HOOFDSTUK V.

METHODIEK VAN HET BACTERIOLOGISCH ONDERZOEK.

Dit onderzoek werd uitgevoerd in het bacteriologisch laboratorium (Hoofd: Mevrouw Dr. A.G.M. Huysmans-Evers) van het Onze Lieve Vrouwe Gasthuis. De phaagtypering van de staphylococcen werd verricht in het Rijks Instituut voor de Volksgezondheid te Utrecht onder leiding van Dr. R.Th. Scholtens.

In navolging van vele auteurs (o.a. Elek, 1959) hebben wij aan de Staphylococcus albus (epidermidis), met een negatieve coagulase proef, geen pathogene betekenis toegekend. Deze is een normale bewoner van de menselijke huid en wordt daarom vaak met de etter van een geïnfecteerde wond als verontreiniging meegekweekt. De pathogene staphylococ, waar wij het onderzoek verder op richtten, was de Staphylococcus aureus of pyogenes, met positieve coagulase proef.
Het materiaal omvatte drie soorten monsters, welke bacteriologisch onderzocht zijn:

1. etter of secreet uit geïnfecteerde operatiewonden of andere infectieuse laesies,
2. neusuitstrijken,
3. sedimentatieplaten.

Ad. 1 De monsters, die op zaal werden afgenomen (de methodiek hiervan is beschreven in hoofdstuk II en IV), werden zo spoedig mogelijk in het bacteriologisch laboratorium afgeleverd. De in de operatiekamer verkregen monsters werden in speciaal hiervoor ontworpen etterbuizen opgevangen. Deze bestaan uit een steriele inwendige buis, waarop een kurk zit, waaraan een glazen schepje verbonden is. Deze buis is geplaatst in een steriele uitwendige buis.
Wanneer er tijdens een operatie etter werd gevonden, schudde de omloop zuster de uitwendige buis, waarvan de inhoud steriel is, op de instrumenten tafel leeg. Nu kan de operatiezuster de inwendige buis steriel de chirurg aanreiken. De chirurg kan met het schepje etter in de inwendige buis deponeren. Daarna laat de chirurg de binnenbuis welke aan haar buitenzijde gecontamineerd kan zijn vanwege de vuile operatie, in de uitwendige buis zakken, welke de omloopzuster ophoudt. Met deze techniek is voorkomen, dat het monsterbuisje aan de buitenzijde met etter bevuild is.
Van elk afgenomen monster werd een Gram-preparaat gemaakt. Vervolgens werd het materiaal geënt op een bloedagarplaat en een speciale selectieve voedingsbodem voor staphylococcen (Chapman 1946). Aan de hand van het Gram-preparaat, b.v. bij het vinden van Gram-negatieve coccen of

staafvormige bacteriën, werden zonodig andere voedingsbodems beënt. Eveneens werden media geënt welke anaeroob werden bebroed.

De bloedagarplaat werd gedurende 24 uur bebroed bij 32°C. Van de bloedagarplaat werd bij groei van staphylococcen één kolonie overgeënt op een nieuwe bloedagarplaat om een zuivere kweek te maken. Op deze bloedagarplaat werd een eventuele haemolyse afgelezen. Tegelijkertijd werd van de eerste bloedagarplaat van dezelfde kolonie overgeënt op een agarbuis, omdat hierop beter het pigment der staphylococcenkolonies zichtbaar is. Na 24 uur bebroeden bij 37°C werd van de agarbuis een öse-vol van de gegroeide cultuur afgenomen voor de coagulase-proef. Hierbij werd de buisjesmethode toegepast met bacto-coagulase-plasma (Difco-laboratories). Alleen de coagulase positieve staphylococcen werden als pathogeen beschouwd en deze werden te Utrecht met phagen getypeerd.

Van de agarbuis werd een speciale voedingsbodem de gevoeligheidsbepaling uitgevoerd (diffusie-methode) met behulp van eigengemaakte antibiotica tabletjes. Als voedingsbodem werd gebruikt de sensitivity test agar (Oxoïd). Deze plaat werd 24 uur op 37°C bebroed en daarna werd de gevoeligheid afgelezen.
De gevoeligheid werd onderzocht voor de volgende antibiotica:
penicilline; streptomycine; de tetracyclinegroep; chloortetracycline (aureomycine), oxytetracycline (terramycine) en tetracycline (achromycine); chloromycetine (chlooramphenicol) en erythromycine.
Bovenstaande antibiotica waren ten tijde van het onderzoek in de kliniek de meest gebruikte.
De volgende schrijfwijze werd gebezigd om deze gevoeligheid tot uitdrukking te laten komen:

+ + /	+	+	+ /	+ +
PENICILLINE	STREPTOMYCINE	AUREOMYCINE	TERRAMYCINE	ACHROMYCINE	CHLOROMYCETINE	ERYTHROMYCINE

\+ = gevoelig
– = resistent
/ . . . / = tussen de schuine strepen zijn de tetracyclines vermeld.

Voorbeeld:

Het antibiogram --/+++/++ betekent dat de desbetreffende bacterie ongevoelig is voor penicilline en streptomycine, doch gevoelig voor de overige boven-vermelde antibiotica.

Indien de gevoeligheid van penicilline niet goed afleesbaar was, werd deze overgedaan met de titratiemethode (verdunningsmethode) waarbij nauwkeurig de minimale remmende dosis van het antibioticum ten opzichte van de te onderzoeken bacterie bepaald kon worden.

De Chapmanplaat werd gebruikt, omdat hierop de Staphylococcus aureus herkenbaar is aan de goudgele kleur der kolonies. Dit is te danken aan de vorming

van pigment door de staphylococcen. De Staphylococcus albus kolonie is veel lichter van kleur.
Het onderscheid tussen albus en aureus en ook tussen verschillende soorten aureus, afhankelijk van licht of donker pigment, is op de bloedagarplaat moeilijk al te lezen. Bij twijfel tussen een Staphylococcus aureus en albus werd de kolonie overgeënt op de agarbuis. Als er dan nog twijfel bestond, werd van de desbetreffende kolonie een coagulaseproef gedaan. Was deze negatief, dan werd besloten de staphylococ tot een albus te rekenen.
Wanneer er duidelijke verschillen in pigmentvorming aanwezig waren (licht en donker gekleurde kolonies), werden deze kolonies afzonderlijk onderzocht op coagulase activiteit, gevoeligheidspatroon en phaagtype. De Chapmanplaat werd 2 x 24 uur bebroed bij 37°C en daarna nog eens 2 x 24 uur bij kamertemperatuur (± 20°C). Van de Chapmanplaat werd ook een reincultuur op een agarbuis gekweekt en van deze agarbuis werd de coagulase-proef en de gevoeligheidsbepaling gedaan.
Wanneer het gevoeligheidspatroon overeenkwam met dat van de zuivere kweek, welke uit de bloedagar gekweekt was, werd één van beide agarbuizen voor phaagtypering opgezonden. Was er verschil in het resistentiepatroon, dan werden de zuivere kweken van de Chapmanplaat en van de bloedagarplaat beide voor phaagtypering opgezonden.

Ad.2. De steriele wattentampon van de neusuitstrijk werd direct na afname uitgestreken op een Chapmanplaat. Deze plaat werd 2 x 24 uur bij 37°C bebroed: daarna nog eens 2 x 24 uur bij 20°C (kamertemperatuur). Hiervan werd een zuivere kweek gemaakt op een agarbuis. Van iedere soort (pigment) werd een aparte agarbuis geënt. Van deze zuivere kweken werden de coagulase-activiteit, het gevoeligheidspatroon en het phaagtype bepaald.

Ad.3. De sedimentatieplaten, welke als graadmeter voor de luchtcontaminatie op de operatiekamer werden gebruikt, waren bloedagarplaten. Wij hebben hier geen Chapmanplaten voor gebruikt, omdat wij naast de luchtbesmetting met staphylococcen een indruk wilden hebben over het totale bacteriegehalte van de lucht. Op de Chapmanplaat groeien bijna alleen Gram positieve coccen; deze plaat bevat een hoog gehalte aan Na Cl, dat remmend werkt op de groei van Gram negatieve bacteriën.

Van deze bloedagarplaten werd het totale aantal bacteriekolonies geteld ("total count") en het aantal kolonies Staphylococcus aureus. Van iedere kolonie van Staphylococcus aureus werd een zuivere kweek op een agarbuis gemaakt, waarna het gevoeligheidspatroon, de coagulase-activiteit en het phaagtype werden bepaald.
Van ieder gevoeligheidspatroon werd slechts één kolonie voor phaagtypering opgezonden. Toen bij nader onderzoek bleek, dat meerdere kolonies van hetzelfde gevoeligheidspatroon tot verschillende phaagtypen behoorden, hebben wij van

iedere staphylococcenkolonie van de sedimentatieplaat het phaagtype laten bepalen.

PHAAGTYPERING DER STAPHYLOCOCCEN.

Staphylococcenstammen kunnen van elkaar onderscheiden worden aan de hand van hun gevoeligheid voor bacteriophagen.
Volgens de door Williams en Rippon (1952) beschreven methode wordt een op een bouillonagarvoedingsbodem geënte Staphylococcus aureus cultuur, beënt met verschillende bacteriophagen. Deze phagen kan men kweken op bepaalde staphylococcenstammen (propagatiestammen).
Volgens een vast patroon laat men van iedere te gebruiken testphaag één druppel op de plaat vallen. Na een nacht bebroeden is de plaat met een egale hoeveelheid staphylococcen bedekt. Op sommige plaatsen zijn dan gaatjes te zien, plaques genaamd. Dit wijst er op, dat ter plaatse de groei van staphylococcen geremd of verdwenen is (lysis). Veelal wordt een staphylococcenstam door verschillende phagen gelyseerd. Op deze wijze ontstaat een bepaald phaagpatroon, bestaande uit die phagen welke lysis geven van een bepaalde staphylococcenstam. Naar dit phaagpatroon zijn staphylococcenstammen epidemiologisch te onderscheiden.
Op het zesde internationale congres voor bacteriologie te Rome werd vastgesteld welke phagen men als standaardphagen zou gebruiken voor de typering van staphylococcenstammen.
In Nederland werd in 1955 reeds van deze methode gebruik gemaakt door Ruys bij een epidemiologisch onderzoek bij studenten en ziekenhuispersoneel (Ruys 1955) en door Goslings bij een onderzoek van ziekenhuisinfecties met tegen antibiotica resistente staphylococcen (Goslings 1955).
De 21 standaardphagen werden in 4 groepen verdeeld. Goslings vond nog twee phagen, n.l. N (=Nobel) en 44B.
De methode der phaagtypering, zoals deze in ons onderzoek gebruikt is, is ontwikkeld door Ruys en Borst (1959). Bij zijn onderzoek naar de besmetting met staphylococcen bij moeders en zuigelingen in een kraamkliniek heeft Borst deze methode toegepast (Borst 1960).
Het blijkt dat de sterkte van de lysis met de phagen verschillend kan zijn. Dit gaf moeilijkheden bij de notatie. Aanvankelijk gaf men alleen de phagen aan, die sterke lysis deden ontstaan. Bij eveneens noteren van zwakke phaagreacties kon het epidemiologisch onderzoek echter verfijnd worden (Ruys en Borst 1959). Anderson en Williams (1956) meenden ook dat op kleine reactieverschillen staphylococcenstammen van elkaar te onderscheiden zijn.
Scholtens van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Utrecht heeft een goed bruikbare methode ontwikkeld om het phaagpatroon overzichtelijk weer te geven. De phaagreacties worden naar sterkte genoteerd, zodat het phaagpatroon snel in een schema afgelezen kan worden.
In onderstaande figuur worden de 28 gebruikte phagen, gegroepeerd in 3 groepen,

weergegeven, alsmede de symbolen voor de sterkte van de ontstane lysis.
Het phaagpatroon van de door ons naar het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid opgezonden staphylococcenstammen, werden genoteerd op daartoe bestemde formulieren (zie figuur 4).

RIJKS INSTITUUT VOOR DE VOLKSGEZONDHEID
STERRENBOS 1 – UTRECHT
Telefoon 030-27151
Toestel 46

Lab. nr.: F.t.St. nr.:

Aanvraagformulier voor fagotypering van Staphylococcus aureus

Volledig en leesbaar in te vullen (is tevens adres voor antwoord)!

1. Inzender
Naam: .....
Adres: .....
Woonplaats: .....

2. Naam en voorletters van de patiënt(e) | Leeftijd: | M/V

3. Woonplaats van de patiënt(e):

4. De stam is geïsoleerd bij een gezonde/zieke uit | datum:

5. Gevoeligheid voor antibiotica: Penicilline: Streptomycine:
Chlooramfenicol: Tetracyclines: Erythromycine:
novobiocine

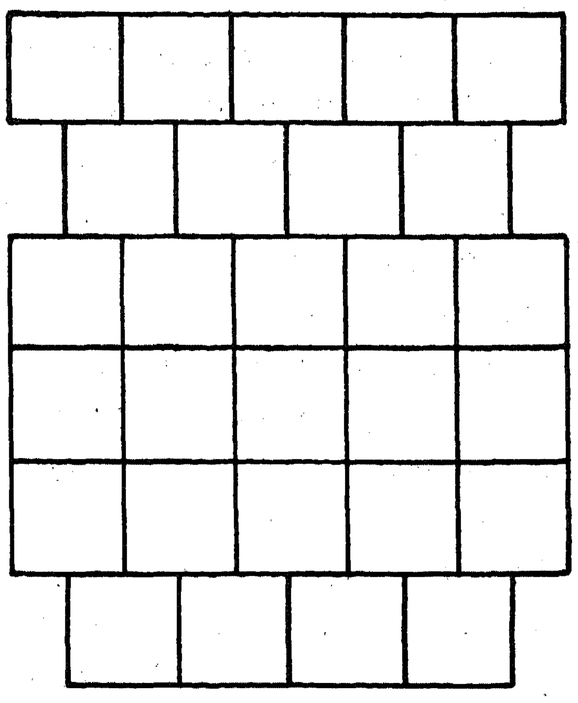
6. Coagulasereactie:

Typering dd.

Gebruikte fagen:

GROEP „I"	44	29	52	52A	79
	80	81	82	N	
GROEP „II"	3A	3B	3C	55	71
	6	7	47	53	54
GROEP „III"	70	73	75	77	77A
	42E	44B	187	42D	

Resultaat van het onderzoek:



Verklaring der tekens:

= volledige lysis
= onvolledige lysis, doch samenvloeiende plaques
= meer dan 50 plaques
= 15 à 50 plaques
= 4 à 15 plaques
. . . . . = 1,2,3 plaques

Bovendien wordt rekening gehouden met de duidelijkheid der reactie.

figuur 4.

De mogelijke variaties in het typeringsresultaat, bleken te verdwijnen wanneer men de stammen op dezelfde dag met dezelfde phaagpreparaten typeert. Daarom werd dan ook de datum van de typering vermeld.
De phaagsuspensies werden gebruikt in de zogenaamde Routine Test Dilution (R.T.D.), dit is de verdunning die nog juist complete lysis geeft van de propagatiestam. Wanneer stammen met deze methode geen sterke reacties (= meer dan 50 plaques) vertoonden, werden deze stammen opnieuw getypeerd met phagen in een concentratie 1000 x R.T.D. Dit werd dan achter de formule van het phaagpatroon vermeld. Sommige stammen gaven dan nog geen waarneembare reacties, deze werden niet-typeerbaar genoemd (N.T. 1000 x R.T.D.).
Het schema van het phaagpatroon werd door ons in de tekst weergegeven door de phagen, welke reactie gaven, in volgorde van het schema op te sommen. Door middel van verticale strepen werd de sterkte der phaagreacties aangegeven: ...../...../..... (Ruys en Borst, 1959). Voor de strepen werden de phagen vermeld, welke een volledige lysis gaven, tussen de strepen de phagen met onvolledige lysis en achter de strepen de phagen, welke minder dan 50 plaques te zien gaven.
In samenwerking met de bacterioloog Dr. A.G.M. Huysmans-Evers, hebben wij op bovenstaande wijze van alle door ons onderzochte staphylococcen het phaagpatroon opgesteld.
Op grond van dit phaagtype hebben wij getracht epidemiologische verbanden aan te tonen door phaagtypen van verschillende herkomst te vergelijken. Om zulk een verband of een bepaalde besmettingsweg met enige mate van zekerheid aan te tonen, werd de mogelijkheid van een ziekenhuiskruisinfectie van elke patient in de beoordeling betrokken.