

Voorbeelden van eventuele examenvragen, dus samenvatting van de meest belangrijke dingen. Dit is dus niet alles dat je moet kennen. Zie rest van samenvatting wat gekend moet zijn.

Practicum 1

- Staalname, maar niet wat goed of wat slecht is
- Gramkleuring

Practicum 2

- waartoe dient primaire inoculatie
- Welk materiaal gebruikt men hierbij
- Welke media gebruikt men daarbij en waarom
- Vloeibaar/vast milieu
- Selectief/niet selectief
- Indicatief medium
- Combinatie medium en 1 voorbeeld hiervan
- Stam of reïncultuur

Practicum 3 en 4

- kolonie morfologie
- DNase test
- Gebruik KHD op pagina 15
- Kligler, E. coli, Salmonella, pseudomonas en Proteus
- Reïncultuur en massa, wat is dat en wat zie je
- Principe serologische identificatie
- Ab gram

Bacteriologie practicum

Practicum 1 Gramkleuring

Practicum nota's pagina 1 t/m 5 en aantekeningen aan begin van het practicum

2 voordelen van Gramkleuring

- differentiatie tussen Gr+ en Gr- kiemen
- Idee over kiemmorfologie

Principe

- Druppel gedestilleerd water op draagglasje
- Bacteriën erin enten
- Drogen en fixeren boven vlam
- **1e stap: 1e kleuring: kristal violet, dat alles paars kleurt**
- Wassen met water
- **2e stap: fixatie met lugol = iodine**
- Wassen met water
- **3e stap: ontkleuren met ethanol: Gr+ niet ontkleurd, Gr- wel ontkleurd**
- Wassen met water
- **4e stap: 2e kleuring of tegenkleuring met safranine, dat ontkleurde kiemen rood kleurt**
- Wassen met water
- Droog deppen
- Onder microscoop bekijken

Resultaat: Gr+ zijn paars en Gr- zijn rood.

Slides bij practicum 1

- **Staalname gedeelte kennen**
- **Goede en slechte manieren van staalname kennen**
- **Niet kennen = wat zijn de verschillende manieren om urine te verzamelen enz.**

Betrouwbaarheid van de uitslag van het laboratorium onderzoek afh van

- staalname
- Identificatie monster/invulling aanvraag
- Vervoer/verzenden van monster en aanvraag
- Ontvangst en registratie van monster in labo
- Uitvoeren van gevraagd onderzoek
- Registratie van resultaat
- Verzenden van resultaat

Hiervan zijn de eerste 3 de verantwoordelijkheid van de dierenarts

Staalname

Levende dieren

- zo snel mogelijk na ontstaan symptomen
- Best vooraleer Ab zijn gebruikt, want anders kan een staal geen of maar een gedeelte van de bacteriën bevatten die de oorzaak zijn van het probleem
- Eventueel contactdieren die nog geen symptomen hebben bemonsteren om een adequate behandeling voor hun in te stellen voor ze ziek worden

Pas gestorven dieren

- kan ook, maar hoe langer dood hoe meer kans er is op contaminatie met oa *Clostridium*

Algemeen

- proberen een staal te nemen met zo weinig mogelijk contaminatie, hierbij spelen ervaring en interpretatie een rol
- Staalname op plaats van infectie verkleint de kans op contaminanten en vergroot de kans op pathogenen in je staal.

Om een zo goed mogelijk staal te nemen kan men denken aan:

- schoonmaken of desinfecteren van het doelgebied: bv voor huidschimmels paard eerst de huid schoonmaken met alcohol
- Omzeilen van de normale microbiota: punctie van urine door de buik/blaaswand en niet via normale weg opvangen
- Gebruik van selectieve media: indien er bv moeilijk groeiende kiemen aangetoond moeten worden
- Kwantificeren van de bacteriën
- Vermijden contact met omgevingsmicrobiota: bv staalname uit rectum en niet uit de grond.
- Zo vroeg mogelijk post mortaal: als het langer duurt, dan het liefst een beenmergpunctie doen, want dit is het weefsel dat het langste intact blijft en het minste gevoelig is voor contaminatie.
- **Neem voldoende materiaal**
- **Vermijd uitdrogen**, dus gebruik transportmedium. Meestal zitten hier geen voedingsstoffen in, want dan krijg je overwoekering met goed groeiende bacteriën.
- **Staalname op een tijdstip dat de kans op isolatie maximaal is**, dus zo vroeg mogelijk na optreden van klinische symptomen en voor toediening Ab. En als die toch al gebruikt zijn, dit op het begeleiden vermelden, zodat labo er rekening mee kan houden.
- Bovendien van orgaan waar meeste xxx zal zijn.

Grote stalen (organen)

- nemen voor openen van de darmen, want die zijn een bron van contaminatie: darmen ook altijd apart verpakken en niet tezamen met andere organen.
- Afdrogen, wikkelen in absorberend papier
- Afkoelen tot 4 of -20 C, maar invriezen niet geschikt voor alle bacteriën
- Representatief staal
- Organen liefst afzonderlijk verpakken
- Niet verpakken in gesloten plastic zakken wegens condensvorming en dus woekering van contaminanten.

Grote stalen (organen) alternatief

- oppervlak van organen schroeien met een verhitte scalpel, om zoveel mogelijk contaminanten te inactiveren ==> steriele swab op deze plaats brengen en ronddraaien ==> daarna swab in transportmedium

Specifieke gevallen van staalname

Moet op examen van elk een voorbeeld kunnen geven

1) Urine

- **Cystocentese:** prikken doorheen de huid in een volledig gevulde blaas. Men reinigt het oppervlak en prikt. Het is eenvoudig en snel en er is geen contaminatie met endogene microbiota.
- **Katheterisatie:** er is wel contaminatie met endogene microbiota en bovendien risico op inbrengen van infectie in diepere urinewegen.

- **Midstream urine:** ook hier contaminatie met endogene microbiota en mag zeker niet door de eigenaar worden uitgevoerd, wegens kans op extra contaminatie. Van de drie methode heeft deze de meeste contaminatie.
- Manier van staalname vermelden op aanvraag.
- Voldoende hoeveelheid
- Steriel en in een volledig af te sluiten container
- Nooit urine op een swab, want dan geen kiemen meer te tellen ==> de diagnose berust op het tellen van het aantal bacteriën en vergelijken met normaal aantal kiemen.
- Transport: koel, maar niet invriezen, want waterkristallen kunnen bacteriën vernietigen en oa *E. coli* gaat sterk achteruit.
- Wijs eigenaar erop hond of kat 2-4 uur voor staalname niet te laten urineren
- Staal nooit door eigenaar laten nemen
- Vertrouw niet op labo alleen en zoek een goed labo uit, want niet alle labo's doen aan telling.

2) Melk

- belangrijk in kader van mastitis
- Reinig en desinfecteer de tepels en uier. Begin met de tepel het verst van uw hand verwijderd. Bv met 70% alcohol
- Begin nu bij de dichtst bijzijnde tepel
- Laat er eerst wat melk uit, vooraleer je een staal neemt.
- Hou het recipient schuin onder de tepel, zodat er geen vuil in kan vallen. Zorg ook dat het de tepel niet aanraakt. Raak zelf het recipient ook niet dicht bij de rand aan en verwijder het dopje zo kort mogelijk. ==> speciale techniek
- Vul het buisje niet volledig, want oa *E. coli* produceert gas.
- Bewaren koel, bij 4C en minder dan 24 uur, want melk is een goede voedingsbodem
- Melk mag wel op een swab verzamelt worden

3) Faeces

- bevat van nature uit al grote hoeveelheden micro-organismen, dus steriele container eigenlijk niet zo belangrijk.
- Zorg voor voldoende faeces: 5-10 gr, maar niet op swabs
- Zo vers mogelijk
- Indien mogelijk rechtstreeks uit rectum om omgevingscontaminatie te vermijden
- Vooral delen met bloed of slijm verzamelen, omdat hier meestal de kiemen in zitten die het probleem veroorzaken.
- Koelen, niet invriezen
- Goed afsluitbare container
- Intermittente excretie. Bv paard is drager van Salmonella, hierbij moet men meerdere keren een staal nemen, want de kiem wordt niet altijd uitgescheiden.

4) Huid

- vaak veel contaminanten en secundaire kiemen
- Probeer wondvocht uit te knijpen en te swabben
- Diepe wonden: spuiten en naalden/materiaal onder korsten verzamelen.
- In geschikt transportmedium stoppen
- Voor gesloten pustels en abscessen: oppervlakte desinfecteren ==> inhoud aspireren of etter op een swab nemen ==> luchtdicht afgesloten bewaren, dus bv in spuit om anaëroben te bewaren.
- Neem een zo recent mogelijk abces

5) Keel/neus

- ook hier reeds uitgebreide microbiota aanwezig
- Resultaten daarom moeilijk te interpreteren

- Enig lichtpunt: overvloedige groei van pathogene kiem op medium ==> men weet zeker dat deze kiem de veroorzaker is.

6) Diepere luchtwegen

- neusvloeit of keeluitstrijkje ongeschikt wegens endogene microbiota en omgevingskiemen
- Bronchiaalspoelsel nodig: onder verdoving een tracheotube inbrengen

Monstergegevens/anamnese

- goede identificatie van monster op zendbriefje: dus bv links voor of links achter bij verdenking van mastitis.
- Gegevens over:
 - Monster: aard materiaal, datum afname, wijze afname (urine)
 - Patiënt: diersoort leeftijd
 - Aanvrager: naam, adres, tel/fax, e-mail
 - Anamnese: klinische tekenen, behandeling (tijd/duur), vermoedens

Dit alles is belangrijk voor de kwaliteit van het kweekresultaat, interpretatie en behandeladvies

Bewaring

- gekoeld met max 4C: voor max 24 uur muv de swab die voor de meeste bacteriën een week bewaard kan blijven
- Ingevroren dus -20C: max 2-3 weken afh van bacteriesoort
- Anaërobe bacteriën: in hermetisch afgesloten recipiënten en zo vlug mogelijk enten, dus liefst binnen half uur. Er zijn speciale mediums voor anaëroben, maar die zijn duur en het kan nog niet langer dan 24 uur bewaard worden.

Verzenden

- goed verpakking noodzakelijk
- Geen glas of ander breekbaar materiaal
- Steriele containers die goed zijn afgesloten en niet lekken
- Vloeibaar: dubbele verpakking en absorberende stof
- Containers maximaal voor 3/4 vullen, want gasvormers kunnen aanwezig zijn.
- Zo snel mogelijk naar labo brengen

Diagnose van bacteriële infectie

Staal —> labo

2 manieren mogelijk

- rechtstreeks aantonen agens zonder kweek: gebruikt voor moeilijke groeiers
- Of isolatie van agens na kweek

Rechtstreeks aantonen van agens zonder kweek

- rechtstreeks microscopisch onderzoek, zie cursus en 1 vb kennen. Meestal door afdrukpreparaat of uitstrijkje te maken. Kan zo bekeken worden, maar meestal wordt gramkleuring gebruikt.
- Serologische methoden: As toevoegen die binden op kiem en aan te tonen zijn met bv een ELISA
- Technieken gebaseerd op aantonen van DNA/RNA zoals hybridisatietesten en PCR, maar zie hiervoor practicum 5.

Isolatie van agens

- men kan enten op een selectief of niet selectief medium, maar liever op alle 2
- Men kan enten op een vast of vloeibaar milieu of doen aan selectieve aanrijking. Dit

laatste is eerst enten op een vloeibaar milieu, zodat een bepaalde kiem goed kan groeien en delen en dit dan uit te enten op een vast milieu, zodat er minder contaminanten in je vast milieu zitten en je kiem meer in aantal is en dus beter zal groeien. Meestal gebruik gemaakt van selectieve bouillons, omdat er anders zeer snel overwoeking is.

- Men bestudeert **kolonie en kiemmorfologie**. Houdt rekening met natieve en gefixeerde preparaten. Natieve is beter voor oorspronkelijke vorm en beweeglijkheid, nadeel is wel dat contact met omgevende vloeistof minimaal is en daarom vaak met donkerveld microscoop worden bekeken. Bij gefixeerde preparaten gebruikt men meestal de gramkleuring.

Ziehl-Neelsen kleuring

- maakt onderscheid tussen zuurvaste en niet zuurvaste bacteriën
- Kleuring met carbol fuchsine (rood)
- ontkleuring met H₂SO₄ of HCL
- Tegenkleuring met methyleenblauw
- Zuurvaste bacteriën worden niet ontkleurd en behouden hun rode kleur. Niet zuurvaste bacteriën kleuren dus blauw.

Identificatie van verdachte kolonies, zie ook volgende practica

- biochemische eigenschappen
- Antigene eigenschappen
- Gevoeligheid voor lytische fagen
- DNA of RNA

Faagtypering

Gastheerspecifieke, lytische fagen

- gaten in kolonies wijst op lyserende fagen. Dus als je weet waar de fagen specifiek voor zijn, weet je ook wat je bacterie voor soort is.

Resultaat labo onderzoek

- naam geïsoleerde en geïdentificeerde kiem: indien er een mooie reïncultuur of cultuur is verkregen kan men een Antibioqram maken met als extra resultaat het Ab dat je het beste kan gebruiken
- Geen herkenbare pathogenen: er zijn in het staal geen bacteriën of schimmels, er zijn er wel maar niet overvloedig aanwezig, er zijn er wel maar het zijn geen van alle pathogenen. ==> dan kan je ziekte viraal zijn gebaseerd
- Bacteriologisch negatief: geen kiem of schimmelgroei, dit komt zeer zelden voor en is meestal te wijten aan een dier dat al behandeld is
- Proteus overgroei: verontreinigd staal, dier dat al enige tijd dood is of slecht genomen staal.
- Polybactrieel: talrijke bacteriën en schimmels van verschillende species of een gecontamineerd staal (van gestorven dieren): meestal slecht genomen staal

Dus hoe beter de staalname, hoe beter de kwaliteit van de resultaten

Practicum 2 Isolatie van bacteriën/schimmels/gisten

Practicum nota's blz 6 t/m 12 en aantekeningen aan begin van het practicum

Primaire inoculatie met als doel het bekomen van een reïncultuur

Reïncultuur = bevat maar 1 soort bacteriën. Eerst kan een heterogene plaat gemaakt worden. Indien er genoeg verdund wordt, worden afzonderlijke kolonies zichtbaar en kan men door selectieve pick up, een soort bacterie isoleren en op een andere plaat uitenten.

Voedingsbodem = cultuur of medium met substraat of vloeistof toegevoegd die voedingsbestanddelen voor het micro-organisme bevat.

Strategie:

- goede staalname noodzakelijk en bovendien aangepast aan soort bacterie en soort staal, maar zie practicum 1 slides daarvoor.
- Indien mooie cultuur bekomen dan kan men species, genus en familie gaan vaststellen door kiem en kolonie morfologie

Bij lage concentraties: vloeibaar milieu eerst geënt, hier de kiem goed op laten groeien en dan pas enten van het vaste milieu.

Bij hogere concentraties: gelijk enten vast milieu

Vloeibaar milieu: nadeel is dat alle bacteriën door elkaar groeien, men stelt groei vast aan ontstane troebelheid.

Dit vaste milieu hoopt men een reïncultuur te bekomen, zodat men de kiem mooi kan identificeren.

- men onderscheid selectieve (bepaalde soorten in groei geremd, zodat andere beter zichtbaar zijn of groeien) en niet-selectieve media (geschikt voor groei meeste bacteriën)
- Indicatieve milieu: laten toe de eigenschappen van bepaalde bacteriesoorten te herkennen ==> identificatie. Denk aan Kligler
- Combinatie milieu: zijn selectief en laten toe biochemische eigenschappen van bacteriën na te gaan. Mc Conkey agar.

Let op!!!! Er is een verschil tussen kolonie en kiem morfologie

Media

Kennen: verschil en wat het is van selectieve en niet selectieve media

- **bloedagar**
- **1 combinatie milieu kennen**
- **Weten wat een reïncultuur is**

= medium waarop alle kolonies die aanwezig zijn van 1 en dezelfde species is.

Bloed agar

- niet selectief milieu
- Geschikt voor de isolatie van de meeste bacteriën
- Bevat oa bloed, waardoor hemolyse door bepaalde bacteriën veroorzaakt zichtbaar wordt.

Colistine nalidixine zuur (CNA) bloedagar

- selectief milieu
- Geschikt voor isoleren van Gr+ kiemen = **doelwit kiemen**
- Bevat antimicrobiële agentia colistine en nalidixinezuur = **selectieve stof** ==> Gr- geremd in groei = **geïnhibeerde kiemen**
- Bevat geen indicator

Mc Conkey agar

- combinatiemilieu dus selectief en indicatief
- **Doelwit:** Gr+ darmbacteriën dus enterobacteriaceae met bijzonder *E. coli*

- **Selectieve stof:** galzouten en kristalviolet, die Gr+ kiemen remmen in groei = **geïnhibeerde kiemen**
- Men gaat lactosevergisting na. Indien de kiem lactose kan vergisten is hij lactose + en verzuurd het milieu, wat een rode kleur geeft. Lactose - geeft een gele kleur.
- **Indicator:** neutraalrood.

Sabouraud agar

- **doelwit:** schimmels en gisten
- **Selectieve stof:** penicilline en streptomycine, zodat bacteriën = **geïnhibeerde kiemen** worden geremd in de groei. Bovendien ook zure pH dat ook zorgt voor een gedeeltelijke remming van de groei van sommige bacteriën.

Incubatie omstandigheden

- voor bacteriën van zoogdieren: 37C
- Voor bacteriën van koudbloeddieren: 15-30C
- Voor schimmels 37C, voor huidschimmels 25C, behalve als het gaat om *Trichophyton verrucosum* van het rund dan ook 37C
- Lucht onderscheid in aerob, supplementatie CO2 en anaëroob

Geen slides bij practicum 2

Practicum 3 identificatie van geïsoleerde bacteriën door nagaan van fenotypische eigenschappen

Practicum nota's blz 13 t/m 22 en aantekeningen aan begin van het practicum

Koloniemorfologie

- idee over groep waartoe de bacterie toe behoort, aantal bacteriën en de bacteriesoort. Dit alles zegt dus iets over de eigenschappen van de bacterie.
- Is wel afhankelijk van gebruikte voedingsbodem en incubatieomstandigheden
- Hieronder verstaat men: vorm (proteus heeft karakteristieke concentrische groeiringen), grootte, kleur, geur, precipitatie = neerslag
- Ook zone van volledig of onvolledige hemolyse is belangrijk voor identificatie.

Biochemische eigenschappen

Testen die direct resultaat geven.

- oxidase test:** speciaal teststrookje dat je op de kiemen drukt, indien het roze kleurt dan oxidase positief. Maw de kiem heeft oxidase enzyme en kan het kleurloos substraat = tetramethyl-p-phenylene van het teststrookje omzetten in een roze kleurend product. Geen verkleuring is dus oxidase negatief. Vb positieve oxidase test is *Pseudomonas spp.* ==> **volgens cursus NK**
- Katalase test:** men voegt waterstofperoxide toe aan de cultuur op medium. Indien dit gaat schuimen dan is de kiem katalase positief. Het heeft dus het katalase enzyme dit enzyme zet waterstofperoxide H₂O₂ om in H₂O en O₂ (gas). Vb positieve katalase test zij Staphylokokken en enterokokken. Men kan ook enkele druppels bacteriesuspensie toevoegen aan enkele druppels waterstofperoxide op een draagglasje of andersom natuurlijk. Zo spaar je de cultuur.==> **volgens cursus NK**
- KOH test of verslijmingstest:** hierbij zullen Gr- verslijmen en Gr+ niet. Men voegt enkele druppels bacteriesuspensie toe op een draagglasje met enkele druppels KOH.

Testen die na incubatie resultaat geven.

- D) **DNAsetest:** maakt onderscheid tussen pathogene en niet pathogene stafylokokken. Men maakt een entstreep van bacteriën op een medium verrijkt met DNA. Als de kiem DNase positief is dan zal na incubatie rond de streep er een opklaring zijn als men HCL toevoegd dat DNA neerslaat, want daar is het DNA afgebroken. Indien hij DNA-se negatief is zal de plaat tot de entstreep troebel zijn als men HCL toevoegd. Voorbeelden van DNase positieve kiemen zijn *S. intermedius/aureus/hyicus*. De heldere zone moet wel 4 keer de diameter van de entstreep hebben om als positief aangemerkt te worden.
- E) **Indol test:** positief is rode kleur in buisje als bacterie in staat is om het Az tryptofaan af te breken tot indol indien men Kovac's reagens toevoegt.. Dit bevat amyralcohol dat indol naar oppervlakte brengt en aminobenzeldehyde dat indol rood kleurt. Als men dus dit reagens in enkele druppels toevoegt aan een geïncubeerde bacterie cultuur die positief is dan zal er een rode ring ontstaan. ==> **volgens cursus NK**
- F) **Gebruik van koolhydraten of Kligler**
- controle Kligler is helemaal rood en zonder gas
 - Men gaat suikerfermentatie, gasvorming en H₂S vorming na. Het medium bevat 10% lactose, 1% glucose, Fe en fenolrood (indicator). Glucose is de eenvoudigste suiker van de 2. Lactose is eigenlijk 2 glucoses aan elkaar. Als lactose afgebroken kan worden, kan het makkelijkere glucose ook afgebroken worden. Bovendien gaat suikerfermentatie beten anaëroob dan aëroob.

Er zijn 3 mogelijkheden voor de suikerfermentatie.

- bacterie kan geen glucose of lactose afbreken: er wordt geen zuur geproduceerd en de Kligler blijft rood.
- De bacterie kan alleen glucose afbreken: de Kligler is alleen onderaan geel en bovenaan nog rood. Er is maar weinig glucose aanwezig en dit gaat het beste anaëroob dus niet op de lip waar veel zuurstofcontact is.
- De bacterie kan zowel lactose als glucose afbreken: de gehele Kligler zal geel kleuren, want lactose zit zo veel in het medium dat het ook in het aërobe bovenste deel wel afgebroken zal worden.

Gasvorming is simpel te zien: indien de bacterie positief is dan zal de Kligler in zijn geheel op in stukken omhoog geduwd worden.

Ijzerneerslag is ook goed te zien: ijzer neerslaan indien er H₂S een sterk zuur door de bacterie wordt geproduceerd. Het medium zal dan in meer of minder mate zwart kleuren. Let wel op, dit kan zo intens zijn, dat een geel verkleuring niet meer is te zien

- G) **Ureum (vloeibaar, wit-geel):** ureum → ammoniak = base dus paarse kleur bij positieve testen en dus bij bacteriën die urease als enzyme hebben.
- H) **Lysine (vloeibaar, blauw/paars):** indien een bacterie lysine kan decarboxyleren zal ze de indicator paars kleuren. Dus lysine decarboxylase positief is paars en negatief blijft het gewoon geel.
- I) **MIO of motility - indol - ornithine:** het is normaal een halfvast paars medium.
- Indien een kiem positief is voor ornithine zal het hele medium paars zijn.
 - Indien de kiem negatief is voor ornithine zal het medium onderaan geel zijn.
 - Indol positief test men door Kovac's reagens toe te voegen. Indien een kiem positief is zal er bovenaan een rode ring ontstaan.
 - Bewegelijkheid positief: geeft een troebel medium, want kiemen groeien over gehele medium uit.
 - Bewegelijkheid negatief: geeft een helder medium, want alleen bacteriegroei thv de entstreep.==> **bewegelijkheidstesten volgens cursus NK**

Slides bij practicum 3

- **diagnose bij bacteriële infecties kennen.**

Diagnose van een bacteriële infectie

- rechtstreeks aantonen agens zonder kweek
- Isolatie van het agens na kweek

Rechtstreeks aantonen van het agens zonder kweek

- rechtstreeks microscopisch onderzoek
- Serologische methoden
- Technieken gebaseerd op DNA/RNA: hybridisatietesten en PCR

Isolatie van het agens

- selectie uit primaire media: selectief versus niet selectief en vloeibaar versus vast en eventueel aangerijkt
- Studie van de morfologie: kolonimorfologie zie practicum 3 en kiem morfologie zie practicum 1.

Kolonimorfologie

- Zie stukje over practicumnota's deel 3. Dus vorige bladzijde

Identificatie van geïsoleerde kiemen

- biochemische eigenschappen (reincultuur, gebruik indicatieve milieus)
- Antigenen eigenschappen (rein-/mengcultuur, maar zie practicum 1 en 4)
- Gevoeligheid voor lysische fagen (reincultuur, maar zie practicum 1)
- DNA/RNA (rein of mengcultuur)

Biochemische eigenschappen

Zie eerder in deze samenvatting onder de practicumnota's van practicum 3.

10) commercieel: zijn er veel testkits op de markt die zeer veel suikers en enzymen in een korte tijd kunnen testen, maar ze zijn wel heel duur, dus alleen te gebruiken als je weet welke kiem je hebt.

Indicatie dmv DNA detectie

Rechtstreeks aantonen van de kiem

- Hybridisatietesten
- PCR, maar dit is **niet kennen voor examen**

Identificatie van bacteriën geïsoleerd in laboratorium

- hybridisatietesten
- DNA fingerprinting technieken, **maar dit is niet kennen voor examen**
- PCR, **maar dit is niet kennen voor examen**

Hybridisatie testen dit dus wel kennen voor examen

- het is binden van 2 DNA-strengen die niet van dezelfde dubbele helix afkomstig zijn of binden van een RNA streng op een DNA streng.

Probes: enkelstrengige DNA fragmenten die een gekende specifieke sequentie hebben en bovendien voorzien zijn van een merker (radioactief = warme probe of niet radioactief = koude probe)

Principe: men heeft een gekende probe en een onbekend DNA fragment uit een bacterie

==> men doet dit bij elkaar ==> en kijkt of er binding is.

Proces: reincultuur bacterie ==> nylon/nitrocellulose membraan ==> temperatuur boven 65C verhogen, zodat de bacterie lyseert en zijn DNA vrijkomt, het DNA denatureert of dus enkelstrengig wordt en het DNA op de membraan bindt ==> probe toevoegen ==> incuberen bij 37-65C ==> al of niet binding ==> wassen ==> aflezen = **vb van kolonie hybridisatie**, dit is ook het enige principe dat je moet kennen.

Voorbeeld: *E. coli* uit mest biggen met neonatale diarree en probes van F4, F5, F6, F41, LT en ST. stel de probe met F4 radioactieve merken bindt ==> wassen ==> de plaats op de membraan waar de F4 probe is toegevoegd zal radioactief gemerkt zijn en de andere plaatsen met de andere probes dus niet.

Practicum 4: aflezen van identificatietesten/onderzoek

Practicum nota's blz 23 t/m 25 en aantekeningen uit de les.

Edwardsmedium

- selectief voor sterptokokken
- Gebruikt voor diagnose van mastitis, want *S. uberis*, *S. agalctiae*, *S. dyscalactiae* zijn allemaal esculine positief. Deze veroorzaken allemaal klinische mastitis.
- Toont afbraak van esculine aan
- Bij geen groei, zal esculine niet worden afgebroken en zal het onder de UV lamp blauw oplichten. Dus bij wel groei zijn er plaatsen waar esculine wel is afgebroken en dus niet oplichten. De speciale lamp is een lamp van Wood.

Kligler milieus van *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus* en *Pseudomonas* kennen

Omdat de Kliglers van *Salmonella* en *Proteus* bijna identiek zijn worden ze ook geënt op urease milieus. Ook het onderscheid tussen deze twee op dit milieu moet je kennen. Zie figuur.

Slides uit practicum 4

Examenleerstof

- **dilutiemethodes MIC uit practicum 5**
- **Agar diffusie test Kirby bauer)**
- **agglutinatie testen**

Agar diffusie test

Principe

- Ab diffusie vanuit papierschijfjes (disks) of tabletten in een omgeven agarmedium, nadat dit medium geïnoculeerd werd met een gestandaardiseerde hoeveelheid micro-organismen
- dus men maakt een bacteriesuspensie van 0,5 McFarland of 10^8 kve/ml. Hiervoor is een speciaal apparaatje voorhanden, waarin men met een soort swab een beetje bacterie van je reincultuur kan afhalen en het in oplossing brengen.
- Dit inoculeert men dan op een nieuwe broedplaat
- Na incubatie gebruikt men een speciale verdeler die van elk Ab, 1 schijfje laat vallen.
- Dit incubeert men weer.
- Indien er een opklaringszone rond het schijfje zichtbaar is die groter is dan een gestandaardiseerd minimum, dan kan men zeggen dat de bacterie gevoelig is aan dit Ab, want het betekent dat hij daar niet is gegroeid.

Serologische identificatie

- **principe van agglutinatie:** gebaseerd op een polysaccharide in de celwand van de kiemen en fungeert als Ag. Men heeft een ongekende bacteriesuspensie met dus onbekende Ag op zijn celmembranen. Men gooit hier gekende As bij die gericht zijn tegen gekende Ag. Indien er agglutinatie optreedt weet je dat je onbekende bacterie de Ag bevat waartegen de As waren gericht en kan je mogelijk zeggen welke bacterie je voor je hebt. Indien geen agglutinatie optreedt, dan weet je dus dat je bacterie deze Ag niet bevat. Let op: kan alleen met bacteriesuspensies die niet spontaan uitvlokken.

Demonstraties en praatjes

- **antibiotica resistentie, antibiogram is kennen over principe.**
- **Weten dat er commerciële kits bestaan voor allerlei enzym en eiwit testen voor in de praktijk.**

Practicum 5: Antibiotica resistentie en antibiotica gevoeligheidstesten.

Slides over antibiotica resistentie en antibiotica gevoeligheidstesten

1) wat is Ab resistentie

1a) algemeen

- van oorsprong zijn Ab biologisch, maar inmiddels ook chemische synthese = chemotherapeutica en modificatie van natuurlijke Ab.
- Breed en beperkt spectrum
- Verschillende werkingsmechanismen

Bacteriostatisch: kiem deelt zich niet meer, maar blijft leven

Bacteriocid: kiem gaat dood

MIC = minimaal inhibitorische concentratie: de laagste concentratie van een Ab waarbij de kiemgroei totaal of vrijwel totaal onderdrukt wordt in **vitro**. En dit uitgedrukt in µg/ml (of mg/ml).

1b) criteria om resistentie te definiëren

Microbiologisch criterium of epidemiologisch criterium

Intrinsieke resistentie: het van nature uit resistent zijn van een bacterie aan een Ab.

Verworven resistentie: een van nature gevoelige bacterie die resistentie verwerft ==> MIC waarde wordt hoger.

Gevoelig = een bacterie die even gevoelig is voor een Ab als de type stam

Resistent = Een bacterie die dus minder gevoelig is als de type stam

Microbiologisch criterium = als een bacterie minder gevoelig is dan zijn type stam en dus verworven resistentie heeft. Dit wordt bepaald aan de hand van de MIC waarde en heeft dus als gevolg voor de praktijk dat een resistente kiem in vitro in de vivo omstandigheden nog steeds gevoelig en dus perfect behandelbaar kan zijn, omdat zijn MIC waarde wel is gestegen, maar er nog steeds hoger spiegels Ab in weefsels bereikt kunnen worden dan de MIC waarde van de bacterie. Let wel op: niet alle kiemen reageren hetzelfde in vitro als in vivo. Er zijn stammen van *S. suis* die in vitro wel gevoelig zijn en in vivo niet

Genetisch criterium

De gevoeligheid van een bacterie voor een Ab wordt gedefinieerd door de aan- of afwezigheid van een resistentiegen of mutatie.

Resistent = bacterie die het resistentiegen heeft of de mutatie heeft die het een resistentiegen maakt.

Gevoelig = een bacterie die geen van beide heeft.

Let op: ook al heeft de bacterie het gen, maar het wordt niet tot expressie gebracht of het co-deert voor een lage graad van resistentie, dan is de kiem dus nog wel gevoelig in vivo, maar niet volgens dit criterium.

Farmacologisch criterium

Vergelijking gevoeligheidsniveau bacteriestam met bloedspiegels Ab.

Gevoelig = bacteriestam gevoelig aan Abconcentratie lager dan die in bloed bereikt kan worden.

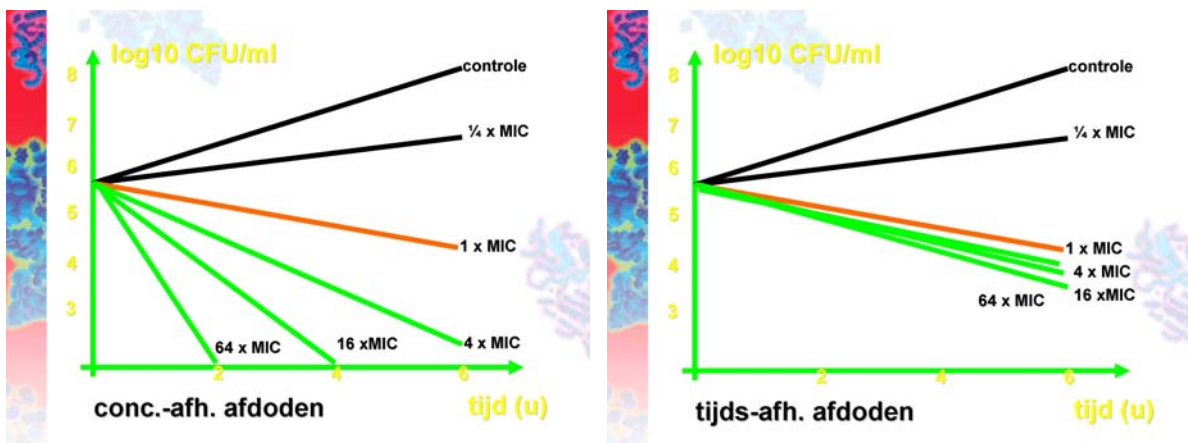
Resistent = bacteriestam met gevoeligheid aan Abconcentratie hoger dan die in bloed bereikt kan worden.

Concentratie-afhankelijke afdoding : door aminoglycosiden en fluoroquinolones.

Van belang is de concentratie. Hoe hoger de concentratie hoe sneller de afdoding gaat.

Tijds-afhankelijke afdoding: door beta-lactams, macroliden, lincosamiden. Van belang is de tijdsduur dat de Abconcentratie boven de MIC waarde licht, want zolang dit het geval is, zal de bacterie worden afgedood. Dus of het nu dicht bij de MIC ligt of er heel ver vanaf, maar eigenlijk niet veel uit, de bacterie wordt even snel afgedood. Zie grafieken van dia 28-29 in pdf file.

Beperkingen: kan niet gebruikt worden voor lokale infecties (huid, darm, baarmoeder, blaas etc, want die hebben geen bloedspiegels aan Ab. En ook niet bruikbaar voor niet resorbeerbare Ab, maw Ab die niet in het bloed terecht komen.



Klinisch criterium

Gevoelige = bacteriële infectie reageert goed op een behandeling met Ab

Resistent = de behandeling met Ab van de bacteriële infectie faalt.

Houdt dus rekening met eventueel verschil in gevoeligheid/resistentie van kiem in vitro en in vivo. Houdt dus rekening met bacteriologische en pathologische parameters.

Er wordt gekeken naar experimentele infecties, veldproeven en praktijkervaring. Vb bivalente ionen uit roestend metaal inactiveren oxytetracycline.

Beperkingen: interfererende factoren kunnen therapie doen falen ==> bacterie wordt foutief als resistent bestempeld. Dit kan het geval zijn als de bacteriële infectie secundair is, er multiple infectie is, de immuniteit van het dier meespeeld, het start tijdstip van de therapie fout is of er een foute diagnose wordt gesteld.

Breekpunten: wat doet men als MIC waarden geen uitsluitsel beiden en een stam intermediair is tov gevoelig en resistent. Dan kijkt men naar farmacologisch, microbiologisch en klinisch criterium om uit te maken of die stam gevoelig dan wel resistent is.

1c) natuurlijke en verworven resistentie

Definities zie eerder

Hoe kan een kiem verworven resistentie krijgen:

- mutatie
- Overdraagbare resistentie

Verticale spreiding = als een kiem resistentie heeft verworven zal ze dit via binaire deling doorgeven aan zijn nakomelingen

Horizontale spreiding = als het kenmerk overgaat naar een andere bacterie dan zijn nakomelingen.

- **transformatie**: opname van naakt DNA dat bv vrij is gekomen na cellyse, als dit een resistentiegen bevat zal de bacterie die dit opneemt resistentie verwerven. Dit komt echter niet zo heel vaak voor.
- **Transductie**: overdracht van DNA mbv bacteriofagen. Komt in vivo weinig voor als het resistentiegenen betreft. Komt wel veel voor als het virulentiegenen betreft.
- **Conjugatie**: DNA donor naar acceptor via proteïne tunnel. Het DNA is afkomstig via een mobiel DNA fragment, dus plasmide of transposon

Mechanismen van Abresistentie

- verandering van het doelwit of verhoogde synthese van het doelwit. Zodat het Ab niet meer kan binden of uitgeput raakt.
- Reductie van accumulatie van het Ab in de bacterie dus efflux-impermeabiliteit.
- Adaptatie bacterie door ontwikkeling alternatieve metabolische stap
- Productie van enzymen die het Ab inactiveren

1d) kruisresistentie en multipele resistentie

Een kiem kan kruisresistent zijn indien:

- Ab behoren tot dezelfde scheikundige familie
- Het is kiemafhankelijk, dus soort streptokok bepaald of hij voor alle beta-lactam Ab resistent is of voor maar een paar ==> zie cursus stuk over MRSA
- Resistentiegen afhankelijk: MRSA is resistent voor alle beta-lactam Ab, omdat ze een mecA resistentie gen heeft. Andere streptokokken hebben dit gen niet en zijn dus niet voor alle beta-lactam Ab resistent. Zie weer stuk over MRSA in cursus.

Dus kruisresistentie is belangrijk voor de interpretatie van het antibiogram. Indien een kiem voor een bepaald Ab resistent is, zal het voor kruisresistente Ab ook resistent zijn. Of andersom en dan gevoelig.

Multipele resistentie = een kiem is resistent voor Ab waartussen geen kruisresistentie bestaat ==> de kiem bezit dus meerdere resistentiegenen.

2) hoe meet je de gevoeligheid van bacteriën voor Ab

Fenotypische testen

- **Dilutiemethode**: kwantitatief (MIC exact bepaald), op vloeibare voedingsbodem of agar, op milieu dat reeds een gekende concentratie Ab bevat (via 2voudige verdunningen) en bepaling van MIC waarde voor elke bacteriestam apart. Dus men legt een 2voudige verdunningsreeks aan en voegt aan elk welletje/buisje een standaard aantal levende kiemen toe. Hierna kijkt men waar wel en niet groei is en bepaald de MIC waarde. Dit is dus het welletje/buisje bij de laagste concentratie aan Ab waar geen groei is. Als je dus een welletje/buisje verder gaat, dus een lagere concentratie daar is wel groei. Zeer gevoelig aan allerlei in vitro variabelen, dus minder vaak in praktijk gebruikt. Agardilutie: men legt verschillende agars aan met een verschillende concentratie aan Ab. Hierop kan men dmv een spotting meerdere bacteriesoorten enten. Ook hier kijkt men weer waar geen groei meer optreed bij toenemende concentratie Ab en bepaald zo voor elke bacteriesoort de MIC waarden

- **Diffusiemethode:** kwalitatief: Abgram (ruwe schatting van MIC) of kwantitatief: de E-test

Antibiogram: agar van een standaard milieu zonder AB met reincultuur van bacterie ==> toevoegen van schijfjes Ab ==> doel: bepaling van gevoeligheid van 1 bacteriestam voor verschillende Ab ==> na incubatie: groei-inhibitiezones, maar kan verschillend zijn van praktijk

- minder accuraat dan dilutiemethode, maar er kan dmv de diameter te bepalen van de remzone toch ingeschat worden wat de MIC waarde van de bacterie is. Hoe kleiner de remzone hoe hoger de MIC waarde, want concentratie Ab is hoger naarmate men dichterbij het schijfje zit.
- Ook hier weer breekpunten beschreven door CLSI of clinical laboratory standard institu

Factoren die remzone beïnvloeden

- diffusiesnelheid van Ab
- Medium samenstelling: eiwitbinding kan Ab inactiveren, ook vet en vochtgehalte spelen een rol
- Dikte medium: hoe dikker hoe moeilijker diffusie.
- Incubatieomstandigheden: atmosfeer en temperatuur
- Groeisnelheid kiem
- Dichtheid inoculatie

Standaardisatie diffusietesten diergeneeskunde ongeveer 1 systeem, maar kan per land verschillen. Toch per systeem een waarde vastgelegd.

E-test = men legt een speciaal strookje op de agar. Dit strookje is gradueel in concentratie belegd met Ab. Aan een uiteinde meer Ab afgegeven dan aan ander uiteinde ==> ovaal/eclipsvormige inhibitiezone ontstaat. Op snijpunt strip kan je de MIC waarde aflezen.

Genotypische testen: PCR en hybridisatie. PCR is geen examenstof en hybridisatietesten zie eerder practicum.

3) practicum: aanleggen van een antibiogram, zie practicum 4

4) belang voor de praktijk van antibiogram

- geen ondoordacht gebruik Ab in de praktijk, zodat er zo min mogelijk resistentie ontstaat
- Kennis van intrinsieke resistenties en van oorzakelijke kiemen
- Aanvraag bacteriologisch onderzoek
- Isolatie van ziekteverwekkende kiem
- Aanleggen van Ab ==> verworven resistentie nagaan
- Indicatie voor bruikbare Ab in deze patient.

Wanneer in vitro resultaten verschillen van in vivo resultaten

- verkeerde kiem: als je contaminanten bekijkt, op bij polybacteriële groei op de plaat niet de veroorzaker van de symptomen neemt of als je een kiem behorende tot de normale microbiota selecteerd ipv de pathogene kiem
- Fout in laboratorium: vals resistent of vals gevoelig
- Irreversibele letsels ontstaan, zodat behandeling de kiem wel dood, maar de symptomen nooit kunnen verdwijnen.
- Lokale behandelingen
- In vitro omgeving is niet gelijk aan in vivo omgeving
- Verkeerde interpretatie antibiogram

BAPCOC

= belgian antibiotic policy coordination committee

- probeert dierenartsen een optimaal gebruik van Ab aan te leren
- Zorgt voor betere laboratorium technieken en kwaliteit
- Verspreiden van informatie icm bepaalde resistenties (epidemiologie)

Slides over invloed van fysische en chemische agentia op bacteriën

Steriel = vrij van levende micro-organismen

Asepsis = afwezigheid van micro-organismen in weefsel

Aseptisch werken = contact met micro-organismen en sepsis vermijden

Desinfectans = chemische verbinding om micro-organismen te doden/inactiveren

Toxisch = desinfectans niet bruikbaar op levende weefsels

Antisepticum = desinfectans, maar niet toxisch, dus wel bruikbaar op levende weefsels, maar alleen oppervlakkig en niet systemisch.

Antibiotica en chemotherapeutica: chemische verbinding tegen bacteriën en systemisch bruikbaar.

Bacteriostatisch = aantal delingen daalt en is reversibel

Bactericid = irreversibel en dood de bacteriën.

Algemene werkingsmechanismen van antibacteriële agentia

- schade aan celwand/plasmamembraan: zoals zeep, penicilline
- Schade aan genetisch materiaal: irradiatie maar moet vitale structuren raken
- Inhibitie bacterieel metabolisme: bv enzym-inhibitie

Sterilisatie

Bij verhoogde temperatuur:

- verbranding: flamberen entnaald bv
- Droge warmte: oven, minder effectief dan vochtige warmte. Minimaal 30 min bij 170C. Luchtcirculatie noodzakelijk.
- Vochtige warmte: geeft denaturatie proteïnen, gebeurd in autoclaaf, koken en pasteurisatie. 60-70C bij tiental minuten. Sporen en thermofiele bacteriën bieden meer weerstand. **Autoclaveren**: toestel dat stoom onder druk verwarmt. De tijd om micro-organismen inclusief sporen te vernietigen is afh van temperatuur, maar wordt korter naarmate er hoger temperaturen kunnen worden gebruikt. Hoge temperaturen uitsluitend in afgesloten stoomketel autoclaaf te bereiken. Werking beste bij elke sterilisatie gecontroleerd. Hierbij kan gebruikt worden gemaakt van een kleefband, die veranderen als ze voldoende lang aan een bepaalde temperatuur worden blootgesteld. Ook recipient met sporen in autoclaaf gebracht ==> na proces nagegaan of ze nog levend zijn door inoculatie en incubatie op cultuurmedium. **Koken**: geen sterilisatie, tenzij heel lang gekookt, wel effectieve manier om vegetatieve kiemen te doden. **pasteurisatie**: vloeistoffen kortstondig verwarmd tot temperatuur die vegetatieve kiemen dood, maar geen smaak of kwaliteitsstoornissen geeft.

Bij lage temperaturen

- invriezen: kan aantal kiemen verminderen, maar vele kunnen juist zo lang overleven, maar vermenigvuldigen dan niet.
- Na ontdooien zijn er wel beschadigde weefselcellen, deze zijn een ideale voedingsbodem voor bacteriën.

Bestraling

- in lage dosis ==> mutatie
- In hoge dosis ==> dood kiemen
- Ook sporen zijn gevoelig
- UV stralen: gering doordringingsvermogen ==> enkel oppervlakkige sterilisatie, wel schadelijk voor mens en dier.
- Gamma en betastralen: penetreren zeer goed en kunnen dus voedingswaren en materialen geheel steriliseren, maar geur, kleur, smaak en rijping kunnen eventueel worden aangetast.

Filtratie

- membraanfilters: voor vloeistoffen die niet verwarmd mogen worden. Bestaat tegenwoordig uit een cellulose-ester. Efficiëntie hangt af van partikelgrootte en poriëngrootte
- Glaswolfilters: voor sterilisatie van lucht = HEPA of high efficiency particulate air filters gebruikt in laminaire luchtstroomkasten. Houden 99,99% van kleinste partikels tegen.

Chemische stoffen

- let op ontvlambaarheid
- Irriterend vermogen voor ogen, huid en kan hoofdpijn, nausea en braken veroorzaken
- Dragere nodig
- Toepassingen oa: gassterilisatie voor medische instrumenten
- Vb ethyleenoxide

Reiniging en ontsmetting

= geheel van maatregelen met als doel

- aantal kiemen op oppervlak/ in de lucht te doen dalen tot een hygiënisch aanvaardbaar niveau
- Totaal vernietigen van ongewenste micro-organismen

Factoren die de werking beïnvloeden van reinigen en ontsmetting

- Temperatuur, meestal hoger is beter, voor sommige is er zelfs een minimum temperatuur.
- Concentratie desinfectans, dit in verband met inwerkingsduur. Voor sommige is dit meer uitgesproken dan voor andere. Vaak daling snelheid en accuraatheid ontsmetting door resterende vloeistof (water) van reinigen dat is blijven staan.
- pH milieu
- Organisch materiaal = vuil: bescherming bacteriën en virussen, chemische interactie = desinfectans werkt deels op organische materiaal, zodat er minder overblijft voor de echte kiemen, vooral opvallend bij hoog reactieve producten. Dus mechanische reiniging voor desinfectie noodzakelijk.
- Waterhardheid, quaternaire ammoniumverbindingen en iodoforen zijn gevoelig.
- Aanwezigheid micro-organismen: dus aantal en lokalisatie. Ook in spleten en hoeken eerst reinigen, soms waterlaagje nodig om desinfectans in op te lossen voor het goed werkt.
- Aard micro-organismen: van zeer gevoelig naar zeer resistent
 - Mycoplasmen
 - Virussen met envelop
 - Gr+ kiemen
 - Gr- kiemen

- Schimmels en schimmelspores
- Virussen zonder envelop
- Zuurvaste kiemen
- Bacteriesporen
- Aard oppervlak: glad (beter te ontsmetten) versus onregelmatig (beter voor de dieren, want glijden niet uit).

Nadelen van ontsmetten

- toxische of beschadigende neverwerkingen, dus neem voorzorgsmaatregelen
- Resistentie ontwikkeling

Kenmerken ideaal ontsmettingsmiddel

- snel toxisch voor breed gamma micro-organismen
- Activiteit niet beïnvloedbaar (door pH, temperatuur, organisch materiaal, enz)
- Niet toxisch voor mens of dier
- Niet corrosief
- Stabiel en homogeen
- Kleur- en geurloos
- Eenvoudig in gebruik en goedkoop
- Oplosbaar in water
- Niet ontvlambaar

==> **ideaal ontsmettingsmiddel bestaat niet**

Pagina's uit de cursus die gekend moeten zijn voor het practicum

- Blz: 58-62
- Blz: 80-82
- Blz: 82-90, maar al samengevat in normale cursus, want ook behandeld in normale lessen.
- Blz: 91-102
- Blz: 177-199
- Blz: 205-207
- Blz: 211-222

Blz: 58-62

Reinculturen, vloeibare en vaste voedingsbodems, selectief, niet selectief, soorten. Dus zie practica. Zie practicum 2.

Blz: 80-82

Antibiotica resistentie, criteria zie practicum 5.

Blz: 82-90, maar al samengevat in normale cursus, want ook behandeld in normale lessen.

Blz: 91-102

Sterilisatie, reinigen en ontsmetten. Dus zie practicum 5.

Blz: 177-199

Staalname, bacteriële diagnose, gram kleuring, selectie en inoculatie primaire media, aflezen primaire media, identificatie door nagaan biochemische eigenschappen, serologische testen, identificatie van bacteriën dmv gekende bacteriofagen, identificatie dmv technieken geba-

seerd op DNA of RNA.
Dus zie practicum 1, 3 en 4.

Blz: 205-207

Allemaal kleine lettertjes en figuren die je niet moet kennen.

Blz: 211-222

Antibiotica gevoeligheidstesten: het antibiogram, criteria, fenotypische en genetische testen.
Dus zie practicum 5