maatschappij. Ook de financiering van zorg en wetenschap zal, naar verwachting, steeds meer afhankelijk worden van de geleverde prestaties. Zo zijn er de afgelopen jaren enkele 'indexen' voorgesteld die de vergelijking van de prestaties van individuele wetenschappers standaardiseren en daardoor vergemakkelijken. De nu meest bekende is wel de zogenoemde Hirsch-index, of H-index, die door E.J. Hirsch in 2005 werd gepubliceerd. De H-index heeft als doel de cumulatieve impact van de wetenschappelijk artikelen van een persoon te meten, het aantal citaties van zijn/haar werk te tellen en dat aantal uit te drukken in de H-index. De H is gelijk aan het aantal publicaties van een wetenschapper die elk ten minste H-maal zijn geciteerd, terwijl alle overige artikelen van die wetenschapper minder vaak dan H-maal zijn geciteerd. Met andere woorden, men neme de bovengenoemde door Google™ Wetenschap geproduceerde lijst en loopt

die af tot men in die rij de publicatie vindt die hetzelfde rangnummer heeft als het aantal malen dat deze geciteerd is. Binnen het Nederlandse wetenschapsgebied medische microbiologie en infectieziekten blijkt de H-index te variëren tussen 0 (= wetenschapper wiens publicaties nooit zijn geciteerd) en ongeveer 50 (= wetenschapper met 50 publicaties die elk ten minste 50 maal zijn geciteerd). Er zijn in Nederland buiten dit wetenschapsgebied 'toppers' van wie de H-index nog een stuk hoger ligt.

Voor het berekenen van de H-index en enkele andere prestatie-indexen is tegenwoordig een programma beschikbaar onder de veelbelovende naam *Publish or Perish* (gratis te downloaden via www.harzing.com/resources.htm#). Om u de moeite te besparen c.q. een voorproefje te geven, is hieronder een overzicht (per juni 2007) afgedrukt van een groot aantal Nederlandse wetenschappers op het gebied van de medische microbiologie en infectieziekten, gerangschikt naar hun H-index. De lijst pretendeert niet volledig te zijn noch geheel accuraat. Bij namen die in Nederland veel voorkomen (De Groot of De Vries) is het lastig alleen de juiste publicaties te laten meetellen, maar met enig gepuzzel lukt dat toch goed.

Wat de lijst voorstelt laat ik graag aan de lezer zelf over, maar het is duidelijk dat de cijfers een kwantitatief beeld geven van de impact van onze Nederlandse wetenschappers op het gebied van de medische microbiologie en infectieziekten. Een van de beperkingen van de H-index is dat het een cumulatieve score is waardoor de leeftijd van de persoon onvermijdelijk een *confounding* effect heeft. Immers, hoe ouder men is hoe meer tijd c.q. kans men heeft gehad om iets te publiceren dat door anderen wordt geciteerd. Daarom is er een variant van de H-index, de zogenoemde Hc-index, die aan de artikelen progressief minder gewicht toekent naarmate ze ouder zijn (*tabel 1*).

Prof. dr. H.A. Verbrugh, hoogleraar Klinische microbiologie en antimicrobiële therapie, Erasmus MC, Rotterdam, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam, e-mail: h.a.verbrugh@erasmusmc.nl

Uiteraard mag men niet meer uit deze tabel halen dan dat het personen met elkaar vergelijkt op basis van de impact van publicaties (zoals gevonden door Google™ Wetenschap). Hoe goed men is als docent, opleider, medisch-specialist of manager valt er niet uit af te leiden. Wellicht komen in de toekomst ook daarvoor indexen beschikbaar. Veel plezier met het opzoeken van uw eigen naam en de daarop volgende 'aaaagH... aaHaa ... of ...Hoeraaaa...erlebnis'! Mocht uw naam er niet bij staan, haast u naar *Publish or Perish!*

Tabel 1. Overzicht van Nederlandse onderzoekers op het gebied van de medische microbiologie en infectieziekten, gerangschikt op basis van hun H- en Hc-indexen.

NAAM	H-INDEX ^a	HC-INDEX ^b
J. Goudsmit	52	31
A. Osterhaus	50	40
J. van Embden	49	28
T. van der Poll	46	29
J. Verhoef	43	22
R.A. Coutinho	41	26
J.M. Lange	40	25
H.A. Verbrugh	40	22
R. Fouchier	39	34
P. Reiss	38	29
W. Quint	38	23
J.W. van der Meer	38	20
W. Spaan	38	18
D. van Soolingen	36	26
A. van Belkum	35	23
P.W. Hermans	35	22
H. Niesters	34	23
S. Danner	34	22
C. Vandenbroucke-Grauls	34	21
J. Meis	34	21
A. Fluit	32	21
F. Mooi	32	17
H. Goossens	31	19
B. van der Zeijst	31	15
B.J. Kullberg	30	22
L. Schouls	30	20
C.A. Boucher	30	17
M. Tersmette	30	17
L. van Alphen	30	14
P.E. Verweij	29	20
M. Netea	28	25

E. Stobberingh	28	19
B. Appelmek	28	18
P. Speelman	28	18
J. Mouton	28	17
W. van Eden	28	15
C.A. Bruggeman	28	14
M.J. Bonten	27	21
J. van Strijp	27	16
W. Melchers	26	14
K. Brinkman	25	19
J. Schellekens	25	18
J. Galama	25	17
H. Endtz	25	15
I. Hoepelman	24	17
T. Kuijpers	24	17
J. Kluytmans	24	16
A. Voss	23	19
J. van Dissel	23	18
A. Deelder	23	14
J. Ossewaarde	22	14
J.M. Prins	21	16
E. Kuijper	21	14
W. Goessens	21	12
R. Sauerwein	20	15
L. Spanjaard	20	15
P. Kager	20	13
K. van Kessel	19	13
I. Bakker-Woudenberg	19	10
M.F. Peeters	18	14
M.R. Visser	18	12
A. Polderman	18	9
J. Wagenaar	17	14
P. Schneeberger	17	13
A. Verbon	17	12
P. van den Broek	17	12
A. Fleer	17	11
J. van der Noordaa	17	8
J. Degener	16	11
H. Zaaijer	16	10
A. Kroes	16	10
A. Horrevorts	16	8
M. Vos	15	13
K. Wolthers	15	11

I. Gyssens	15	11
T. van Gool	15	9
W. Ang	14	12
R. van Ketel	14	9
F. van Loon	14	8
J. Wagenvoort	14	8
R. Verkooijen	13	10
R. Diepersloot	13	7
P.J. de Vries	12	8
R. Willems	11	11
J. Roord	11	7
B. de Jongh	11	6
W. van Wamel	10	9
S. Geerlings	10	8
E. Boel	10	8
M. van Agtmael	10	7
T. Kortbeek	9	8
B. Rijnders	7	7
J. Nouwen	7	6
A. Vonk	7	6
G. Ruijs	7	5
P. Oostvogel	6	5
M. van der Feltz	4	3
M. van Westreenen	3	2
K. Schurink	2	2

Definities¹

***H-index:** The h-index was proposed by J.E. Hirsch in his paper 'An index to quantify an individual's scientific research output'.² It is defined as 'A scientist has index h if h of his/her N_p papers have at least h citations each, and the other ($N_p - h$) papers have no more than h citations each.' It aims to measure the cumulative impact of a researcher's output by looking at the amount of citation his/her work has received. Publish or Perish calculates and displays the h-index proper, its associated proportionality constant *a* (from $N_{c,tot} = ah^2$), and the rate parameter *m* (from $h \sim mn$, where *n* is the number of years since the first publication). The properties of the h-index have been analyzed in various papers; see for example 'An informetric model for the Hirsch-index'.³

^bHc-index: The Contemporary h-index (Hc-index) was proposed by Antonis Sidiropoulos, Dimitrios Katsaros and Yannis Manolopoulos.⁴ It adds an age-related weighting to each cited article, giving (by default; this depends on the parametrization) less weight to older articles. The weighting is parametrized; the Publish or Perish implementation uses *gamma* = 4 and *delta* = 1, like the authors did for their experiments. This means that for an article published during the current year, its citations account four times. For an article published four years ago, its citations account only one time. For an article published six years ago, its citations account 4/6 times, and so on.

Literatuur

1. www.harzing.com. Publish or Perish User's Manual – Topic last modified on 05/04/07 11:57).
2. Hirsch JE. An index to quantify an individual's scientific research output. arXiv:physics/0508025 v5 29 Sep 2005.
3. Egghe L, Rousseau R. An informetric model for the Hirsch-index. *Scientometrics* 2006;69(1):121-9.
4. Sidiropoulos A, Katsaros D, Manolopoulos Y. Generalized h-index for disclosing latent facts in citation networks, arXiv:cs.DL/0607066 v1 13 Jul 2006.

Kwantumvirologie

Verbetering van het klinische beleid bij virale infecties door middel van kwantitatieve virusmetingen

J.S. Kalpoe

Dit artikel is een uitgebreide samenvatting van het proefschrift *Quantum virology – Improved management of viral infections through quantitative measurements* van Jayant Kalpoe, waarop hij op 28 juni 2007 promoveerde te Leiden. Promotor was prof. dr. A.C.M. Kroes.

Trefwoorden: kwantumvirologie, stamceltransplantatie, orgaantransplantatie, herpesvirussen, adenovirussen.

Achtergrond

Virale infecties zijn een belangrijke oorzaak van morbiditeit en mortaliteit bij immuungecompromiteerde patiënten. In de laatste decennia is het aantal patiënten met afweerstoornissen sterk gegroeid. Hieraan hebben de voortschrijdende wereldwijde hiv-epidemie, intensievere en succesvolle chemotherapie voor oncologische aandoeningen en in het bijzonder de beschikbaarheid van zeer potente afweerterlagende middelen voor orgaantransplantatiepatiënten, een significante bijdrage geleverd.

Het succes van orgaan- en stamceltransplantaties is voornamelijk te danken aan het feit dat afstotingsreacties en infecties beter kunnen worden voorkomen en bestreden. Chronische virale infecties vormen bij deze patiënten echter nog steeds een ernstige bedreiging, vooral als gevolg van langdurige afweerterlagende therapie.^{1,2} Het risico op het reactiveren van chronische virale infecties neemt immers toe naarmate de duur en intensiteit van de afweerterlagende therapie. De belangrijkste risicofactoren voor virale reactivatie zijn naast de intensiteit van de immuunsuppressieve therapie, het optreden van rejectie of *graft versus host disease* (GVHD) en de behandeling hiervan, het gebruik van ongerelateerde of *mismatched* donoren, en manipulaties van het transplantaat zoals T-celdepletie bij allogene stamceltransplantaties.^{3,4}

Het zijn met name de herpesvirussen, zoals Cytomegalovirus (CMV), Epstein-Barrvirus (EBV), varicellazostervirus (VZV) en herpessimplexvirus (HSV), maar ook adenovirussen die, vooral in de eerste maanden na transplantatie, voor ernstige complicaties kunnen

zorgen (figuur 1). Na orgaan- en stamceltransplantaties kunnen vergelijkbare patronen van reacterende virale infecties worden herkend. Deze patronen zijn nauw gerelateerd aan de veranderende immunologische status van de patiënt (figuur 1).

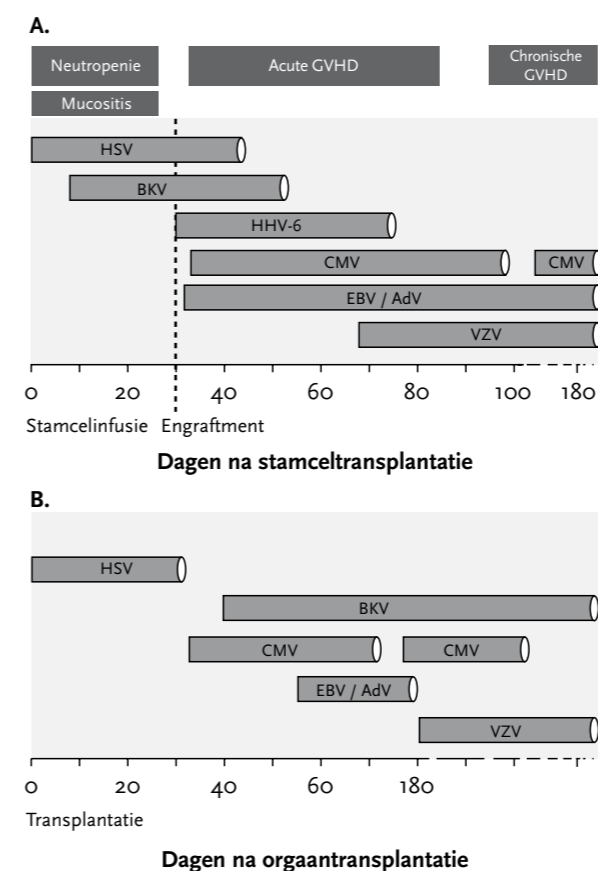
Over het algemeen kunnen er bij stamceltransplantaties drie fasen van reacterende virale infecties worden onderscheiden. In de eerste fase na transplantatie, de neutropene fase, worden vooral infecties met het herpessimplexvirus (HSV) gezien; behandeling met acyclovir is meestal effectief. In de tweede fase, de periode tussen *engraftment* en dag 100, is de piekfase voor reacterende virale infecties, en hieraan draagt vooral het cytomegalovirus (CMV) bij (figuur 1A). Vroege detectie van virale reactivatie en behandeling met antivirale medicatie of immunomodulatie is hier van belang om ernstige mortaliteit en morbiditeit te voorkomen. In de derde fase, de late transplantatiefase (meer dan 100 dagen na transplantatie), worden voornamelijk reactivaties gezien van VZV en tevens late reactivaties van CMV.⁴

Na orgaantransplantaties kunnen ook drie fasen worden onderscheiden: de eerste maand, één tot zes maanden en meer dan zes maanden na transplantatie.³ Over het algemeen treden de meest relevante virale reactivaties op in de tweede fase na transplantatie (figuur 1B) en sommige patiënten krijgen chronische of progressieve infecties met Epstein-Barrvirus (EBV), CMV of polyomavirus (BK-virus) in de derde fase (figuur 1B).

De diagnostiek van persisterende virale infecties, zoals herpesvirusinfecties, bij immuungecompromiteerde patiënten is, vooral vanwege de hoge prevalentie en de persisterende aard van deze virusinfecties, lastig. Daarom zijn doelmatige diagnostische testen noodzakelijk om

Dr. J.S. Kalpoe, Leids Universitair Medisch Centrum, afdeling Medische microbiologie, E4-68, Postbus 9600, 2300 RC Leiden, e-mail: J.S.Kalpoe@lumc.nl.

Figuur 1. Gebruikelijke volgorde van virale infecties na (A) allogene stamceltransplantatie en (B) orgaantransplantatie. De meest gebruikelijke perioden waarin de infecties ontstaan, zijn aangegeven. (AdV= adenovirus; Allo-SCT= allogene stamceltransplantatie; BKV= BK-virus; CMV= cytomegalovirus; EBV= Epstein-Barrvirus; GVHD= *graft-versus-host*-aandoening; HHV6= humaan herpesvirus-6; HSV= herpessimplexvirus; VZV= varicellazostervirus).



klinische relevante infecties met deze virussen snel en nauwkeurig in kaart te brengen. Traditionele diagnostische testen, veelal gebaseerd op celweeke en serologische technieken, zijn voor dit doel meestal beperkt te gebruiken, voornamelijk vanwege de lage sensitiviteit, de slechte reproduceerbaarheid en de tijdrovende aard van deze benaderingen. Bovendien is enkel het aantonen van deze persisterende virussen in immuungecompromiteerde patiënten niet per se een indicatie van klinisch relevante infectie of reactivatie.

Sterke verbeteringen in de diagnostiek, in het bijzonder door moderne moleculair-biologische technieken maken het mogelijk om deze persisterende infecties te volgen. Veel nauwkeuriger dan ooit is men nu in staat te volgen hoe de balans tussen afweer en virussen uit evenwicht raakt en virusinfecties tijdig te detecteren om daar iets aan te doen. In de praktijk ligt hier het belang van de kwantitatieve diagnostiek in de klinische virologie. Hierdoor kan immers naast het vaststellen dat er sprake is van een infectie, vooral worden bepaald hoe actief die is en welke

gevolgen die zou kunnen hebben. Aldus krijgt men door het kwantitatief benaderen van virusinfecties inzicht in zowel het klinische beloop, de besmettelijkheid en de resultaten van therapie. Bij deze kwantitatieve benadering gaat het meestal om het meten van virusdeeltjes in het plasma. Het zijn vooral recente technische ontwikkelingen geweest die het uitvoeren van deze metingen op het niveau van virale nucleïnezuuren (DNA of RNA) eenvoudig uitvoerbaar hebben gemaakt en de praktische toepasbaarheid daarvan sterk hebben bevorderd. Het voornaamste principe van deze technieken berust op de *polymerase chain reaction* (PCR). Hiermee is betrouwbare kwantificering haalbaar. Een belangrijke vooruitgang op het gebied van de PCR betreft de mogelijkheid om het gevormde product tijdens de reactie zelf en niet pas na afloop te detecteren. Deze benadering, ook wel *real-time* PCR of kinetische PCR genoemd, is relatief eenvoudig uitvoerbaar en biedt de mogelijkheid nauwkeurig te kwantificeren.⁵ De *real-time* PCR heeft een aantal belangrijke voordelen ten opzichte van de oudere kwantificeringstechnieken, zoals de hogere gevoeligheid en specificiteit, waardoor er minder kans bestaat op foutpositieve of foutnegatieve resultaten. Verder verkort deze benadering de duur van de totale bepaling in sterke mate en is het mogelijk om meerdere virussen tegelijk te detecteren en nauwkeurig te kwantificeren.^{6,7} De interpretatie van de metingen van verschillende virussen, in verschillende situaties en de relevantie ervan voor de klinische praktijk zullen echter nog duidelijk moeten worden.

Cytomegalovirus (CMV)

CMV is één van de meest beruchte veroorzakers van ernstige infecties na stamcel- of orgaantransplantaties. Infecties met CMV kunnen leiden tot long-, lever-, gastro-intestinale, renale of retinale aandoeningen.⁸⁻¹¹ Reactivatie van CMV is tevens geassocieerd met indirecte effecten zoals acute en chronische rejectie en bacteriële en fungale superinfecties.¹²

CMV-ziekte na transplantatie kan worden voorkomen door profylactische dan wel pre-emptieve therapie.¹³⁻¹⁵ Bij de profylactische strategie krijgen alle transplantatiepatiënten met een verhoogd risico op CMV-ziekte gedurende een langere periode, meestal 90 tot 100 dagen na transplantatie, ganciclovir of valganciclovir. Pre-emptieve therapie duidt op het beginnen van behandeling op het moment dat er significante virusvermeerdering wordt gesignaleerd, in dit geval aan de hand van virusconcentratie in het plasma, nog voordat er symptomen van een (lastig behandelbare) infectie aanwezig zijn. Pre-emptieve therapie is dus afhankelijk van snelle en sensitieve testen voor het bepalen van CMV-concentraties in het bloed. De CMV-pp65-antigenetest was voor dit doel een succesvolle en veelgebruikte methode en wordt wereldwijd nog steeds veel gebruikt.¹⁶⁻¹⁸ Kwantitatieve *real-time* PCR heeft ten opzichte van de pp65-test echter een aantal belangrijke voordelen

zoals de hogere sensitiviteit en betrouwbaarheid van deze veelal geautomatiseerde en gestandaardiseerde test, de toepasbaarheid bij neutropene patiënten, de stabiliteit van DNA in bloed- en plasmamonsters, hetgeen gunstig is met betrekking tot transport, opslag en verwerking van monsters en de mogelijkheid om grote hoeveelheden bloedmonsters in korte tijd te verwerken.^{16,19} Na een uitgebreide evaluatie werden op basis van een positieve correlatie tussen de twee technieken met behulp van ROC-analyses (*receiver operating curve*) criteria vastgelegd voor pre-emptieve CMV-therapie na orgaan- en stamceltransplantatie op basis van CMV-DNA-concentratie in plasma.²⁰ De kwantitatieve CMV-DNA PCR werd vervolgens gebruikt voor het initiëren en monitoren van pre-emptieve CMV-therapie bij orgaan- en stamceltransplantatiepatiënten.

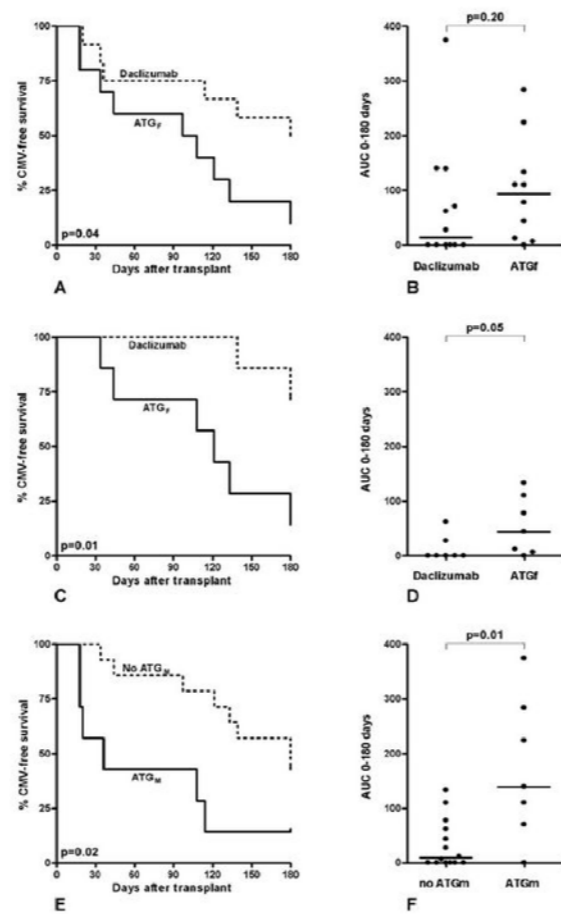
De eerstekeuzemiddelen voor pre-emptieve CMV-therapie zijn ganciclovir, intraveneus toegediend, en sinds recent ook het orale middel valganciclovir. Het monitoren van pre-emptieve CMV-therapie met deze middelen door middel van regelmatige CMV-DNA-concentratie metingen in plasma werd bij orgaan- en stamceltransplantatiepatiënten bestudeerd. Orale toediening van valganciclovir bleek even effectief in het reduceren van de CMV-DNA-concentratie in plasma als intraveneus ganciclovir. Met beide middelen werd een vergelijkbare reductie van CMV-DNA-concentratie in plasma gezien, met een mediaan van 0,1 \log_{10} /dag bij nier- en nier/pancreastransplantatiepatiënten en van 0,07 \log_{10} /dag bij stamceltransplantatiepatiënten.

Ondanks aanvankelijk effectieve therapie met intraveneus ganciclovir of oraal valganciclovir werden recidiverende CMV-reactivaties, vooral bij stamceltransplantatiepatiënten, regelmatig gezien. Het is daarom relevant om markers te beschrijven die relevant zijn voor recidiverende CMV-infecties bij deze patiënten. Nader onderzoek zou bijvoorbeeld kunnen aantonen of en hoe simultane monitoring van de virale kinetiek- en immunologische markers kunnen leiden tot de identificatie van stamceltransplantatiepatiënten met risico op recidiverende CMV-infecties. De incidentie van ganciclovirresistentie en de mate waarin dit fenomeen invloed heeft op recidiverende CMV-infecties is niet duidelijk en verdient nadere evaluatie.

Het onderwerp van profylactische versus pre-emptieve CMV-therapie is, zoals onder andere te merken in de literatuur, nog steeds een veel besproken controversie. Hoewel een oordeel over welke van deze twee strategieën beter is, niet eenduidig kan worden gegeven, laten onderzoeken zien dat de pre-emptieve aanpak effectief en technisch mogelijk is.^{21,22} Twee andere onderzoeken illustreren toepassingen van CMV-DNA-kwantificering in plasma anders dan in de diagnostiek en behandeling van CMV-activaties bij transplantatiepatiënten. Het risico op opportunistische infecties zoals CMV is sterk gerelateerd aan de mate van immuunsuppressie. De mate van immuunsuppressie is voor een

belangrijk deel afhankelijk van de soort en de duur van inductietherapie en conditioneringtherapie, respectievelijk bij orgaan- en stamceltransplantaties.^{1,2} Aan de hand van sequentiële metingen van CMV-DNA-concentraties in plasma kan de *area under the curve* (AUC) van CMV-DNA-concentraties over de tijd worden berekend.²³ De AUC is een benadering waarmee verschillende onafhankelijke risicofactoren voor CMV-ziekte, zoals de piek virale concentratie, de initiële virale concentratie en kinetische factoren, in een parameter zijn geïntegreerd.²³ Deze parameter, de AUC, kan daarom worden gebruikt als een marker voor het risico op opportunistische infecties na verschillende soorten conditionerings- of inductieregimes. Met deze methode werd aangetoond dat inductietherapie met daclizumab (anti-CD25) veiliger is dan inductietherapie met polyclonale antithymocyte globuline (ATG) voor wat betreft het risico op CMV-activatie na simultane nier/pancreastransplantatie (figuur 2). CMV bleek vaker en met

Figuur 2. CMV-viremie na simultane nier/pancreastransplantatie. De CMV-vrije overleving (Kaplan-Meier) en de totale virale load (AUC) gedurende 180 dagen na transplantatie worden weergegeven. **A en B:** verschillen tussen ATG_F (n=10) en daclizumab- (n=12) inductietherapie. **C en D:** verschillen tussen ATG_F- (n=7) en daclizumab- (n=7) inductietherapie bij patiënten die geen ATG_M-rejectietherapie kregen. **E en F:** verschillen tussen patiënten (n=7) met en patiënten zonder (n=14) ATG_M-rejectietherapie, ongeacht de inductietherapie.



een ernstiger beloop op te treden na inductie- of rejectietherapie met ATG.²⁴

De incidentie en de ernst van CMV-activaties na stamceltransplantatie bleek niet te verschillen na allogene T-celgedepleteerde stamceltransplantaties die werden voorafgegaan door hetzij een conditioneringsprotocol met gereduceerde intensiteit op basis van fludarabine, ATG en busulfan dan wel een conventionele myeloablatief conditioningschema.²⁵

Epstein-Barrvirus (EBV)

EBV-activatie na stamcel- of orgaantransplantatie kan leiden tot EBV-gerelateerde lymfoproliferatieve aandoeningen (EBV-PTLD), een gevreesde complicatie met ernstige morbiditeit en een hoge mortaliteit.²⁶ EBV-PTLD wordt voorafgegaan door een stijgende EBV-DNA-concentratie in plasma.^{27,28} Zo kunnen patiënten met een verhoogd risico op EBV-PTLD met behulp van EBV-DNA-concentratie monitoring vroegtijdig worden geïdentificeerd, waardoor pre-emptieve therapie kan worden ingesteld om EBV-PTLD te voorkomen.²⁹ Niet alle patiënten bij wie na transplantatie EBV-DNA in het bloed wordt gemeten, zullen een PTLD ontwikkelen; bij een deel wordt deze virusreactivatie spontaan onderdrukt door het (herstellende) immuunsysteem van de patiënt. Het is daarom voor de hand liggend dat pre-emptieve therapie op basis van enkel de EBV-DNA-concentratie in plasma onvermijdelijk zal leiden tot overbehandeling.

Een onderzoek bij pediatrische stamceltransplantatiepatiënten illustreert hoe patiënten met een risico op EBV-PTLD met een hoge mate van precisie kunnen worden opgespoord en behandeld. Dit werd bewerkstelligd door het simultaan monitoren van de EBV-DNA-concentratie in plasma en het (EBV-specifieke) cellulaire immuunherstel van de patiënt na transplantatie. Hierdoor kan een gebalanceerde en effectieve zorg voor patiënten met risico op EBV-PTLD worden gerealiseerd doordat alleen patiënten die dat echt nodig hebben, worden blootgesteld aan therapie.

De toepassing van EBV-DNA-concentratie metingen bij een andere categorie dan transplantatiepatiënten, namelijk patiënten met een EBV-geassocieerd nasofarynxcarcinoom (NPC) werd bestudeerd. EBV-NPC's komen vooral voor in Zuidoost-Azië.³⁰ Bij deze patiënten kan de EBV-DNA-concentratie in plasma worden gebruikt als een tumormarker voor diagnostische, therapeutische en prognostische doeleinden.³⁰ EBV-DNA-concentratie bepalingen in plasma kunnen ook in de Nederlandse situatie effectief worden toegepast als een tumormarker bij patiënten met EBV-geassocieerde nasofarynxcarcinomen.³¹

Varicellazostervirus (VZV)

VZV is een derde herpesvirus dat verantwoordelijk is voor infectieuze complicaties bij transplantatiepatiënten.³²⁻³³

Uit een onderzoek naar de klinische relevantie van VZV-DNA-concentratie metingen in plasma van stamceltransplantatiepatiënten kwam naar voren dat de klinische symptomen van een VZV-infectie geheel samenvallen met de detectie van viraal DNA in bloedplasma.³⁴ In tegenstelling tot CMV- en EBV-infecties was er geen fase van detecteerbaar VZV-DNA voorafgaand aan de klinische symptomen. Hierdoor wordt pre-emptieve therapie, op basis van VZV-DNA-detectie in plasma, zoals dat wordt toegepast bij CMV- en EBV-infecties, dus lastig. VZV-DNA-kwantificering in plasma bleek echter zeer geschikt om de diagnose bij klinische verdenking op VZV-gerelateerde ziekte te bevestigen en voor het monitoren van het effect van VZV-therapie met het antivirale middel aciclovir.

Adenovirus

In tegenstelling tot de herpesvirussen zijn ernstige infecties met adenovirussen (AdV) na stamceltransplantatie een recent fenomeen, dat vooral optreedt bij kinderen. Adenovirussen veroorzaken bij gezonde kinderen veelal slechts een luchtweginfectie, maar kunnen fataal zijn na een stamceltransplantatie.^{35,36} In een onderzoek naar het voorkomen van adenovirusinfecties bij volwassen stamceltransplantatiepatiënten werd met behulp van een kwantitatieve *real-time* PCR de AdV-DNA-concentratie in plasma op regelmatige tijdstippen na transplantatie gemeten.³⁷ In tegenstelling tot bij kinderen komen AdV-infecties na stamceltransplantatie bij volwassenen zelden voor. Daarom is het systematisch monitoren van AdV-DNA in plasma bij alle volwassen stamceltransplantatiepatiënten, gezien de lage incidentie van AdV-infecties, niet zo efficiënt als dat bij kinderen is. Het bleek echter dat fatale AdV-infecties, hoewel zeldzaam, wel degelijk bij de volwassen populatie van patiënten met een langdurig ernstig verminderd immuunsysteem kunnen optreden. Voor deze volwassen stamceltransplantatiepatiënten met een verhoogd risico op adenovirusinfecties kan vroegtijdige opsporing met behulp van AdV-DNA-detectie in plasma en pre-emptieve interventie wellicht uitkomst bieden.

Summary

Real-time monitoring of PCR has strongly supported the increased diagnostic use of nucleic acid detection assays in clinical virology. Particularly the improvements in the ability to quantify target nucleic acid sequences offer new opportunities in the management of viral infections. Real-time PCR is rapidly replacing traditional PCR, and new diagnostic uses will likely emerge. This thesis explores the wide range of potential applications of real-time quantitative PCR technology in clinical virology. This exploration is directed to the design of methods, the application to relevant patient categories, the comparison with established methods where available, and the definition of the clinical relevance of the approach. The focus comprises viral

targets where an elaborate balance between viral replication and the host immune system has been established, which brings about viral maintenance without affecting the host, until this balance is disturbed.

Literatuur

- Copelan EA. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 2006;354(17):1813-26.
- Hariharan S, McBride MA, Cohen EP. Evolution of endpoints for renal transplant outcome. *Am J Transplant* 2003;3(8):933-41.
- Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998;338(24):1741-51.
- Marty FM, Rubin RH. The prevention of infection post-transplant: the role of prophylaxis, preemptive and empiric therapy. *Transpl Int* 2006;19(1):2-11.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-94.
- Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30(6):1292-305.
- Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods* 2001;25(4):419-29.
- Boeckh M, Bowden R. Cytomegalovirus infection in marrow transplantation. *Cancer Treat Res* 1995;76:97-136.
- Boeckh M. Management of cytomegalovirus infections in blood and marrow transplant recipients. *Adv Exp Med Biol* 1999;458:89-109.
- Razonable RR, Rivero A, Rodriguez A, Wilson J, Daniels J, Jenkins G, et al. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 2001;184(11):1461-4.
- Razonable RR, Paya CV. Herpesvirus infections in transplant recipients: current challenges in the clinical management of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections. *Herpes* 2003;10(3):60-5.
- Rubin RH. The indirect effects of cytomegalovirus infection on the outcome of organ transplantation. *JAMA* 1989;261(24):3607-9.
- Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* 1993;118(3):173-8.
- Ljungman P. Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient. *J Infect Dis* 2002;186 Suppl 1:S99-S109.
- Crumpacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med* 1996;335(10):721-9.
- Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):533-54.
- Kusne S, Grossi P, Irish W, St George K, Rinaldo C, Rakela J, et al. Cytomegalovirus PP65 antigenemia monitoring as a guide for preemptive therapy: a cost effective strategy for prevention of cytomegalovirus disease in adult liver transplant recipients. *Transplantation* 1999;68(8):1125-31.
- Mazzulli T, Rubin RH, Ferraro MJ, D'Aquila RT, Doveikis SA, Smith BR, et al. Cytomegalovirus antigenemia: clinical correlations in transplant recipients and in persons with AIDS. *J Clin Microbiol* 1993;31(10):2824-7.
- Niesters HG. Molecular and diagnostic clinical virology in real time. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(1):5-11.
- Kalpoe JS, Kroes AC, Jong MD de, Schinkel J, Brouwer CS de, Beersma MF, et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol* 2004;42(4):1498-504.
- Kalpoe JS, Schippers EF, Eling Y, Sijpkens YW, Fijter JW de, Kroes AC. Similar reduction of cytomegalovirus DNA load by oral valganciclovir and intravenous ganciclovir on pre-emptive therapy after renal and renal-pancreas transplantation. *Antivir Ther* 2005;10(1):119-23.
- Heiden PL van der, Kalpoe JS, Barge RM, Willemze R, Kroes AC, Schippers EF. Oral valganciclovir as pre-emptive therapy has similar efficacy on cytomegalovirus DNA load reduction as intravenous ganciclovir in allogeneic stem cell transplantation recipients. *Bone Marrow Transplant* 2006;37(7):693-8.
- Emery VC, Sabin CA, Cope AV, Gor D, Hassan-Walker AF, Griffiths PD. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000;355(9220):2032-6.
- Huurman VA, Kalpoe JS, Linde P van de, Vaessen N, Ringers J, Kroes AC, et al. Choice of antibody immunotherapy influences cytomegalovirus viremia in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Diabetes Care* 2006;29(4):842-7.
- Kalpoe JS, Heiden PL van der, Vaessen N, Claas EC, Barge RM, Kroes AC. Comparable incidence and severity of cytomegalovirus infections following T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation preceded by reduced intensity or myeloablative conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2007;40(2):137-43.
- Gottschalk S, Rooney CM, Heslop HE. Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* 2005;56:29-44.
- Esser JW van, Holt B van der, Meijer E, Niesters HG, Trenchel R, Thijsen SF, et al. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood* 2001;98(4):972-8.
- Lankester AC, Tol MJ van, Vossen JM, Kroes AC, Claas E. Epstein-Barr virus (EBV)-DNA quantification in pediatric allogeneic stem cell recipients: prediction of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Blood* 2002;99(7):2630-1.
- Esser JW van, Niesters HG, Holt B van der, Meijer E, Osterhaus AD, Gratama JW, et al. Prevention of Epstein-Barr virus-lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002;99(12):4364-9.
- Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005;365(9476):2041-54.
- Kalpoe JS, Dekker PB, Krieken JH van, Jong RJ de, Kroes AC. Role of Epstein-Barr virus DNA measurement in plasma in the clinical management of nasopharyngeal carcinoma in a low risk area. *J Clin Pathol* 2006;59(5):537-41.
- Gnann JW Jr. Varicella-zoster virus: atypical presentations and unusual complications. *J Infect Dis* 2002;186 Suppl 1:S91-8.
- Koc Y, Miller KB, Schenkein DP, Griffith J, Akhtar M, Desjardin J, et al. Varicella zoster virus infections following allogeneic bone marrow transplantation: frequency, risk factors, and clinical outcome. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000;6(1):44-9.
- Kalpoe JS, Kroes AC, Verkerk S, Claas EC, Barge RM, Beersma MF. Clinical relevance of quantitative varicella-zoster virus (VZV) DNA detection in plasma after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006;38(1):41-6.
- Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 2003;3(2):79-86.
- Tol MJ van, Claas EC, Heemskerk B, Veltrop-Duits LA, Brouwer CS de, Vreeswijk T van, et al. Adenovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation: diagnosis, treatment and immunity. *Bone Marrow Transplant* 2005;35 Suppl 1:S73-6.
- Kalpoe JS, Heiden PL van der, Barge RM, Houtzager S, Lankester AC, Tol MJ van, et al. Assessment of disseminated adenovirus infections using quantitative plasma PCR in adult allogeneic stem cell transplant recipients receiving reduced intensity or myeloablative conditioning. *Eur J Haematol* 2007;78(4):314-21.

Mycoplasma pneumoniae en antigenen variatie

C. Vink, A.M.C. van Rossum, N.G. Hartwig

Samenvatting

Mycoplasma pneumoniae is een bacterie die ernstige infecties van de luchtwegen kan veroorzaken. Eén van de eerste stappen tijdens infecties met *M. pneumoniae* is aanhechting van de bacteriën aan cellen in de luchtwegen. Voor deze aanhechting is een eiwit op het oppervlak van *M. pneumoniae* van essentieel belang. Dit eiwit, P1 genoemd, is tevens doelwit voor antilichamen die tijdens de infectie worden aangemaakt. Deze antilichamen spelen een cruciale rol bij herkenning en vervolgens eliminatie van de bacteriën door het menselijke immuunsysteem. Het lijkt er echter op dat *M. pneumoniae* een strategie bezit om aan deze herkenning door antilichamen te ontsnappen. Het gen dat codeert voor het P1-eiwit bestaat onder meer uit twee stukken DNA waarvan een groot aantal sequentievarianten is te vinden op andere plekken binnen het bacteriële genoom. Er is verondersteld dat deze varianten kunnen recombineren met het overeenkomstige stuk binnen het P1-gen en daarmee een bron van variatie vormen voor dit gen. Hierdoor zou de bacterie dus verschillende versies van het P1-gen kunnen produceren die coderen voor P1-eiwitten met een iets gewijzigde aminozuursamenstelling. In dit artikel zal de achtergrond van deze veronderstelde antigenen variatie, en de consequenties daarvan, worden beschreven.

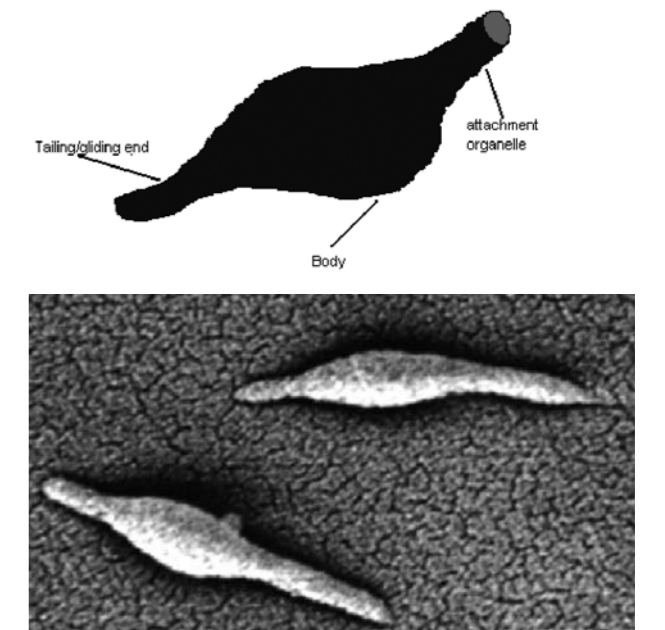
Trefwoorden: *Mycoplasma pneumoniae*, antigenen variatie, cytheadherentie, bacteriële aanhechting

Inleiding

Mycoplasma pneumoniae is een humaan pathogeen dat verschillende typen luchtweginfecties kan veroorzaken, zoals tracheobronchitis, faryngitis en atypische pneumonie. *M. pneumoniae* veroorzaakt tot 40 procent van de pneumonien in de open populatie en tot 18 procent van de gevallen van pneumonie bij kinderen die leiden tot hospitalisatie (zie Waites en Talkington (2004) voor een review).¹ In eerste instantie werd aangenomen dat *M. pneumoniae*-geïnduceerde pneumonie vooral voorkwam bij kinderen van vijf tot 15 jaar oud. Latere onderzoeken hebben echter laten zien dat *M. pneumoniae* zowel endemisch als epidemisch kan voorkomen bij ouderen en bij kinderen jonger dan vijf jaar.

M. pneumoniae behoort tot de klasse van de *Mollicutes*. De naam van deze klasse bacteriën, die in het Nederlands kan worden vertaald als 'zachthuidigen', refereert aan het gegeven dat deze bacteriën geen celwand hebben (figuur 1). Andere opvallende eigenschappen van de klasse *Mollicutes* zijn dat 1) hun genoom klein is en bestaat uit een enkel circulair chromosoom met een grootte van 0,58 tot 2,2 megabaseparen (Mbp), en 2) het genoom een laag

Figuur 1. Schematische weergave (boven) en elektronenmicroscopische opname (onder) van *M. pneumoniae*-cellen. Het attachment organelle, gelokaliseerd op de 'kop' van de bacterie speelt een essentiële rol bij aanhechting aan het luchtwegepitheel.



Dr. C. Vink, Laboratorium Kindergeneeskunde, Erasmus MC, Rotterdam, dr. A.M.C. van Rossum, dr. N.G. Hartwig, afdeling Kindergeneeskunde, subafdeling Infectieziekten en Immunologie, Erasmus MC-Sophia, Rotterdam.
Correspondentieadres: Dr. C. Vink, Erasmus MC, Laboratorium Kindergeneeskunde, kamer Ee-1502a, Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam, e-mail: c.vink@erasmusmc.nl.

G+C-gehalte heeft (23 tot 40 mol%). Binnen de *Mollicutes* behoren de mycoplasma's tot de kleinste organismen, zowel qua grootte als inhoud van het genoom, die in staat zijn tot zelfstandige vermenigvuldiging.² Het genoom van *M. pneumoniae* (stam M129) heeft een lengte van slechts 816,394 bp, en bevat 688 *open reading frames* (ORFs).^{3,4} Daarmee is het genoom van deze bacterie minstens vijf keer zo klein als dat van *Escherichia coli*. Zoals mag worden verwacht op basis van zijn relatief kleine genoom, bezit *M. pneumoniae* beperkte metabole en biosynthetische capaciteiten ten opzichte van de 'klassieke' bacteriën.⁵ Deze beperkingen vragen om een parasitaire levenswijze en een nauwe associatie van de bacterie met het luchtweg-epitheel van zijn humane gastheer. *M. pneumoniae* lijkt zich voornamelijk extracellulair op mucosale oppervlakken op te houden; het is vooralsnog niet bekend of deze bacterie ook in staat is intracellulair te repliceren. Een andere unieke eigenschap van de mycoplasma's is het gebruik van het 'universele' stopcodon voor eiwittranslatie, 5'-UGA-3', als codon voor tryptofaan.⁶ Deze eigenschap heeft grote consequenties indien genen van de mycoplasma's ten behoeve van eiwitexpressieonderzoek in andere soorten, zoals *E. coli*, worden geïntroduceerd. De traditionele laboratoriumdiagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties was in het pre-PCR-tijdperk erg moeilijk en tijdrovend. Voor de kweek van deze bacterie, zowel in vloeibare cultuur als op vaste media, is een rijk en complex groeimedium nodig. Daarnaast wordt de detectie van de bacterie bemoeilijkt door het gegeven dat de groei in vloeibare cultuur niet of nauwelijks leidt tot troebeling van het medium. Dit probleem wordt meestal ondervangen door de toevoeging van de pH-indicator fenolrood die de groei van *M. pneumoniae* en de daarmee gepaard gaande verzuring van het medium, kan verraden via een kleuromslag van oranje/rood naar geel (figuur 2A). Ook de kweek op vaste media is niet eenvoudig, aangezien *M. pneumoniae*-kolonies op agarplaten niet met het blote oog zichtbaar zijn. Het gebruik van een stereomicroscop is noodzakelijk om de karakteristieke *fried egg*-kolonies zichtbaar te maken (figuur 2B-D).

Op dit moment wordt in klinische laboratoria met name de serologische diagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties uitgevoerd. Nadelen van de serologie zijn echter dat 1) een toename in IgG soms pas laat tijdens infectie optreedt, 2) IgG-antilichamen lang kunnen blijven circuleren bij individuen die eerder een *M. pneumoniae*-infectie hebben doorgemaakt, en 3) de afwezigheid van een IgM-respons bij volwassenen.¹ Gezien het speciale en lastige karakter van de *Mycoplasma*-kweek en de nadelen van de serologie lijkt het evident dat de (*real-time*) PCR-techniek de eerste keuze gaat worden voor de diagnostiek van *M. pneumoniae*-infecties.

Cytadherentie

Een essentiële stap bij de initiatie van een infectie door *M. pneumoniae* is aanhechting van de bacteriën aan het respiratoire epitheel. Deze aanhechting wordt cytodherentie genoemd. Dit proces is essentieel in de pathogenese van infectie, aangezien *M. pneumoniae*-mutanten die niet in staat zijn tot aanhechting, avirulent zijn. Cytadherentie wordt gemedieerd door een gespecialiseerd en complex aanhechtingsorganel. Dit organel is gelokaliseerd op de 'kop' van de bacterie en is opgebouwd uit een netwerk van adhesines en ermee geassocieerde eiwitten (figuur 1). Het belangrijkste adhesine (cytadhesine) binnen het aanhechtingsorganel is het P1-eiwit. Dit 170-kDa-eiwit is een transmembraan oppervlakte-eiwit dat in hoge concentraties in het aanhechtingsorganel aanwezig is. Het P1-eiwit is essentieel voor aanhechting aan het luchtweg-epitheel en derhalve voor virulentie.⁷ P1 alleen is echter niet voldoende voor cytodherentie, omdat verschillende *accessory proteins* ook een noodzakelijke functie bekleden in dit proces (voor een review over dit onderwerp, zie Rottem [2003]).⁸ De gastheerreceptor(en) voor P1 op het luchtweg-epitheel is/zijn overigens nog niet geïdentificeerd.

Antigene variatie

Behalve de functie van het P1-cytadhesine in aanhechting van *M. pneumoniae* speelt dit eiwit ook een belangrijke rol in de anti-bacteriële afweer door de gastheer. Tegen het

P1-eiwit wordt namelijk een sterke humorale immun-respons opgewekt tijdens infectie.⁹ In relatie tot deze immuudominantie van P1 is de hypothese opgeworpen dat dit eiwit antigene variatie kan ondergaan. Deze hypothese is gebaseerd op het gegeven dat er twee DNA-sequenties binnen het P1-gen (of MPN141-gen) zijn gelegen, waarvan meerdere sequentievarianten voorkomen op verschillende andere locaties binnen het bacteriële genoom.^{10,11} Deze twee DNA-sequenties (*repetitive elements*) worden aangeduid als respectievelijk RepMP4 en RepMP2/3.¹² Binnen het P1-gen is het RepMP4-element gelegen aan het 5' uiteinde van het gen en het RepMP2/3-element aan het 3' uiteinde (figuur 3). Binnen het genoom van prototype *M. pneumoniae*-stam M129 zijn in totaal acht varianten van RepMP4 aanwezig en 10 varianten van RepMP2/3.⁴ De verschillende varianten van de RepMP-elementen zijn weliswaar sterk aan elkaar gerelateerd maar niet identiek. Het is derhalve mogelijk dat recombinatie tussen de RepMP-elementen in het P1-gen met de RepMP-varianten op andere plekken in het genoom van *M. pneumoniae* resulteert in een veranderde DNA-sequentie van het P1-gen. Dit veranderde P1-gen codeert op zijn beurt voor een P1-eiwit met een veranderde aminozuursamenstelling, hetgeen daarmee wellicht niet meer door circulerende anti-P1-antilichamen kan worden herkend. Dit veronderstelde mechanisme van antigene variatie van het P1-oppervlakte-eiwit zou een manier kunnen zijn waarmee *M. pneumoniae* aan het humorale immuunsysteem kan ontsnappen.¹³

Recombinatie van repetitive elements

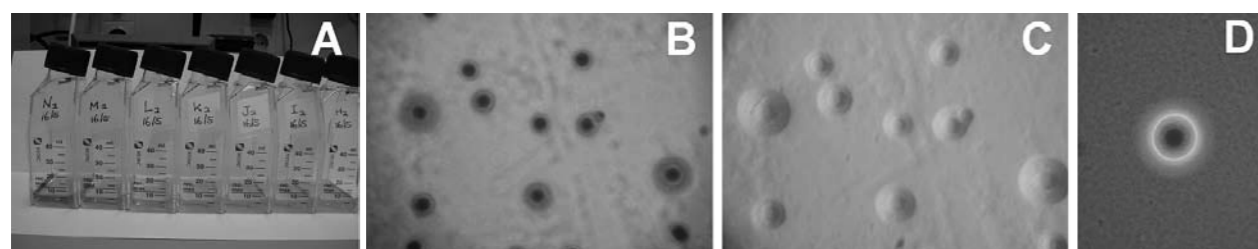
Ondanks het enorme potentieel dat het *M. pneumoniae*-P1-eiwit via recombinatie van RepMP-elementen heeft voor antigene variatie is het opvallend dat in eerdere epidemiologische onderzoeken slechts twee hoofdtypen van het P1-gen (type 1 en type 2) konden worden onderscheiden tussen klinische isolaten.¹⁴⁻¹⁷ Het is wel zo dat in deze onderzoeken relatief grove typeringstechnieken zijn gebruikt, die met name gebruikmaakten van restrictie fragmentanalyse en niet van DNA-sequentieanalyse. In andere onderzoeken waarin de gehele DNA-sequentie van het P1-gen is bepaald, werd een grotere mate van variatie in de DNA-sequentie van het P1-gen gevonden,

aldusdanig dat stammen binnen de twee hoofdtypen ook in subtypen konden worden onderverdeeld.^{13,18} Ook werden door Dorigo-Zetsma en collega's hybridetype-1 en type-2 P1-genen beschreven. Daarnaast konden zij in bepaalde *M. pneumoniae*-stammen de aanwezigheid aantonen binnen het P1-gen van RepMP-versies die identiek zijn aan RepMP-versies die in prototype stam M129 werden gevonden op plekken in het genoom buiten het P1-gen.¹⁹ De DNA-sequenties van alle andere versies van RepMP binnen het genoom van deze klinische isolaten werden helaas niet bepaald in dit onderzoek. Desalniettemin suggereren deze resultaten dat de RepMP-elementen inderdaad met elkaar kunnen recombineren binnen het genoom van *M. pneumoniae*. Een soortgelijke suggestie volgde ook uit het werk van Kenri *et al.*, die stammen hebben geïdentificeerd die een P1-gen dragen waarin zich een RepMP2/3-element bevindt dat sterke overeenkomsten vertoont met een RepMP2/3-element dat elders in het genoom van stam M129 is gelokaliseerd.¹³ De mogelijkheid dat in deze stammen het RepMP2/3-element in het P1-gen reciproof was uitgewisseld met de 'niet P1'-RepMP2/3-versie kon worden uitgesloten, aangezien deze stammen de normale, niet-P1-versie van RepMP2/3 ook bleken te bezitten op dezelfde positie in het genoom als in stam M129.¹³ Hoewel het dus waarschijnlijk is dat RepMP-elementen kunnen recombineren binnen het genoom van *M. pneumoniae* is op dit moment nog niets bekend over het onderliggende moleculaire mechanisme en de dynamiek van dit proces. Het is ook onbekend welke enzymen een rol kunnen spelen bij de mogelijke recombinatie van RepMP-elementen. Mogelijke kandidaten hiervoor zijn RecA, *single-stranded binding protein* (SSB), RuvA en RuvB.⁴ In het onderzoek dat wij recent zijn opgestart hopen wij de vragen te kunnen beantwoorden die er zijn rondom antigene variatie van *M. pneumoniae* en de mogelijke rol van recombinatie van *repetitive elements* in dit proces.

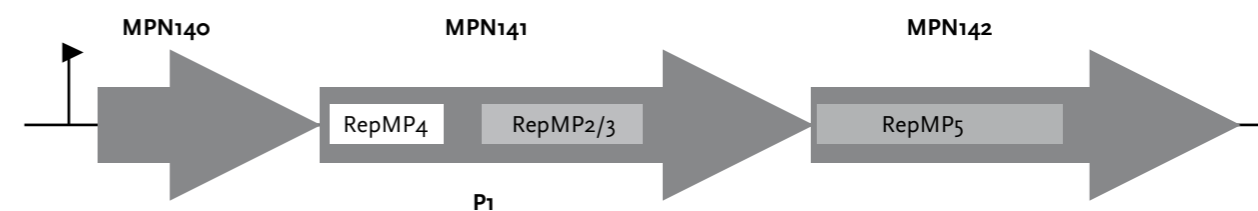
Summary

Mycoplasma pneumoniae is a human pathogen that causes up to 40 per cent of community-acquired pneumonias and as many as 18 per cent of cases requiring hospitalization in children. A crucial step in the initiation of infection by this

Figuur 2. Groei van *M. pneumoniae* in vloeibaar medium (A) en op agarplaten (B, C en D). (A) Verdunningsserie van vloeibare culturen van *M. pneumoniae* met afnemende bacterieconcentraties van links naar rechts; de groei van *M. pneumoniae* leidt tot een pH-verlaging van het medium die wordt geïndiceerd door een kleurverandering van fenolrood van oranje/rood naar geel. (B, C) Kolonies van *M. pneumoniae* op agarplaten, gefotografeerd onder verschillende belichtingen (vergroting, x100). (D) Een kolonie van *M. pneumoniae*, gekleurd met nitro tetrazolium (vergroting, x100).



Figuur 3. De organisatie van het *M. pneumoniae*-P1-operon, bestaande uit de genen MPN140, MPN141 (dat codeert voor het P1-cytadhesine) en MPN142.²⁰ De twee laatste genen bevatten sequenties (RepMP4, RepMP2/3 en RepMP5) waarvan meerdere varianten op andere plekken binnen het genoom van *M. pneumoniae* aanwezig zijn.¹³ Het MPN142-gen codeert voor een eiwit dat, net als het P1-eiwit, ook een rol speelt in cytodherentie.



bacterium is its attachment to the respiratory epithelium of the host (cytadherence). Cytadherence is mediated by a specialized attachment organelle, which is localized at the tip of the bacterium and consists of a network of adhesins and accessory proteins. The major adhesion protein within the attachment organelle is the surface-exposed, 170-kDa P1 protein. This protein, which is encoded by the MPN141 gene, was demonstrated to be essential for cytadherence. Interestingly, the MPN141 gene contains two sequence stretches, designated RepMP2/3 and RepMP4, respectively, of which multiple copies exist at other sites within the bacterial genome. Because these copies are closely related in sequence, but not identical, it has been hypothesized that they are able to recombine with their counterparts within the MPN141 gene. Thus, these copies may serve as a source for sequence variation of MPN141 and, consequently, as a source for antigenic variation of the P1 protein at the bacterial surface. This proposed mechanism for antigenic variation may provide a means for *M. pneumoniae* to escape from host immune surveillance. In this paper, the background of antigenic variation and its putative function will be discussed.

Literatuur

1. Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004;17:697-728, table of contents.
2. Wilson MH, Collier AM. Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. J Bacteriol 1976;125:332-9.
3. Dandekar T, Huynen M, Regula, JT, Ueberle B, Zimmermann CU, Andrade MA, et al. Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. Nucleic Acids Res 2000;28:3278-88.
4. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res 1996;24:4420-49.
5. Dandekar T, Sauerborn R. Comparative genome analysis and pathway reconstruction. Pharmacogenomics 2002;3:245-56.

6. Inamine JM, Ho KC, Loechel S, Hu PC. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, and *Mycoplasma gallisepticum*. J Bacteriol 1990;172:504-6.
7. Baseman JB. The cytadhesins of *Mycoplasma pneumoniae* and *M. genitalium*. Subcell Biochem 1993;20:243-59.
8. Rottem S. Interaction of mycoplasmas with host cells. Physiol Rev 2003;83:417-32.
9. Leith DK, Trevino LB, Tully JG, Senterfit LB, Baseman JB. Host discrimination of *Mycoplasma pneumoniae* proteinaceous immunogens. J Exp Med 1983;157:502-14.
10. Su CJ, Chavoya A, Baseman JB. Regions of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadhesin P1 structural gene exist as multiple copies. Infect Immun 1988;56:3157-61.
11. Wenzel R, Herrmann R. Repetitive DNA sequences in *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res 1988;16:8337-50.
12. Ruland K, Wenzel R, Herrmann R. Analysis of three different repeated DNA elements present in the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*: size, number and distribution on the genome. Nucleic Acids Res 1990;18:6311-7.
13. Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y, Okazaki N, Narita M, Izumikawa K, Umetsu M, Sasaki T. Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. Infect Immun 1999;67:4557-62.
14. Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B, Frey G, Skov Jensen J, Renaudin H, et al. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiol Infect 2000;124:103-11.
15. Sasaki T, Kenri T, Okazaki N, Iseki M, Yamashita R, Shintani M, Sasaki Y, Yayoshi M. Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. J Clin Microbiol 1996;34:447-9.
16. Su CJ, Dallo SF, Baseman JB. Molecular distinctions among clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol 1990;28:1538-40.
17. Ursi D, Ieven M, van Bever H, Quint W, Niesters HG, Goossens H. Typing of *Mycoplasma pneumoniae* by PCR-mediated DNA fingerprinting. J Clin Microbiol 1994;32:2873-5.
18. Dorigo-Zetsma JW, Dankert J, Zaat SA. Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. J Clin Microbiol 2000;38:965-70.
19. Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J, Zaat SA. *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. Infect Immun 2001;69:5612-8.
20. Inamine JM, Loechel S, Hu PC. Analysis of the nucleotide sequence of the P1 operon of *Mycoplasma pneumoniae*. Gene 1988;73:175-83.

Moleculaire epidemiologie van *Enterococcus faecium*: van commensaal naar ziekenhuis aangepast pathogeen

J. Top

Dit is een samenvatting van het proefschrift *Molecular epidemiology of Enterococcus faecium: from commensal to hospital adapted pathogen*, van Janetta Top. Zij promoveerde op 10 mei 2007 te Utrecht. Promotor was prof. dr. M.J.M. Bonten.

Samenvatting

Enterococcus faecium werd jarenlang als een relatief onschuldige, commensale darmbacterie beschouwd die zo nu en dan infecties kon veroorzaken bij ernstig zieke patiënten. De afgelopen 20 jaar zijn uitbraken in ziekenhuizen en infecties met vancomycineresistente *E. faecium* (VREF), vooral bij immuungecompromitteerde patiënten, wereldwijd toegenomen. Deze toename van VREF is in het begin van de jaren '80 van de vorige eeuw voorafgegaan door een toename van ampicillineresistente *E. faecium* (AREfm) in de Verenigde Staten. In het proefschrift zijn moleculair-epidemiologische onderzoeken beschreven die zijn gebaseerd op *multilocus sequence typing* (MLST) van zowel humane als dierlijke *E. faecium*-isolaten. De onderzoeken toonden gastheerspecificiteit en een specifieke genetische subpopulatie, *clonal complex-17* (CC17). In deze subpopulatie clusterden klinische en ziekenhuisuitbraakisolaten die afkomstig waren uit verschillende landen en continenten. Deze CC17-isolaten worden verder gekarakteriseerd door ampicilline- en chinoloneresistentie. Bovendien is de aanwezigheid van het variant *esp*-gen sterk geassocieerd met deze CC17-isolaten.

In *Enterococcus faecalis* is *esp* gevonden op een zogenaamd pathogeniciteitseiland (PAI) en wordt het gen beschouwd als een potentiële virulentiefactor. Door het bepalen van de DNA-sequentie van de regio rondom het *E. faecium esp*-gen bleek dat, net als in *E. faecalis*, het *esp*-gen in *E. faecium* op een mogelijk pathogeniciteitseiland (PAI) ligt, waarbij de hoge mate van heterogeniteit door inserties, deleties en mutaties in de DNA-sequentie van verschillende isolaten opvallend is.

In het proefschrift wordt ook een nieuwe snelle en goedkope identificatiemethode voor enterokokken beschreven, hetgeen noodzakelijk is om adequate maatregelen voor infectiepreventie te treffen. Om de genetische verwantschap van *E. faecium*-isolaten te bepalen werd een moleculaire typeermethode ontwikkeld, *multiple locus variable number tandem repeat analysis* (MLVA). Deze is sneller en goedkoper dan MLST en even discriminerend voor het bestuderen van de lokale epidemiologie van *E. faecium*. Clustering van MLVA-profielen bevestigde tevens de gastheerspecifieke genogroepen zoals gevonden met MLST, inclusief het specifieke ziekenhuisgerelateerde CC17. Vergelijking van MLVA met *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), door veel ziekenhuizen nog gebruikt als 'gouden standaard' in epidemiologisch onderzoek en infectiepreventieprogramma's, wees uit dat beide methoden in hoge mate overeenkomen, maar dat MLVA veel sneller is.

Uit een retrospectief onderzoek, uitgevoerd in het UMC Utrecht bleek een ecologische verschuiving van *E. faecalis* naar CC17-*E. faecium*. Illustratief hiervoor is de afname van het totaal aantal invasieve enterokokkeninfecties, terwijl de proportie en het absolute aantal invasieve AREfm is toegenomen. Bovendien is bij bloedisolaten de verhouding *E. faecalis/E. faecium* veranderd in het voordeel van *E. faecium*. Een zelfde toename in invasieve AREfm werd waargenomen in verschillende ziekenhuizen verspreid over heel Nederland, hoewel deze toename meer uitgesproken was in academische dan in niet-academische ziekenhuizen. Uit MLVA-typering van bloedisolaten bleek een klonale verspreiding van vier MLVA-typen, die lijkt te zijn geassocieerd met de aanwezigheid van het *esp*-gen in twee genotypen.

Dr. J. Top, afdeling Medische Microbiologie, UMC Utrecht, Heidelberglaan 100, 3584 CX, Utrecht, e-mail: j.top@umcutrecht.nl.

PERSONALIA

Nieuwe leden

- J.J. Burger, Medeco BV, Alexander Flemingstraat 2, 3261 MA Oud-Beijerland.
- Mw. Dr. S. Hulshof, Opsterland 130, 3524 CJ Utrecht.

Adreswijziging

- Mw. Dr. E. Roelofsen, ADC, Heelsumstraat 55, Willemstad, Curaçao, Nederlandse Antillen (voorheen Streeklaboratorium te Enschede).

- N. al Naiemi, VUmc, afdeling Medische Microbiologie, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam (voorheen Heemraadweg in Weesp).
- Dr. J.G. Kusters, Tergooziekenhuizen, locatie Hilversum, Centraal Bacteriologisch en Serologisch Laboratorium, Van Riebeeckweg 212, 1213 XZ Hilversum (voorheen Erasmus MC, afdeling Maag-, Darm-, Leverziekten, Rotterdam).

PROMOTIES

8 mei 2007 – M. Ooms

Proefschrift: Regulatory RNA structures in the HIV-1 genome.

Promotor: prof. dr. B. Berkhout, Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Humane retrovirologie.

11 mei 2007 – R. Renckens

Proefschrift: The fibrinolytic system in infection & inflammation.

Promotor: prof. dr. T. van der Poll. Co-promotor: dr. C. van 't Veer. Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Inwendige geneeskunde.

22 mei 2007 – F.J.U.M. van der Meer

Proefschrift: Evaluation of antivirals against corona- and lenti-viruses in cell cultures.

Promotor: prof. dr. P.J.M. Rottier. Co-promotor: dr. H.F. Egberink. Universiteit Utrecht, Diergeneeskunde, afdeling Infectieziekten, en Immunologie, afdeling virologie.

5 juni 2007 – C. Baldwin

Proefschrift: Inhibition of HIV-1 entry: the emergence of a drug-dependent virus.

Promotores: prof. dr. B. Berkhout, prof. dr. J.M.A. Lange. Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Humane retrovirologie.

7 juni 2007 – S. den Boon

Proefschrift: Tuberculosis epidemiology in Cape Town, South Africa.

Promotores: prof. dr. M.W. Borgdorff, prof. dr. N. Beyers. Co-promotor: dr. S. Verver. Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Internationale gezondheidszorg, Stellenbosch University, afdeling Kruidengeneeskunde, Kaapstad, Zuid-Afrika.

14 juni 2007 – M. Dessing

Proefschrift: Toll-like receptors and innate immunity in pneumonia.

Promotor: prof. dr. T. van der Poll. Co-promotor: dr. A.F. de Vos, Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Inwendige geneeskunde.

19 juni 2007 – F. Terpstra

Proefschrift: Viral safety of blood and plasma products.

Promotor: prof. dr. H. Schuitemaker. Co-promotores: dr. A.B. van 't Wout, dr. J. Over, Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Virologie.

28 juni 2007 – J.S. Kalpoe

Proefschrift: Quantum virology: Improved management of viral infections through quantitative measurements.

Promotor: prof. dr. A.C.M. Kroes, LUMC, afdeling Medische microbiologie.

29 juni 2007 – K. Pyrc

Proefschrift: Virus discovery and human coronavirus NL 63.

Promotor: prof. dr. B. Berkhout. Co-promotor: dr. L. van der Hoek. Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Humane retrovirologie.

3 juli 2007 – P.A. Genest

Proefschrift: Analysis of the modified DNA base J and the J-binding proteins in Leishmania.

Promotor: prof. dr. P. Borst. Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Klinische biochemie.

4 juli 2007 – E. Westerhout

Proefschrift: Silencing of HIV-1 with RNAi.

Promotor: prof. dr. B. Berkhout. Universiteit van Amsterdam, AMC, afdeling Humane retrovirologie.

AGENDA

10 SEPTEMBER 2007

4^e Gezamenlijke Bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur. Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56, L.C. Smeets, tel.: 015 260 45 84.

17 – 20 SEPTEMBER 2007

47th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Chicago, USA.

Informatie: ASM, 1752 N Street, NW Washington, DC 20036-2804, USA, e-mail: ICAAC@asmusa.org, ICAAC@itsmeetings.com, <http://www.icaac.org>

4 – 5 OKTOBER 2007

Symposium 'Post-Infectious Diseases: Molecular mimicry and beyond'

Rotterdam, Erasmus MC (Erasmus Postgraduate School Molecular Medicine)

Informatie: Dr. F.L. van Vliet, e-mail: f.vanvliet@erasmusmc.nl, tel.: 010 408 7518 of 06 5474 6408.

Registratie: www.molmed.nl.

9 OKTOBER 2007

Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie

Universitair Medisch Centrum Utrecht (van 't Veen).

Informatie: Secretariaat Nederlandse Werkgroep Klinische Virologie p/a S.M. Bruisten. tel.: 020 555 53 76.

18 – 19 OKTOBER 2007

5th European Meeting on Molecular Diagnostics

Kurhaus, Scheveningen.

Informatie: tel.: 035 542 93 33, e-mail: info@molecular-meeting.com, www.molecularmeeting.com.

28 – 31 OKTOBER 2007

3rd Trends in Medical Mycology

Turijn, Italië.

Informatie: Congress Care, Secretariaat TIMM 2007, Postbus 440, 5201 AK Den Bosch, e-mail: info@congresscare.com, <http://www.timm2007.org>.

8 – 9 NOVEMBER 2007

NVIC Infectiecongres

Reehorst, Ede.

Informatie: Organisatie- en congresbureau InterActie, Ede, e-mail: info@interactie.org, <http://www.interactie.org>

10 – 13 NOVEMBER 2007

ESCMID – SHEA Training Course in Hospital Epidemiology 2007

Praag. Aesculap Akademie, Cigankova 1861, 14800 Praha 4, Czech Republic,

e-mail: jana.holenkova@bbraun.com.

<http://www.aesculap-akademie.cz>.

15 – 16 NOVEMBER 2007

Najaarsvergadering Nederlandse Vereniging voor Microbiologie

Brugge.

Informatie: C.H.E. Boel, Stichting PAMM, Laboratorium voor Medische Microbiologie, Postbus 2, 5500 AA Veldhoven,

tel.: 040 258 81 00, fax: 040 258 81 12,

e-mail: E.Boel@pamm.nl.

15 – 18 NOVEMBER 2007

5th World Congress of the World Society for Pediatric Infectious Diseases – WSPID

Bangkok, Thailand.

Informatie: tel.: +41 22 908 0488,

e-mail: Wspid@kenes.com, m.hoogkamp@xs4all.nl.

www.kenes.com/wspid, www.wspid.com.

3 DECEMBER 2007

31st Bijeenkomst van de Werkgroep Oost, medische microbiologie

Huize Heyendaal, Nijmegen. Aanvang 14.30 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56.

2008

16 – 19 JANUARI 2008

3rd Advances against Aspergillosis

Miami Beach, Florida, VS.

Informatie: tel.: +41 22 908 0488, e-mail: Espid@kenes.com,

www.AAA2008.org.

28 JANUARI 2008

5^e Gezamenlijke Bijeenkomst van de Werkgroepen Oost-West

St. Antonius Ziekenhuis, Nieuwegein. Aanvang 14.00 uur.

Informatie: T. Schulin, tel.: 024 361 43 56, L.C. Smeets,

tel. 015 260 45 84.

RICHTLIJNEN VOOR AUTEURS

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

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

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

Door het inzenden van kopij verklaart de auteur:

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

Het manuscript is als volgt ingedeeld:

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

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

Oorspronkelijk onderzoeks- en overzichtartikel

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

Casuïstiek

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

Van de voorzitter

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

Ingezonden

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

Samenvatting proefschrift

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

Literatuur

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

Voorbeeld:

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

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

Medicamenten of farmaca

Medicamenten of farmaca worden alleen met generische naam vermeld.

Nomenclatuur

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

Tabellen en figuren

Geïllustreerde manuscripten vergroten de leesbaarheid. Tabellen en/of figuren dienen op een apart vel te worden aangeleverd, of digitaal in de vorm van een .jpg-, .jpeg-, .tif- of .bmp-bestand van een hoge resolutie. Figuren dienen vakkundig te zijn vervaardigd. De afbeeldingen moeten zo veel mogelijk contrasterend zijn. Lever bij de figuren en foto's gaarne de onderschriften aan het eind van het document.

Foto's dienen als glanzende zwart/wit-foto's te worden ingezonden, verpakt in karton. Aan de achterkant van uw illustratiemateriaal het nummer van de figuur of foto, de naam van de auteur, en een pijl om de bovenkant van de illustratie aan te geven. **Schrijf niet direct op de achterkant van het materiaal.**

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

Inzenden manuscript

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

Redactiesecretariaat

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

Advertentie

Advertentie