
Bacteriologie voor laboratorium en kliniek 1

N.M. Knecht
OXOID BV, Haarlem

Dr. L. Doornbos
Medisch-microbioloog

Derde druk

Oplage 2006

Syntax Media - Arnhem

©2006, Uitgeverij Syntax Media, Arnhem

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Voorzover het maken van kopieën uit deze uitgave is toegestaan op grond van artikel 16b Auteurswet 1912 j^o het Besluit van 20 juni 1974, Stb. 351, zoals gewijzigd bij Besluit van 23 augustus 1985, Stb. 471 en artikel 17 Auteurswet 1912, dient men de daarvoor wettelijk verschuldigde vergoedingen te voldoen aan de Stichting Reprorecht (Postbus 882, 1180 AW Amstelveen). Voor het overnemen van (een) gedeelte(n) uit deze uitgave in bloemlezingen, readers en andere compilatiewerken (artikel 16 Auteurswet 1912) dient men zich tot de uitgever te wenden.

ISBN 90 77423 42 7

www.syntaxmedia.nl

Ontwerp omslag: AlphaZet b.v., Waddinxveen

Woord vooraf

Bacteriologie voor laboratorium en kliniek bestaat uit twee delen en is in de eerste plaats bestemd voor hen, die zich op een functie in een medisch laboratorium voorbereiden. Wij denken hierbij aan HLO-studenten van de medische afdeling, die in deel 1 de leerstof kunnen vinden die nodig is voor het vak medische microbiologie, en aan HLO-studenten in het derde en vierde jaar in opleiding voor medisch microbiologisch analist, die behalve de leerstof uit deel 1 ook die uit deel 2 zullen moeten bestuderen. Ook MLO-studenten kunnen gedeelten van beide boeken als leerstof en later als naslagwerk gebruiken.

Voor analisten die reeds in een medisch-microbiologisch laboratorium werkzaam zijn, zijn beide delen van nut als naslagwerk in de dagelijkse praktijk van de bacteriologie. Het boek is tevens geschikt voor arts-assistenten in opleiding voor de medische microbiologie en voor medische studenten die zich in de klinische betekenis van bacteriële infecties en de daaruit voortvloeiende laboratoriumwerkzaamheden willen verdiepen. Ten slotte kunnen ook artsen informatie vinden over mogelijkheden van en voorwaarden voor de hedendaagse laboratoriumdiagnostiek, evenals richtlijnen voor antibiotische therapie.

Het doel van het boek is analisten een gedegen vakkennis en inzicht bij te brengen en de gebruiker met de relatie micro-organisme en mens vertrouwd te maken.

De uitgangspunten van de auteurs zijn:

- de bacterie, haar opbouw, haar morfologische, fysiologische, biochemische en antibiotische eigenschappen die voor laboratorium en kliniek relevant zijn
- de mens, zijn belangrijkste orgaanstelsels in relatie tot micro-organismen en de verdedigingsmogelijkheden waarover hij kan beschikken
- de leerstof zodanig te presenteren dat het zonder uitgebreide voorkennis of vooropleiding in de microbiologie mogelijk is inzicht te verwerven in het ‘gedrag van de bacterie’ in het laboratorium en in de kliniek.

Wij zijn veel dank verschuldigd aan degenen die hebben bijgedragen aan de totstandkoming van dit boek.

- de medische-microbiologen van de Erasmus Universiteit en het Academisch Ziekenhuis Rotterdam Dijkzigt die het manuscript hebben doorgelezen en waardevolle adviezen gaven
- enkele medewerkers aan het Westeinde Ziekenhuis, het ziekenhuis Sint Antoniushove en de Haagse Analisten School die het typewerk voor hun rekening namen

-
- de directies van het Westeinde Ziekenhuis en het ziekenhuis Sint Antoniusshove die veel faciliteiten ter beschikking stelden
 - de directeur van de Haagse Analisten School die ons stimuleerde en goede adviezen gaf.

Voor suggesties ter verbetering houden wij ons te allen tijde aanbevelen.

's-Gravenhage, juli 1983

N. M. KNECHT
L. DOORNBOS

Bij de derde druk

De wetenschap van de moleculaire biologie en de mogelijkheden op technisch en biochemisch gebied, hebben uiteraard invloed op de kennis van bacteriën en de ziektebeelden die ze bij de mens teweegbrengen.

Daarom was het nodig in deze derde druk de hoofdstukken over de infecterende bacteriën (hoofdstuk 6), de factoren waarover ze beschikken om pathogeen te kunnen zijn (hoofdstuk 5) en de ziektebeelden die ze daarmee veroorzaken (hoofdstuk 7) aan te vullen met nieuwe gegevens.

De farmaceutische industrie staat niet stil en spant zich voortdurend in om in de pas te blijven met bacteriën, die steeds weer nieuwe resistentiemechanismen weten te ontwikkelen om aan de dodende werking van antibiotica te ontkomen.

De gedeeltes over de antimicrobiële middelen en het werkingsmechanisme van bacteriën tegen deze middelen, zijn daarom bijgewerkt. De laboratoriumtechnieken die worden toegepast om de gevoeligheid of de resistentie van bacteriën te bepalen, zijn aangepast.

De opzet van het boek is niet gewijzigd.

Voorburg, juni 1998

N. M. KNECHT
L. DOORNBOS

Inhoud

Woord vooraf

v

Deel I Historische feiten en elementaire gegevens van bacteriën

1 Hoogtepunten uit drie eeuwen bacteriologie 3

2 Morfologie en structuur van bacteriën 11

2-1	Basisindeling van eencelligen	11
	Protisten	11
2-2	Bacteriën	13
2-2-1	Basisvormen	13
	Hulpmiddelen ter bestudering van de vorm	13
2-2-2	Functie en structuur	20
	Celenvolpe	20
	Cytoplasma	25
	Synthese van eiwitten	25
	Opwekken van energie	26
	Beweeglijkheid	26
	Opslag van reservevoedsel	28
	Sporenvorming	28

3 De bouwstenen van bacteriën 31

3-1	Bouwstenen	31
3-1-1	Atomen	31
3-1-2	Kleine moleculen	32
3-1-3	Grote moleculen	32
	Proteïnen	33
	Nucleïnezuren, RNA, DNA	34
	Koolhydraten	35
	Lipiden	37
3-1-4	Organellen	38
3-1-5	Cellen	38
3-2	Van bouwstenen via DNA-analyse tot classificatie van micro-organismen	40
	Taxonomie	40
	Het GC-getal	40
	Probes	41
	Nomenclatuur	42

4	Beknopte beschrijving van enkele stofwisselingsprocessen	45
4-1	Doel van de stofwisseling	45
4-2	Elementen die van belang zijn voor de stofwisseling	46
	Enzymen	46
	Co-enzymen	47
	ATP	48
4-3	Energiestofwisseling	48
4-3-1	Afbraak van voedingsstoffen	48
	Definities	49
	Glycolyse	51
	Energieopbrengst	55
	Te verrichten arbeid	56
4-3-2	Fotosynthese	57
4-4	Biosynthesestofwisseling	58

Deel II Micro-organisme en mens

5	De wisselwerking tussen bacterie en mens: besmetten, infecteren en verspreiden	63
5-1	Besmetten	63
5-1-1	Normale flora. Een duurzame relatie met de mens	63
	De eerste kennismaking met micro-organismen	63
	Flora van de huid	64
	Flora van de slijmvliezen	64
	Storingen in de leefgebieden	66
5-2	Infecteren	67
5-2-1	Pathogene bacteriën. Een tijdelijke relatie met de mens	67
	Virulentie	68
	Pathogeen vermogen	69
5-2-2	Infectie	73
	Infectieziekte	74
	Infectie van de huid	74
	Infectie van de slijmvliezen	74
	Infectie in het weefsel	75
	Infectie in lichaamsvloeistoffen	75
	Klinische, subklinische en latente infecties	76
5-3	Verspreiden van ziekten	76
5-3-1	Omschrijving van enkele begrippen	76
5-3-2	Basiselementen van een epidemie	77
6	Infecterende bacteriën	81
6-1	Gram-positieve bacteriën	81
6-1-1	Gram-positieve kokken	81
	Stafylokokken	81
	Streptokokken	83

6-1-2	Gram-positieve staven	85
	Corynebacterium	85
	Bacillus	85
	Clostridium	86
	Mycobacterium	87
6-2	Gram-negatieve bacteriën	89
6-2-1	Gram-negatieve kokken	89
	Neisseria gonorrhoeae	90
	Neisseria meningitidis	90
6-2-2	Gram-negatieve staven	91
	Enterobacteriaceae	91
	Non-fermentatieve Gram-negatieve staven	95
	Andere Gram-negatieve staven met speciale voedingseisen	95
	Anaërobe Gram-negatieve staven	98
6-3	Spirocheteten	100
	Treponema	100
	Borrelia	100
	Leptospira	101
6-4	Mycoplasma	101
6-5	Chlamydia	102

7 Geïnfekteerde organen 103

7-1	Inleiding	103
7-2	Infecties van de luchtwegen	103
	7-2-1 Bovenste luchtwegen	103
	7-2-2 Diepere luchtwegen	104
	7-2-3 Laboratoriumonderzoek	105
7-3	Infecties van het spijsverteringskanaal	106
	7-3-1 Darmziekten	106
	7-3-2 Laboratoriumonderzoek van feces	109
7-4	Infecties van de urinewegen	110
	7-4-1 Predisponerende factoren en infecties	110
	7-4-2 Laboratoriumonderzoek van urine	111
7-5	Infecties van de geslachtsorganen	112
	7-5-1 Seksueel overdraagbare aandoeningen	112
	7-5-2 Laboratoriumonderzoek	114
7-6	Infecties van de huid en van huidwonden	115
	7-6-1 Enkele belangrijke infecties	115
	7-6-2 Laboratoriumonderzoek van pus en wondvocht	117
7-7	Infecties van het centrale zenuwstelsel	117
	7-7-1 Meningitis en encefalitis	118
	7-7-2 Laboratoriumonderzoek van liquor	119

8 Verdedigingsmechanismen tegen micro-organismen en de serologische diagnostiek 121

8-1	Het niet-specifieke verdedigingsmechanisme	121
	Huid	121
	Slijmvliezen	122
	Commensale flora	123

	Ontsteking	123
	Fagocytose	123
8-2	Het specifieke verdedigingsmechanisme	125
	Antigeen	125
	Antilichamen of immuunglobulinen	126
	Het complement	128
	Basisstructuur van immuunglobulinen	129
	Bereiding van specifieke antisera	135
8-3	Serologische diagnostiek	136
	Neutralisatie	138
	Precipitatie	138
	Agglutinatie	139
	Complementbindingsreactie	142
	Onderzoek op antilichamen na een streptokokkeninfectie	143
	Onderzoeksmethoden met behulp van gemerkte immuunglobulinen	144
	Fluorescentie-immuno-assay	144
	Storende factoren en foutenbronnen	147
	EIA (enzym-immuno-assay)	149
	Basisprocedure van de EIA	149
	Gebruikte antilichamen	151
	Meest toegepaste EIA-soorten	151
	Foutenbronnen, storende factoren	153
	RIA (radio-immuno-assay)	153

9 Desinfecterende en steriliserende middelen ter bestrijding van besmetting 155

9-1	Omschrijving van enkele begrippen	155
9-2	Ontsmettingsmiddelen	156
9-3	Steriliseren	156
9-4	Desinfecteren	159

10 Antimicrobiële middelen ter bestrijding van infecties en gevoeligheidsbepalingen in het laboratorium 163

10-1	Inleiding	163
	Selectieve toxiciteit	163
	Chemotherapeutica	164
	Antibiotica	164
10-2	Werkingsmechanismen van antimicrobiële middelen	165
	Remming van de foliumzuursynthese:	
	competitieve remming	165
	Remming van de celwandsynthese	165
	Remming van de eiwitsynthese	167
	Remming van de nucleïnezuursynthese	167
	Beschadiging van de cytoplasmamembraan	168
10-2-1	Combineren van antimicrobiële middelen	169
	Synergisme	170
	Antagonisme	171

10-3	Ongevoeligheidsmechanismen van bacteriën tegen antimicrobiële middelen	171
	Wijzigingen van de permeabiliteit van de celmembraan	171
	Enzymproductie	172
	Wijziging van aangrijpingspunten voor antibiotica	172
	Wijziging in stofwisselingsprocessen	173
	Combinatie van mechanismen	173
10-3-1	De oorsprong van ongevoeligheid	173
10-4	Antibiotica in de geneeskunde	177
10-4-1	Antibiotica afkomstig van schimmels	177
	Penicillinen	177
	Cefalosporinen	178
	Griseofulvine	184
10-4-2	Antibiotica afkomstig van actinomyceten	184
	Tetracyclinen	184
	Chlooramfenicol	185
	De macroliden: erytromycine, claritromycine, azitromycine en roxitromycine	185
	De lincosamiden of lincomycinen: lincomycine en clindamycine	186
	De glycopeptiden: vancomycine en teicoplanine	186
	Aminoglycosiden	186
	Antimycotica	188
	Andere antimycotica	188
10-4-3	Antibiotica afkomstig van Bacillus-soorten	189
	Polymyxinen	189
	Bacitracine	190
10-4-4	Tuberculostatica	190
	Isonicotinezuurhydrazide (INH)	190
	Pyrazinamide	191
	Ethambutol	191
	Rifamycinen	191
	Aminoglycosiden	191
	Para-amino-salicylzuur (PAS)	191
10-4-5	Andere antimicrobiële middelen	192
	Sulfonamiden	192
	Co-trimoxazol	192
	Urine-desinfectantia	192
	Fluorochinolonen	193
	Metronidazol	194
	Mupirocine	194
10-5	Gevoeligheid van micro-organismen	194
	De maximaal toelaatbare concentratie	195
	De minimale remmende concentratie (MRC, MIC)	195
	De minimale dodende concentratie (MBC)	197
10-6	Gevoeligheidsbepaling in de praktijk	198
10-6-1	Methoden voor gevoeligheidsbepaling	199
	De schijfjes-agardiffusiemethode	199

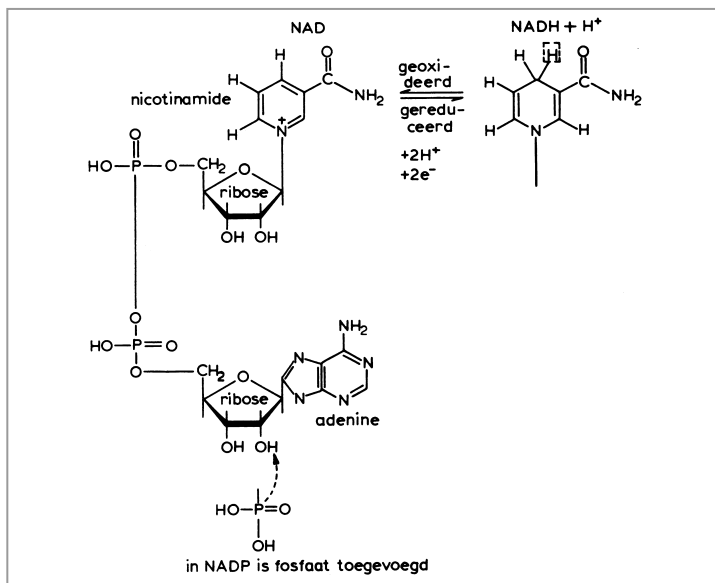
	Regressielijn	200
	Praktische aspecten van de uitvoering van de gevoeligheidsbepaling	203
	De agarverduunningsmethode	211
	De macro- en microdilutiemethode voor MRC-bepalingen	211
	De Etest	213
10-6-2	Synergietest	213
10-6-3	Controlemogelijkheden bij toediening van antibiotica	213
10-6-4	β -lactamase aantonen	215

Deel III Laboratoriummethoden voor de bacteriologische diagnostiek

11	Afnemen, transporteren, behandelen en kweken van patiëntenmateriaal	219
11-1	Het afnemen van patiëntenmateriaal	219
	11-1-1 Plaats, tijdstip, antibiotica, hoeveelheid en hulpmiddelen	219
	11-1-2 Praktische wenken voor het afnemen van enkele materialen	221
11-2	Het transport	223
11-3	Het behandelen en kweken	223
	De voorbereiding	223
	Het maken van een preparaat en kleurmethode	224
	Het enten	224
	Het beoordelen van kweekresultaten	225
	De identificatie van bacteriën met behulp van biochemische eigenschappen	227
	De gevoeligheidsbepaling	227
11-4	Andere diagnostische methoden	233
	DNA-probe, EIA en FIA	233
	PCR (Polymerase Chain Reaction)	233
	Serologische diagnostiek	235
	Huidreacties	235
	Onderzoek op proefdieren	235
12	Groei van bacteriën in het laboratorium	237
12-1	Inleiding	237
12-2	Voedingsbodems	237
	12-2-1 Voedingsfactoren	237
	Elementen voor de opbouw van de cel	237
	Energiebronnen	239
	Groefactoren	239
	12-2-2 De bereiding van voedingsbodems	240
	Toevoegen van ingrediënten	240
	Steriliseren	241
	12-2-3 Soorten voedingsbodems	242

	Synthetische en natuurlijke media	242
	Vloeibare en vaste voedingsbodems	242
	Verrijkte, selectieve, ophopings- en identificatiemedia	244
12-3	Groei	245
12-3-1	Milieufactoren die de groei beïnvloeden	245
	Zuurstof	245
	Temperatuur	246
	Zuurgraad	247
	Osmotische druk	248
12-3-2	Enkele begrippen van het groeiproces	248
	Celdeling	248
	Celwandsynthese	249
	Groei van een populatie	249
	Groeifasen	249
12-3-3	Methoden voor het meten van groei	251
	Het meten van de massa	251
	Het meten van het aantal cellen	252
12-3-4	Isoleren en reinkweken van bacteriën	253
12-3-5	Enkele veiligheidsmaatregelen	254

Literatuur**255****Register****257**



Afbeelding 4-4

Structuur van de elektrondragers (NAD) en (NADP). Ze worden geoxideerd en gereduceerd

redoxpotentiaal

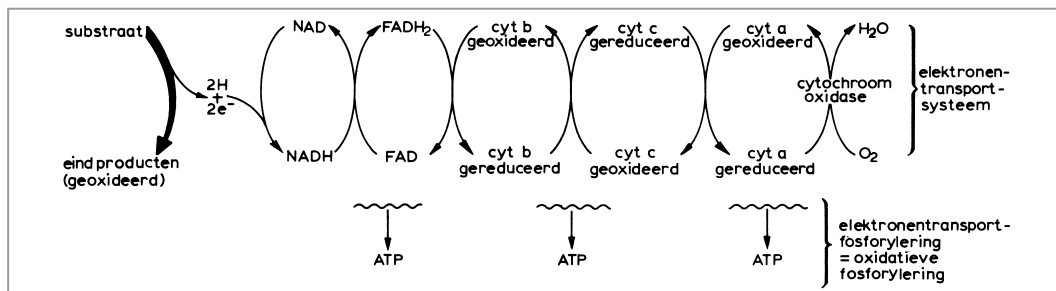
De belangrijkste vrije elektrondragers zijn de co-enzymen nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD) en het nicotinamide-adenine-dinucleotide-fosfaat (NADP). De belangrijkste gebonden elektrondragers zijn de cytochromen, flavoproteïnen, de quinonen en de zwavelijzerproteïnen, waarvan het ferridoxine het bekendst is.

De neiging van een energiebron om $H^+ + e$ af te geven wordt uitgedrukt in het woord redoxpotentiaal. De redoxpotentiaal kan men meten en in een getal weergeven ten opzichte van de redoxpotentiaal van waterstof, die als standaard wordt aangehouden. Hiervoor wordt het symbool E_h gebruikt. Van waterstof is de E_h gelijk aan 1.

H-acceptoren

Bij de oxidatie-reductiereacties worden steeds $H^+ + e$ van de energiebron (de H-donor) overgedragen naar een H-acceptor. Een veelvoorkomende H-acceptor is zuurstof.

Indien zuurstof als H-acceptor $H^+ + e$ overneemt, spreekt men van aërobe respiratie.



Afbeelding 4-5

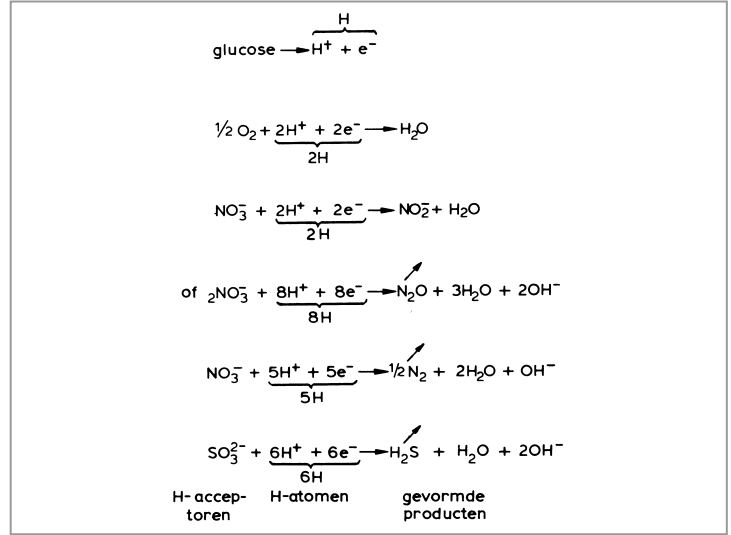
Elektrondragers bij oxidatie-reductiereacties

aëroë respiratie

anaëroë respiratie

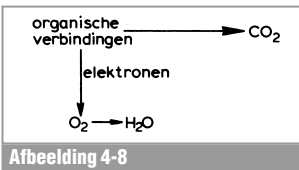
fermentatie

Nemen anorganische verbindingen zoals NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} als H-acceptoren de plaats van zuurstof in, dan noemt men het proces anaëroë respiratie. Nitraat is hiervan de meest voorkomende H-acceptor. Wanneer een organische verbinding als H-acceptor wordt gebruikt, spreekt men van fermentatie. Deze organische verbindingen dienen eerst als H-acceptor en daarna in een volgende stap als H-donor. Er hoeft dan geen H-acceptor van buitenaf, bijvoorbeeld in de vorm van zuurstof, toegevoegd te worden.

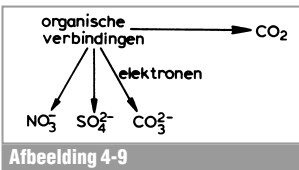


Afbeelding 4-6

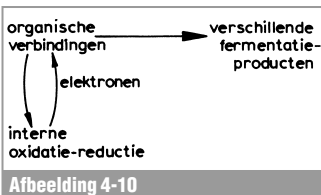
Overzicht van de H-overdracht naar diverse H-acceptoren en de gevormde producten



Afbeelding 4-8
Aëroë respiratie



Afbeelding 4-9
Anaëroë respiratie



Afbeelding 4-10
Fermentatie

Glycolyse

Glycolyse betekent letterlijk het oplossen van suiker. Hieronder verstaat men de omzetting van suikers (glucose is een bekend voorbeeld) tot pyruvaat onder invloed van de werking van enzymen zonder gebruik te maken van zuurstof als H-acceptor. Daarom noemt men dit proces soms ook wel anaëroë fermentatie. Het proces van glycolyse komt voor bij alle bacteriën die glucose omzetten.

Bij dit ontledingsproces wordt het glucosemolecuul achtereenvolgens systematisch tot verschillende intermediaire producten en uiteindelijk tot pyruvaat afgebroken door in de cel aanwezige enzymen, zoals hexokinase, glucokinase, fructokinase. Dit biochemisch proces wordt in afb. 4-11 weergegeven.

De reeks omzettingen van glucose tot pyruvaat wordt ook wel de glucoseafbraak volgens Embden-Meijerhof genoemd. Aan alle intermediair gevormde producten tussen glucose en pyruvaat wordt fosfaat gebonden, dit is gefosforyleerd. De fosfaten, afkomstig uit de cel, hebben daarbij de volgende functies:

- ze hebben als hoofddoel ATP-moleculen te vormen voor het transport van de vrijgekomen energie uit de glucose;

te kan verwekken, namelijk anthrax. Dit is een dierenziekte die slechts zelden, als een beroepsziekte, voorkomt bij mensen die in contact zijn geweest met besmette dieren of hun producten, zoals vlees of huiden. De bacterie dringt meestal door een kleine opening de huid binnen, waar dan een blaas of papel ontstaat. Vaak blijft de infectie tot deze plaats beperkt, maar het organisme kan zich ook verder verspreiden en een algemene ziekte teweegbrengen. Personen die wol sorteren kunnen de sporen ook inademen en zo besmet raken. Er ontstaat dan een ernstige longontsteking.

B. cereus

B. anthracis groeit goed aëroob op een bloedagarplaat. Deze soort vormt ook katalase. *Bacillus cereus* wordt het meest geïsoleerd als verwekker van voedselvergiftiging.



Afbeelding 6-6
Clostridia

C. perfringens

Clostridium

Clostridia zijn sporenvormende Gram-positieve staven die snel ontkleuren en Gram-negatief worden. Ze zijn obligaat anaëroob en in aanwezigheid van zuurstof zeer kwetsbaar, tenzij ze als endospore bestaan. De meeste Clostridia-soorten leven anaëroob in de grond. Sommige behoren tot de normale darmflora.

Clostridium perfringens leeft ook bij mens en dier in de dikke darm zonder daar een infectie te veroorzaken. Onder bepaalde omstandigheden kan deze soort echter bij de mens wel een infectie in wonden teweegbrengen en het ziektebeeld gasgangreen veroorzaken. Ook enkele andere soorten kunnen voor dit ziektebeeld verantwoordelijk zijn. Ten gevolge van de vorming van verschillende toxinen gaan veel weefselcellen te gronde. Het dode weefsel, waarin de bacteriën goed kunnen groeien, bevat vaak gas (CO₂ en H₂S) en wordt soms vloeibaar met holtevorming. Sommige toxinen verspreiden zich ook naar andere delen van het lichaam, waar ze andere weefsels kunnen aantasten. Het is mogelijk de patiënt met een antitoxine passief te immuniseren tegen de toxinen, maar niet tegen alle gevormde toxinen. De bacterie zelf wordt bestreden met antibiotica. Desondanks moeten soms geïnfecteerde benen of armen geamputeerd worden.

C. perfringens kan ook de oorzaak van voedselvergiftiging zijn. De bacterie groeit in het voedsel en vormt er exotoxine. Na het eten van dit voedsel komt door de werking van het enterotoxine misselijkheid en diarree voor.

C. tetani



Afbeelding 6-7
C. tetani

C. botulinum

Clostridium tetani verwekt tetanus, die veroorzaakt wordt door een krachtig exotoxine dat de zenuwen van het centrale zenuwstelsel aantast zodat spastische verlammingen ontstaan. De infectie vindt plaats wanneer *C. tetani* in een diepe wond terecht komt. De bacteriën vermenigvuldigen zich in de wond, blijven ter plaatse zonder veel zichtbare symptomen, maar het exotoxine verspreidt zich verder in het lichaam langs de zenuwbanen. Indien tetanus niet wordt behandeld is het meestal een fatale ziekte. Onder de microscoop zijn de bacteriën vaak te zien als trommelstokvormige staven.

Clostridium botulinum, een soort die ook in de grond leeft, kan botulisme verwekken. Deze zeldzame ziekte wordt gekenmerkt door ernstige verlammingverschijnselen, eveneens veroorzaakt door het exotoxine. Dit kan in onvoldoende verhit voedsel aanwezig zijn. Het is

C. difficile

thermolabiel en wordt bij normale verhitting tijdens de voedselbereiding snel onschadelijk gemaakt.

C. difficile is in de darm de verwekker van diarree, colitis en pseudomembraneuze colitis. Deze ziektebeelden zijn meestal het gevolg van behandeling met antibiotica, die het evenwicht in de darm verstoren. Een groot deel van de commensale flora wordt uitgeschakeld, terwijl *C. difficile*, die ongevoelig voor het antibioticum is, zich kan vermenigvuldigen en aan het darmslijmvlies hechten. In het ernstigste geval wordt necrotisch weefsel gevormd dat als pseudomembranen wordt afgestoten. Het ziektebeeld is het gevolg van de productie van exotoxinen.

groeieigenschappen

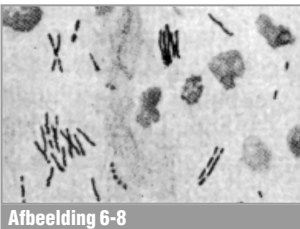
Clostridia groeien goed in een anaëroob milieu op een bloedagarplaat. Het effect van sommige toxinen kan men daarop zien in de vorm van een hemolysezone. *C. perfringens* heeft zelfs twee zones rondom haar kolonie. In de buitenste grote zone zijn de erythrocyten ten gevolge van de werking van het alfa-toxine slechts gedeeltelijk gehemolyseerd. In de zone dichterbij de kolonie zijn de erythrocyten volledig gehemolyseerd als gevolg van de werking van het theta-toxine.

C. tetani, die op een vaste voedingsbodem groeit, kan als typerend kenmerk over de gehele oppervlakte zwermen. Voor het kweken van *C. difficile* uit feces wordt een verrijkte voedingsbodem gebruikt, waaraan antibiotica zijn toegevoegd om de normale darmflora te remmen.

Mycobacterium

Mycobacteria zijn staafvormige, niet-sporenvormende micro-organismen. Ze kleuren niet of moeilijk met de Gram-kleuring. Ze zijn zuurvast. Dit betekent dat bacteriesoorten die op een voorwerp glasje eerst zijn gekleurd met carbolfuchsiene, niet meer ontkleurd kunnen worden wanneer ze met zoutzure alcohol zijn behandeld. Niet-zuurvaste bacteriesoorten worden bij deze behandeling wel ontkleurd. Deze karakteristieke eigenschap, die ze bij de Ziehl-Neelsen-kleuring vertonen, hebben de Mycobacteria te danken aan een wasachtige stof in de celwand, mycolinezuur.

Het geslacht *Mycobacterium* bevat veel soorten die in de grond leven. De belangrijkste soort is *Mycobacterium tuberculosis*, de verwekker van tuberculose bij de mens. Bij de beschrijving van deze infectie maakt men onderscheid tussen een primaire infectie en een post-primaire of herinfectie. Een primaire infectie kan ontstaan na het inademen van 'druppeltjes' of stofdeeltjes die levende mycobacteriën bevatten, afkomstig van een patiënt met een actief longproces. De bacteriën vestigen zich in de longen van het besmette individu, gaan groeien en worden omringd door macrofagen die de bacteriën fagocyteren. In de macrofagen blijven de mycobacteriën in leven en worden daarin vervoerd naar de dichtbijgelegen lymfeklieren, de hilusklieren, gelegen bij de splitsing van de luchtpijp, waar ze verdikking van deze hilusklieren tot gevolg hebben. Dit stadium noemt men het primair affect. De infectie kan dan stoppen. Ook kunnen de *M. tuberculosis* zich van hieruit opnieuw verspreiden in de longen en tenslotte cavernes vormen. Dit zijn verweekte tuberkels of granulomen, die be-



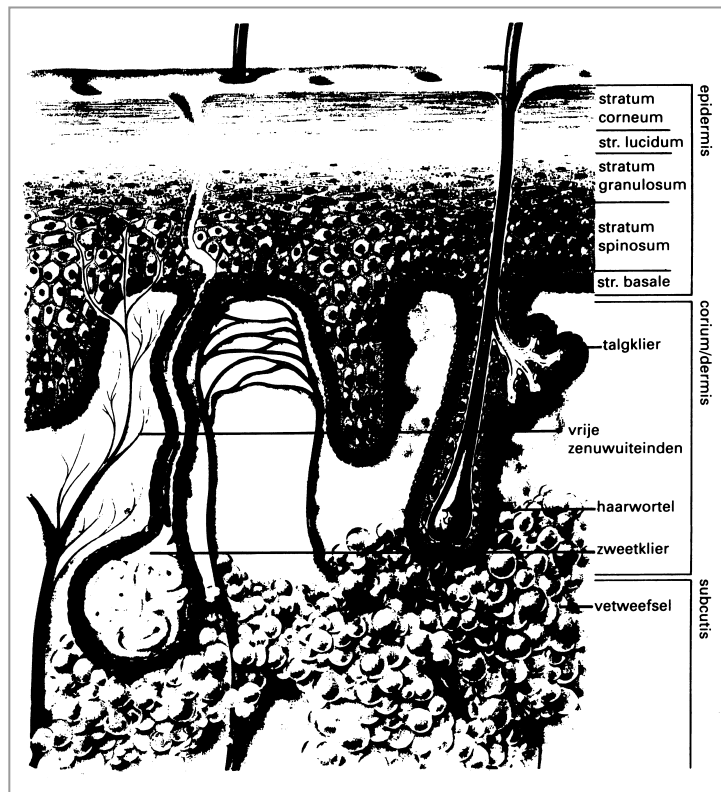
Afbeelding 6-8

M. tuberculosis in sputum

M. tuberculosis

Behalve primaire huidinfecties kunnen infecties ook ontstaan ten gevolge van verwondingen (wondinfectie). Een bekend voorbeeld zijn brandwonden, die geïnficeerd kunnen raken en waarin onder andere *Pseudomonas aeruginosa* zich gemakkelijk kan handhaven. Ook wanneer door trauma of een chirurgische ingreep de huid is beschadigd, kunnen bacteriën in de ontstane wond terechtkomen en tot een infectie aanleiding geven. Soms ontstaat hierop, als reactie van het lichaam, een abces. De bacteriën worden dan 'afgekapseld', zodat ze zich niet gemakkelijk kunnen verspreiden.

In materiaal van wondinfecties vindt men dikwijls *Staphylococcus aureus* en streptokokken van groep A. In operatiewonden bij postoperatieve infecties treft men ook vaak bacteriesoorten aan die tot de normale flora van het geopereerde gebied behoren. Wanneer de bloedsomloop in de huid gestoord is kan het weefsel in dit gebied afsterven (necrose). Indien het wordt geïnficeerd ontstaat gangreen. In materiaal van gangreen kunnen allerlei bacteriesoorten gevonden worden, zoals streptokokken (groep A), stafylokokken, Enterobacteriaceae en *Pseudomonas aeruginosa*. Ook anaërobe bacteriesoorten worden er vaak in aangetroffen. Soms wordt in gangreen ook gas gevormd. Er zijn dan bijna altijd Clostridium-soorten in de wond aanwezig. *Clostridium perfringens* wordt in deze gevallen het meest geïsoleerd.



Afbeelding 7-9

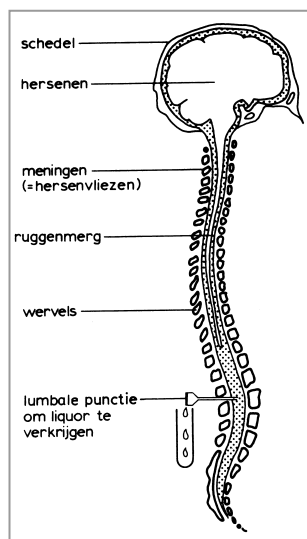
Dwarsdoorsnede door de huid

7-6-2 Laboratoriumonderzoek van pus en wondvocht

Bij huid- en wondinfecties wordt het liefst zo veel mogelijk pus of wondvocht afgenomen, zodat voldoende aanwezig is om het te kweken, maar ook om het in een Gram-preparaat te beoordelen. Het materiaal voor de kweek wordt meestal in een transportmedium vervoerd en zo snel mogelijk geënt.

Dit is zeker noodzakelijk wanneer men anaërobe bacteriesoorten wil isoleren. Voor de isolatie van aërobe bacteriesoorten gebruikt men bij voorkeur een bloedagar, chocolade-agar, een medium voor de primaire isolatie van Gram-negatieve staven en een vloeibaar medium om bacteriën die in kleine hoeveelheden aanwezig zijn of niet in optimale conditie verkeren eerst aan te kweken. Eenmaal op een vaste voedingsbodem afgeënt kunnen de kolonies beter tot ontwikkeling komen. De chocolade-agar kan bij een verhoogde CO₂-spanning worden geïncubeerd. Voor de isolatie van anaërobe bacteriesoorten worden een verrijkte bloedagar en selectieve media beënt waarop de verschillende soorten kunnen groeien. Het materiaal wordt ook geënt in bijvoorbeeld een thioglycollaatbouillon. De anaërobe incubatie gebeurt in vele laboratoria in een anaërobe pot. De anaërobe atmosfeer wordt verkregen met behulp van een enveloppe waarin zich reagentia bevinden die ervoor zorgen dat de zuurstof aan het milieu wordt onttrokken en ook CO₂ wordt gevormd, dat de groei van anaëroben stimuleert. Deze wordt met de voedingsbodems in de pot gezet. Na toevoeging van water aan de enveloppe vindt de reactie plaats. Er zijn nu systemen verkrijgbaar waaraan geen water hoeft te worden toegevoegd. Na 24 tot 48 uren incubatie worden de gegroeide soorten geïdentificeerd en wordt een gevoeligheidsbepaling voor antimicrobiële middelen verricht.

7-7 Infecties van het centrale zenuwstelsel



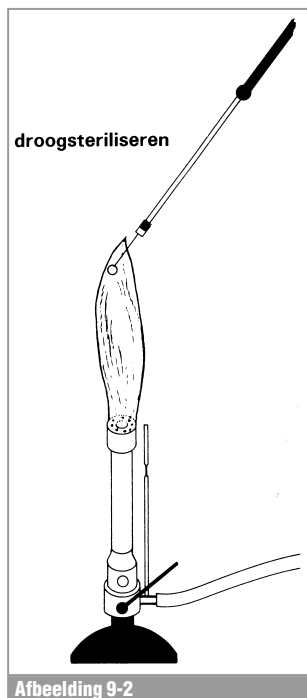
Afbeelding 7-10

Het centrale zenuwstelsel

De hersenen en het ruggenmerg vormen samen het centrale zenuwstelsel. Ze zitten opgesloten in met bot omsloten ruimten: de hersenen in de schedel, het ruggenmerg in de wervelkolom.

In vergelijking tot de andere weefsels zijn de hersenen en het ruggenmerg zeer goed beschermd tegen infecties. Infecties van het centrale zenuwstelsel komen dan ook weinig voor, maar ze zijn wel ernstig. Immers, ze kunnen tot gevolg hebben dat onze vermogens om te bewegen, zintuigen te gebruiken, te voelen of te denken worden aangetast en soms zelfs uitgeschakeld.

Binnen de schedel bestaan verschillende holten (kamers) in het centrale zenuwstelsel die gevuld zijn met een helder vocht dat men cerebrospinaal vocht of liquor noemt. Dit vocht dat continu door speciale weefselcellen in de kamers wordt gevormd en door de capillairen wordt afgevoerd, circuleert over de oppervlakte van de hersenen en langs het ruggenmerg. Liquor is normaal steriel. Bij patiënten met een infectie van het centrale zenuwstelsel vindt men de microbiële verwekkers bijna altijd in de liquor. Liquor voor onderzoek kan men met een naald, tussen twee wervels door in het onderste deel van de rug afnemen (lumbale punctie).



Afbeelding 9-2
Het uitgloeien van een entoo

werk. Andere materialen, zoals textiel, metaal en rubber, verdragen deze vorm van steriliseren slecht.

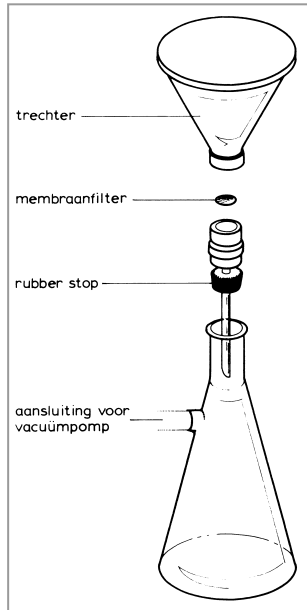
Uitgloeien is een gemakkelijke methode van steriliseren waarbij micro-organismen in de vlam(men) worden gedood door snelle oxidatie. De methode wordt toegepast bij het onschadelijk maken van veel disposable materiaal (= materiaal voor eenmalig gebruik), terwijl op het bacteriologisch laboratorium entonaalden en entogen regelmatig worden uitgloeid.

Filtratie wordt toegepast bij het steriliseren van vloeistoffen die door autoclavieren zouden ontleiden. De vloeistof wordt door een membraanfilter geperst of gezogen, die openingen van verschillende afmetingen kan hebben. Men dient een filter met een porie van een kleinere doorsnee dan die van een bacterie te kiezen. Over het algemeen gebruikt men voor bacteriën filters met een poriegrootte van $0,22 \mu\text{m}$ en voor virussenfilters met een poriegrootte van 10-20 nm. Voor de filtratie van lucht gebruikt men glasvezelfilters die 98-99% van alle partikels groter dan $1 \mu\text{m}$ tegenhouden. Absoluutfilters houden zelfs 99,8% tegen.

Voor gassterilisatie worden formaldehyde en ethyleenoxide gebruikt. Formaldehyde ontstaat in dampvorm na verwarming van paraformaldehyde (een vaste stof) of formaline (een oplossing van formaldehyde in water). De formaldehydedamp slaat in een vochtig milieu snel neer als formaline op het te steriliseren voorwerp. Formaldehyde wordt gebruikt om materialen te steriliseren die niet bestand zijn tegen de hitte van de autoclaaf (beddengoed en kleren) of er niet in passen, zoals ingewikkelde apparatuur waarin veel kunststoffen zijn verwerkt. Soms worden hele vertrekken behandeld met formaldehydegas. Ethyleenoxidegas steriliseert door oxidatie van de micro-organismen. Het wordt gebruikt voor ingewikkelde apparatuur en stoffen die niet tegen hitte of formaldehydegas bestand zijn.

Om het gas beter handelbaar te maken wordt het vaak gemengd met een ander inert gas (CO_2 , freon).

Na gassterilisatie moeten de materialen goed luchten in een warme kast met een ventilator om resten van de schadelijke gassen uit de gesteriliseerde materialen te verwijderen (ontgassen).



Afbeelding 9-3
Schema van een membraanfilter. Het apparaat wordt gebruikt voor sterilisatie door filtratie van cultuurmedia

Voor bestraling wordt voornamelijk gamma-straling gebruikt uit een radioactieve kobaltbron. De radioactieve stralen dringen diep in de materialen door en geven daar energie af waardoor de bacterie gedood wordt. Deze manier van steriliseren wordt alleen uitgevoerd door firma's die daarin gespecialiseerd zijn. Met röntgen- en elektronenstraling is sterilisatie ook mogelijk. Ultravioletstraling is in het algemeen onvoldoende om te steriliseren.

9-4 Desinfecteren

Met behulp van fysische methoden (bijv. stromende stoom) of van een chemische stof (een desinfectans) wordt het aantal bacteriën verlaagd zonder dat het te desinfecteren materiaal wordt aangetast. Bij chemische desinfectie zijn de volgende factoren van belang:

- de aard van het micro-organisme;
- de concentratie van het desinfectans;
- de temperatuur;
- de tijdsduur;
- het calciumgehalte van het gebruikte water;
- de aard van de organische stoffen die als 'vuil' aanwezig zijn.

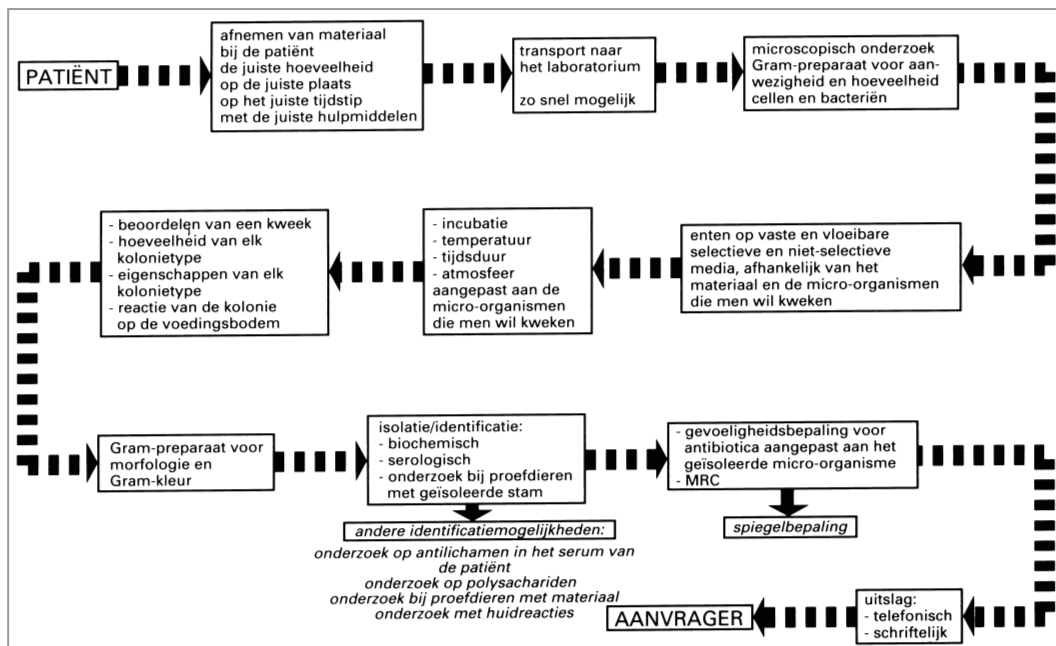
Er bestaan maar weinig goede desinfectantia. De meest gebruikte groepen zijn: halogenen, fenolderivaten, quaternaire ammoniumverbindingen, alcoholen, aldehyden.

halogenen	Van de halogenen chloor, fluor, broom en jodium zijn chloor en jodium goed bruikbare desinfectantia. Fluor en broom doden ook bacteriën, maar zijn te agressief. Ze etsen huid en slijmvliezen. De andere twee halogenen zijn sterk werkzame en wijdverbreide desinfectantia die alle micro-organismen doden, maar minder werkzaam zijn tegen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en sporen. De werking van chloor en jodium wordt nadelig beïnvloed door organisch materiaal en zeep.
chloor	Chloor kan gebruikt worden als chloorgas: het lost goed op in water. Een concentratie van 1 mg/ml water is voldoende om bacteriën te doden. Chloor wordt ook gebruikt voor het ontsmetten van drinkwater en van zwembaden. Een anorganische chloorverbinding is natriumhypochloriet, namelijk Dakinsvloeistof met 0,5% actief chloor. Deze vloeistof kan gebruikt worden om laboratoriumtafels te reinigen. Er bestaat ook bleekwater met 10% actief chloor. Chloorkalk en bleekpoeder worden beide toegepast bij grove desinfectie. Natriumhypochloriet 0,5-1% wordt geadviseerd voor desinfectie van instrumenten en glaswerk, verdacht van besmetting met het hepatitis B-virus. Organische chloorverbindingen zijn halazon en tosylchlooramide (= chlooramine). De merknamen voor tosylchlooramide zijn Halamid, Halapur en Halarin. Ze geven chloor slechts langzaam af, zijn minder agressief dan de chloorzouten en desinfecteren minder snel dan de anorganische chloorverbindingen. Ze worden, opgelost in warm water, gebruikt in de zuivelindustrie.
jodium	Jodium wordt gebruikt in alcoholische of waterige oplossing. Aan beide voegt men een jodide toe. In een waterige oplossing bevordert een jodide het oplossen van jodium, in de alcoholoplossing dient het om de vorming van het sterk irriterende zuur HJ te voorkomen. Elementair jodium heeft een heel goede desinfecterende werking; ook virussen en schimmels worden erdoor gedood. Het wordt voornamelijk bij huiddesinfectie toegepast als alcoholische oplossing (jodiumtinctuur = 1% jodium opgelost in ethanol 70%). Jodium, gebonden aan hoogmoleculaire stoffen (zgn. jodoforen),

Urine en sputum moeten in het algemeen in de vroege ochtend worden afgenomen.

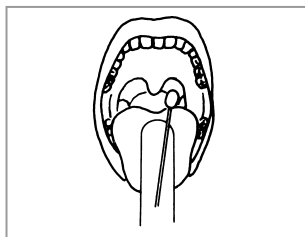
Bloed neemt men bij voorkeur af gedurende de tijd dat de lichaamstemperatuur stijgende is, dus voordat de hoogste temperatuur (de koortspiek) is bereikt.

- Het materiaal moet zo mogelijk afgenomen worden voordat antibiotica aan de patiënt zijn toegediend. Zijn wel antibiotica toegediend, dan moet men bij de interpretatie van de kweek daarmee rekening houden. Voor de interpretatie is het van belang te weten of bacteriostatische dan wel bactericide middelen zijn gebruikt. Is penicilline toegediend, dan kan men het materiaal met β -lactamase voorbehandelen om de eventueel aanwezige penicilline onwerkzaam te maken.
- Materiaal moet in een voldoende hoeveelheid worden afgenomen, bijvoorbeeld:
 - sputum: ten minste 1 ml;
 - bloed: 5, 10 of 20 ml, afhankelijk van het onderzoek en de toegepaste methode;
 - wondvocht of slijmvliedsafstrijk: een hoeveelheid aan een watendrager waarbij deze niet droog mag blijven;
 - urine: 10-20ml;
 - feces: ten minste de hoeveelheid van een theelepel;
 - pus, abcespus: indien vloeibaar opzuigen in een steriele spuit: één tot enkele milliliters.
- Om materiaal te onderzoeken moeten aangepaste middelen en media gebruikt worden zoals:
 - steriele flesjes of potjes die goed afsluitbaar zijn;



Afbeelding 11-1

Volgorde van behandeling van het patiëntenmateriaal



Afbeelding 11-2

Afnemen van materiaal van de achterwand van de keelholte: met een spatel wordt de tong zacht naar beneden gedrukt, terwijl een wattendrager over de achterwand van de keelholte heen en weer wordt bewogen

keelholte/tonsillen

sputum

- goede wattendragers, die geen schadelijke stoffen voor de bacteriën bevatten, die na afname van het materiaal niet lang onderweg mogen zijn, vochtig moeten blijven tijdens het vervoer en niet mogen uitdrogen.

Voor onderzoek op anaërobe bacteriesoorten kan materiaal opgezogen worden in een spuit en naald, die afgesloten en zo snel mogelijk vervoerd wordt naar het laboratorium. Ook bestaan er goede transportmedia voor het materiaal, zodat de levensvatbaarheid tijdens het vervoer van sommige micro-organismen zoals *N.gonorrhoeae* en anaëroben niet wordt aangetast.

Elk materiaal moet duidelijk voorzien zijn van een etiket met naam, nummer, materiaal met herkomst, klinische en andere gegevens zoals antibioticumtherapie.

11-1-2 Praktische wenken voor het afnemen van enkele materialen

De beste plaats voor afname is de achterwand van de keelholte respectievelijk de tonsillen.

Ochtendsputum is te prefereren, omdat het gewoonlijk minder gecontamineerd is met mond- en keelholteflora dan sputum dat overdag wordt opgehoest.

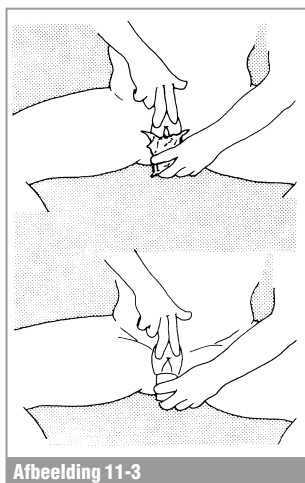
Afname via een bronchoscoop vanuit de bronchiën (bronchusspoel) wordt wel toegepast bij verdenking op tuberculose en bij verdenking op een abces veroorzaakt door anaërobe bacteriën. Ook hierbij vindt, zij het in mindere mate, contaminatie plaats, die bij de interpretatie niet over het hoofd mag worden gezien. Soms voert men daarom een larynxpunctie uit en zuigt men met naald en spuit het sputum direct ter plaatse in de bronchus op.

Pus uit het oog kan het beste vanaf het benedenooglid worden afgenomen.

Bij materiaal uit het oor is het belangrijk het zo diep mogelijk af te nemen, desnoods van achter het trommelvlies weg te zuigen om de verwekker van middenoorontsteking te kunnen determineren.

Indien mogelijk wordt wondvocht diep uit de wond afgenomen en bij voorkeur met spuit en naald opgezogen, omdat het oppervlak altijd gecontamineerd is. Het vocht, eventueel de pus, kan in de spuit, luchtdicht afgesloten, vervoerd worden zodat het behalve op aërobe ook op anaërobe micro-organismen met kans op succes kan worden onderzocht.

Is opzuigen onmogelijk, dan kan het wondvocht uit de diepte ook worden afgenomen met een wattendrager, die, afgesloten in een transportmedium, kan worden getransporteerd. Hieruit kunnen aërobe en anaërobe micro-organismen worden gekweekt. Het resultaat bij het kweken van anaëroben hangt in hoge mate af van de bescherming van het materiaal tegen zuurstof voordat het geënt wordt. Het transport van materiaal voor anaërobe kweken wordt behandeld in het hoofdstuk over anaërobe bacteriën. (Zie *Bacteriologie voor laboratorium en kliniek 2.*)



Afbeelding 11-3

Het verkrijgen van midstream urine bij de vrouw: de labia spreiden met de vingers en schoon maken met gaasje (van voor naar achter) (boven) om daarna de midstream urine op te vangen in een steriel potje