

Handboek medische bacteriologie

Johan Van Eldere

Acco Leuven / Den Haag

Woord vooraf

Het eerste contact met medische bacteriologie is meestal verwarrend. Zovele complexe namen van bacteriën die enerzijds dezelfde infecties veroorzaken en anderzijds toch weer van elkaar verschillen, zoveel verschillende antibiotica met verschillende toepassingsgebieden. Hoe al die informatie verwerken tot kennis die bruikbaar is bij de behandeling van patiënten? Hoewel een goed geheugen altijd een voordeel is, is in dit boek gepoogd om zoveel mogelijk te vertrekken vanuit algemene principes en logische verbanden te leggen.

Hoofdstukken 1 tot 3 omvatten de algemene opbouw en het functioneren van bacteriën. De morfologische opbouw van bacteriën is nog steeds het voornaamste middel om de bacteriën te classificeren in groepen. In vele tekstboeken wordt deze zogenaamde taxonomische classificatie van bacteriën gebruikt als leidraad bij de bespreking van bacteriën. Een taxonomische classificatie van bacteriën is veeleer interessant voor de microbioloog voor wie de bacterie zelf het vertrekpunt is, maar minder voor een clinicus die vertrekt van een patiënt met een infectie. Daarom is in dit boek gekozen voor de infectie als leidraad voor de bespreking van de medisch belangrijke bacteriën. De morfologie van bacteriën en het functioneren van bacteriën zijn echter essentieel om te begrijpen hoe bacteriën infecties veroorzaken en hoe we ze kunnen bestrijden.

In hoofdstukken 4 tot 6 worden de antibacteriële bestrijdingsmethoden besproken. Vooral de antibiotica komen om vanzelfsprekende redenen uitgebreid aan bod. Voor de antibiotica werd de klassieke opdeling – op basis van werkingsmechanisme en vervolgens op basis van structuur – gebruikt. De nadruk werd gelegd op werkingsmechanismen en resistentiemechanismen, maar de belangrijkste structurele en farmacokinetische eigenschappen worden eveneens vermeld.

Vervolgens worden de voornaamste medisch belangrijke bacteriën besproken. Hierbij werd niet gestreefd naar volledigheid, maar worden die bacteriën besproken die het frequentst voorkomen en die tevens illustratief zijn voor de wijze waarop bacteriën infecties veroorzaken. De onderverdeling van de bacteriën gebeurt op basis van de manier waarop de bacteriën meestal ons lichaam binnendringen en dus van het soort infecties dat ze meestal veroorzaken. Uiteraard kunnen bepaalde bacteriën op meer dan één wijze ons lichaam binnendringen en meer dan één type infectie veroorzaken. In die gevallen werd de keuze gemaakt om die bacteriën bij de ene of andere groep infecties onder te brengen. Op het einde van elk hoofdstuk bevindt zich een kort begeleidend deel. Dat deel is toegevoegd om de voornaamste concepten uit elk hoofdstuk te benadrukken en laat de lezer toe om de mate waarin hij het hoofdstuk heeft verwerkt, te evalueren.

Hoofdstuk 7 behandelt twaalf bacteriën die meestal infecties veroorzaken via de respiratoire slijmvliezen. Er wordt gestart met de bacteriën die vooral infecties van de bovenste luchtwegen veroorzaken, vervolgens bacteriën die vooral bekend zijn als oorzaak van infecties van de lage luchtwegen en ten slotte bacteriën die vooral invasieve infecties veroorzaken via de luchtwegen. De nadruk ligt telkens op de microbiële pathogenese van de infecties, dat wil zeggen: op de wijze waarop de bacterie de afweersystemen van de gastheer tracht te ontwijken en aanleiding geeft tot bepaalde symptomen. Het samenbrengen van bacteriën die alle luchtwegen infecteren, maakt het eenvoudiger om de algemene gelijkenissen en de individuele verschillen in al deze infectiestrategieën te begrijpen.

In hoofdstuk 8 worden twaalf bacteriën besproken die meestal infecteren via de slijmvliezen van de maag-darmtractus. Zoals voor alle bacteriën krijgt de pathogenese veel aandacht en wordt getracht om het ontstaan en de symptomen van de infectie logisch te verbinden met virulentiefactoren van de bacterie. Bij de besprekingen van de verschillende kiemen worden – waar gepast – tevens interessante items uit de fundamentele bacteriologie geïntroduceerd, zoals pathogeniciteitseilanden of moleculaire imitatie.

Hoofdstukken 9 en 10 behandelen respectievelijk zeven bacteriën die via wonden in de huid infecteren en drie bacteriën die vooral gekend zijn als bacteriën die via de genitale slijmvliezen infecteren. Hoofdstuk 11 ten slotte behandelt kort negen bacteriën die gekend zijn als oorzaak van opportunistische infecties. Het belang van deze infecties neemt toe in onze ziekenhuizen en een vermelding van deze bacteriën mocht bijgevolg niet ontbreken.

Velen hebben bewust of onbewust bijgedragen tot dit boek. In het bijzonder wens ik Jef Anné en Jan Verhaegen te bedanken.

Bij dit boek hoort ook een digitale verrijking. In de tekst wordt er met icoontjes verwezen naar het online leerplatform Sofia.



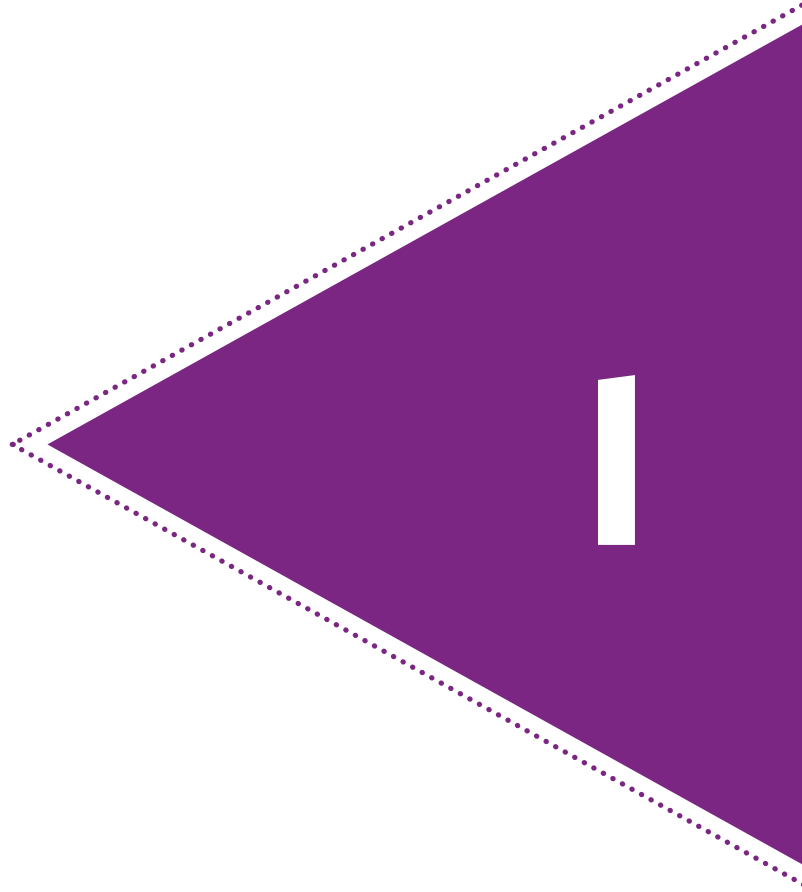
Bij de basisleerstof vind je tabellen en beeldmateriaal die verduidelijking bieden bij de tekst. Dit is verplichte leerstof.



De verdieping bestaat uit interessante extra leerstof.



Tot slot kun je op het einde van ieder hoofdstuk je kennis testen.



Morfologie en taxonomie van bacteriën

I. Inleiding: indeling van de levende wezens

Alle levende wezens zijn opgebouwd uit cellen. Een cel is een onafhankelijke eenheid die in staat moet zijn om alle of bijna alle functies nodig voor het overleven van de cel uit te voeren.

Cellen kunnen geclassificeerd worden in twee grote groepen: **prokaryote cellen** en **eukaryote cellen**. Bacteriën zijn eencellige prokaryoten; fungi, protozoa, wormen, planten en dieren zijn een- of multicellulaire eukaryoten.

Prokaryote cellen onderscheiden zich qua celmorfologie van eukaryote cellen op een aantal essentiële punten. Deze verschillen in celmorfologie weerspiegelen zich echter ook in een aantal belangrijke verschillen op het vlak van het functioneren van de cel in het algemeen.



Wil je meer weten over de geschiedenis van de **onderverdeling van de levende wezens** op basis van de aan- of afwezigheid van een celkern? Kijk dan op Sofia.

2. De opbouw van de bacteriële cel

We kunnen de bacteriële cel onderverdelen in de volgende vier delen:

- cytoplasma met vrij DNA, zonder organellen;
- cytoplasmamembraan;
- celwand;
- uitwendige structuren: kapsel, pili en flagellen.

Daarnaast kunnen sommige bacteriën zich omvormen tot endosporen.



Je vindt een **schematische weergave** van de onderverdeling van de **bacteriële cel** op Sofia.

2.1 Het cytoplasma bevat vrij DNA, ribosomen en soms reservegranula



In tegenstelling tot eukaryote cellen is **het cytoplasma** van bacteriën vrij eenvoudig van opbouw. Het **DNA** neemt ongeveer 10% van het volume van de cel in; de regio van

het cytoplasma die het DNA bevat, wordt soms nucleoid genoemd. Het DNA is niet gebonden aan histonen en vormt geen nucleosomen, maar het is wel opgerold (supercoiling). Vooral bij gramnegatieve bacteriën vinden we in het cytoplasma ook plasmiden; dat zijn kleine circulaire stukken DNA.

Daarnaast vinden we in het cytoplasma ook **ribosomen**. De bacteriële ribosomen zijn opgebouwd uit een 30S en een 50S subunit die samen een 70S ribosoom vormen. Bacteriële ribosomen verschillen bijgevolg van eukaryote 80S ribosomen en kunnen daarom worden gebruikt als doelwit voor antibacteriële producten. Het grote aantal ribosomen in het cytoplasma samen met het DNA maken het cytoplasma zeer basofiel.

Naast DNA en ribosomen vinden we in het cytoplasma soms nog onregelmatige **granula** van reservemateriaal, bijvoorbeeld glycogeen.

2.2 Het cytoplasmamembraan: opname van voedingsstoffen, metabool en biosyntheseorgaan en mitoseapparaat

Het cytoplasmamembraan van bacteriën heeft een fosfolipidendubbellaagstructuur zoals we die vinden bij de eukaryoten, maar bevat daarentegen geen sterolen. De afwezigheid van sterolen maakt het bacteriële cytoplasmamembraan minder rigide en stevig. In tegenstelling tot het cytoplasma zijn het cytoplasmamembraan en de uitwendige structuren van bacteriën complexer dan bij eukaryoten. Het cytoplasmamembraan van bacteriën moet immers functies overnemen die bij eukaryote cellen verdeeld zijn over verschillende celorganellen. Die functies zijn:

- **transport:** opname van voedingsstoffen en uitstoten van schadelijke stoffen;
- **metabolisme:** energieproductie, afbraak en biosynthese;
- **mitose.**

2.2.1 Transport

De eerste en voornaamste rol van het membraan is de *opname van voedingsstoffen uit het milieu*. Macromoleculen worden gewoonlijk afgebroken door enzymen in het periplasma of in het omgevende milieu, en de kleine afbraakproducten kunnen dan door het membraan getransporteerd worden. De beweging van stoffen doorheen het cytoplasmamembraan gebeurt ofwel passief (volgens een concentratiegradiënt) ofwel actief (tegen een concentratiegradiënt en met verbruik van energie onder de vorm van ATP).

Passief transport kan op de volgende wijzen:

- Via een eenvoudige diffusie tot de concentratiegradiënt is verdwenen: deze vorm van transport wordt gebruikt voor kleine moleculen zoals zuurstof, CO₂ en water.
- Via een zogenaamde gefaciliteerde diffusie worden grotere moleculen (zoals glucose) gebonden aan een membraanre carrierproteïne (transporter of permease) en na een vormverandering van de transporter vrijgezet aan de andere zijde van het membraan. Bij deze gefaciliteerde diffusie wordt geen energie gebruikt.

Actief transport is de meest gebruikte transportvorm en is nodig om een bacterie van de noodzakelijke voedingsstoffen te voorzien. Actief transport gebeurt via transportmoleculen of permeasen in het cytoplasmamembraan en vereist energie omdat het transport gebeurt tegen een concentratiegradiënt in.

Daarnaast beschikken vele bacteriën ook over eenvoudige tot complexe effluxpompen, waarmee schadelijke stoffen via een energievragend proces terug naar buiten kunnen worden gepompt. Deze effluxpompen spelen een belangrijke rol in het ontstaan van antibioticaresistentie.

2.2.2 Metabolisme

Naast een transportorgaan is het cytoplasmamembraan ook *de plaats waar het oxidatieve metabolisme plaatsvindt*. Op het cytoplasmamembraan vinden we immers de cytochromen. Het membraan neemt in de bacteriën dus de rol over van de mitochondriën in eukaryote cellen.

Buiten de afbraak vindt aan de binnenzijde van het membraan ook de *biosynthese* plaats van alle macromoleculen, zowel structurele moleculen (DNA, lipiden, proteïnen) als proteïnen bestemd voor secretie. Bacteriën scheiden grote hoeveelheden proteïnen uit, zoals degradatieve enzymen voor het opneembaar maken van voedingsstoffen, maar ook toxinen en andere virulentiefactoren.

2.2.3 Mitose

Het celmembraan fungeert eveneens als een *primitief mitoseapparaat*. Bacterieel DNA is vastgehecht aan het celmembraan; bij celdeling hechten het oude en het nieuwe chromosoom zich vast aan weerszijden van het ingroeierende septum zodat elke dochtercel één kopie van het chromosoom ontvangt.

2.3 De celwand geeft vorm, stevigheid, bescherming en helpt in de adherentie

Met uitzondering van de celwandloze *Mycoplasmata* vervult de celwand een beschermende functie en geeft vorm en stevigheid aan de bacterie. Door de relatieve zwakte van het prokaryote cytoplasmamembraan zouden bacteriën openbarsten door de hoge inwendige osmotische druk indien ze geen celwand zouden hebben. Ook de **vorm van de bacterie** (kok, staaf, vibrio, enzovoort) en de bescherming tegen toxische substanties zijn afhankelijk van de celwand.



Op basis van de opbouw van de celwand kunnen de bacteriën worden onderverdeeld in verschillende groepen. Een gemeenschappelijk element in de bacteriële celwand van bijna alle bacteriën is echter het peptidoglycaan.



Peptidoglycaan is opgebouwd uit lange ketens van aminosuikers, afwisselend N-acetylglucosamine en N-acetylmuraminezuur. Deze lange ketens zijn kruisverbonden met elkaar door korte peptidenbruggen zodat een stevig netwerk gevormd wordt. De basisstructuur van het peptidoglycaan is gelijk in alle bacteriën, hoewel er verschillen kunnen bestaan in de samenstelling van de dwarsverbindingen en het aantal dwarsverbindingen.

De basiseenheid van het peptidoglycaan bestaat uit een N-acetylglucosamine plus N-acetylmuraminezuur disacharide met een pentapeptidezijketen aan de N-acetylmuraminezuur aminosuiker. Deze basiseenheid wordt in het cytoplasma aangemaakt en gebonden aan een transmembranaire lipidencarrier (undecaprenol), die de basiseenheid doorheen het cytoplasmamembraan voert. Aan de buitenzijde van het cytoplasmamembraan wordt het disacharide aan de groeiende peptidoglycaanketen gekoppeld. In een eerste stap wordt het disacharide via een transglycosylase gekoppeld aan de polysacharideruggengraat van het peptidoglycaan. Ten slotte wordt via de peptidenzijketen een kruisverbinding tot stand gebracht met andere peptidenzijketens uit de peptidoglycaanlaag. Deze kruisverbinding wordt gekatalyseerd door enzymen die transpeptidasen worden genoemd (biosynthese van peptidoglycaan).



Je vindt meer informatie over **peptidoglycaan** op Sofia.

Bij groeiende bacteriën is er een constante aanmaak van nieuw peptidoglycaan en afbraak van bestaande peptidoglycaanketens. Dat gebeurt door enzymen die we autolysines noemen. De activiteit van autolysines bepaalt mee de vorm van de bacterie en is ook uiteindelijk verantwoordelijk voor het bacteriedodende effect van celwandsynthese-inhiberende antibiotica. De voortschrijdende verzwakking van de celwand ten gevolge van de blijvende inwerking van autolysine, terwijl er geen nieuwe celwand wordt aangemaakt ten gevolge van de blokkering van de transpeptidasen door antibiotica, leidt uiteindelijk tot het openbarsten van de cel.



Op Sofia leer je meer over de **interferentie van antibiotica met celwandsynthese**.

Zoals vermeld, verschilt de opbouw van de celwand bij verschillende bacteriën. Op basis van deze verschillen worden de bacteriën onderverdeeld in vijf groepen:

- grampositieve bacteriën;
- gramnegatieve bacteriën;
- zuurvaste bacteriën;
- spirocheten;
- bacteriën zonder celwand.

2.3.1 Grampositieve bacteriën



Grampositieve bacteriën worden zo genoemd omdat ze bij de zogenaamde gramkleuring de blauwe kleurstof behouden, ondanks toevoeging van een ontkleurend solvent (alcohol) (cf. 3.1 De gramkleuring en de classificatie van bacteriën). De celwand van de grampositieve bacteriën is opgebouwd uit vele op elkaar liggende lagen van **peptidoglycaan**. De peptidoglycaanlaag omgeeft de hele bacterie als een soort netwerk dat uit meerdere lagen bestaat en dat de bacterie vorm, stevigheid en bescherming geeft. Stevigheid omdat het de bacterie beschermt tegen lysis wanneer deze zich bevindt in een omgeving met een lagere osmotische druk. Bescherming tegen schadelijke uitwendige stoffen omdat de peptidoglycaanlaag werkt als een soort zeef die vele moleculen belet in contact te komen met het kwetsbare cytoplasmamembraan.

In de celwand komen ook nog andere bestanddelen voor, zoals **teichoïnezuren** en **lipoteichoïnezuren**. Teichoïnezuren zijn wateroplosbare polymeren opgebouwd uit ribitol- of glycerolresiduen verbonden door fosfodiesterbindingen. Het zijn bij grampositieve bacteriën algemeen voorkomende structuren die de celwand steviger maken en die functioneren als aanhechtingsplaats voor extracellulaire moleculen. Deze extracellulaire proteïnen kunnen bijvoorbeeld als adhesines dienen, waarmee de bacterie zich kan vastzetten op de slijmvliezen van de gastheer. Zodoende zijn het belangrijke virulentiefactoren. Teichoïnezuren zijn verankerd in de celwand, lipoteichoïnezuren in het celmembraan, en beide kunnen doorheen de peptidoglycaanlaag heen naar buiten steken. In sommige bacteriële soorten vinden we ook nog soortspecifieke componenten (C-polysachariden, M-proteïne, A-proteïne, enzovoort).

2.3.2 Gramnegatieve bacteriën



Gramnegatieve bacteriën worden zo genoemd omdat bij een gramkleuring de blauwe kleurstof ontkleurd wordt door toevoeging van alcohol (cf. 3.1 De gramkleuring en de classificatie van bacteriën). Gramnegatieve bacteriën hebben een complexere celwand.

Naast de **peptidoglycaanlaag** hebben gramnegatieven ook een **buitenste membraan** dat de voornaamste bescherming biedt tegen schadelijke invloeden uit de omgeving.

Zoals bij grampositieve bacteriën vinden we bij gramnegatieve bacteriën een **peptidoglycaanlaag** die de bacterie vorm en stevigheid geeft. Deze peptidoglycaanlaag verschilt echter van de peptidoglycaanlaag die we bij grampositieve bacteriën vinden. Naast een aantal verschillen in de chemische samenstelling is het voornaamste verschil dat bij gramnegatieven de peptidoglycaanlaag veel dunner is en minder dwarsverbindingen bevat. Hierdoor is ze ook minder stevig dan bij grampositieven en bezit ze niet de eigenschap van een beschermende zeef die ze bij de grampositieven heeft.

Boven op de peptidoglycaanlaag vinden we het buitenmembraan. De ruimte tussen het buitenmembraan en het cytoplasmamembraan noemen we de **periplasmatische ruimte**. In de periplasmatische ruimte vinden we naast de peptidoglycaanlaag ook een gelachtige oplossing van enzymen die een rol spelen in de voedselverwerking door het afbreken van macromoleculen in kleinere makkelijk absorbeerbare bestanddelen. In deze periplasmatische ruimte vinden we ook enzymen die antibiotica afbreken. Grampositieve bacteriën hebben geen periplasmatische ruimte en moeten gelijkaardige enzymen secreteren in de omgeving.

Het **buitenmembraan** is zoals het cytoplasmatische membraan opgebouwd uit een fosfolipidendubbellaag, maar verschilt qua samenstelling en eigenschappen van het cytoplasmamembraan. Belangrijk is vooral dat het veel bestendig is tegen schadelijke bestanddelen dan het cytoplasmamembraan. Dat is het gevolg van het feit dat de buitenste laag van deze dubbellaag niet alleen is opgebouwd uit fosfolipiden, maar bovendien ook grote hoeveelheden **lipopolysaccharide of LPS** bevat. LPS wordt enkel en alleen bij gramnegatieve bacteriën gevonden.



LPS bestaat uit drie delen. Het eerste deel wordt **lipide A** genoemd en verankert het LPS in de buitenste laag van het buitenmembraan. Lipide A bestaat uit een disaccharide waaraan korte ketens vetzuren en fosfaatgroepen gebonden zijn. Naast zijn rol als verankeringsmolecule voor LPS heeft lipide A ook nog andere biologische eigenschappen. Het is namelijk een krachtige stimulator van het immuunsysteem. In beperkte doses lokt het koorts uit; in hoge dosis kan lipide A leiden tot veralgemeende intravasculaire coagulatie, shock en zelfs dood. Lipide A wordt ook nog **endotoxine** genoemd.

Het tweede deel is verbonden aan het lipide A en wordt de **'core'** genoemd. Het bestaat uit een korte keten van suikers die meestal identiek zijn in éénzelfde soort bacteriën.

Het derde deel is verbonden aan de core en bestaat uit een lange keten van suikers. Deze keten is opgebouwd uit zich herhalende units van 4 tot 7 suikers. Het aantal units kan tussen 50 en 100 bedragen. De samenstelling van deze keten is verschillend voor verschillende species en zelfs in éénzelfde species. Deze keten wordt het **O-antigeen**

genoemd omdat ze specifieke antistoffen opwekt. Clones van bacteriën kunnen onderscheiden worden via serologische tests op basis van de verschillende samenstelling van het O-antigeen. Deze lange ketens bedekken het oppervlak met een hydrofiele laag en sluiten zo hydrofobe bestanddelen zoals galzouten uit.

Op deze wijze beschermen ze het oppervlak van de cel.

Om voedingsstoffen binnen te laten door het lipofiele buitenmembraan heen, beschikt dat niet over transportsystemen zoals het cytoplasmatische membraan, maar over speciale kanalen of **porines**, opgebouwd uit proteïnen (zogenaamde *outer membrane proteins* of OMP's). Deze poriën laten toe dat hydrofiele moleculen met een massa tot ongeveer 700 daltons de periplasmatische ruimte kunnen bereiken. Bepaalde essentiële bestanddelen die groter zijn dan de diameter van de poriën, worden via specifieke porines binnengebracht in de periplasmatische ruimte, bijvoorbeeld vitamine B₁₂. Hydrofiele antibiotica moeten ook via deze kanalen gaan om in de periplasmatische ruimte te raken. Veranderingen in deze porines kunnen dan ook bijdragen aan antibioticaresistentie.

2.3.3 Zuurvaste bacteriën



Enkele bacteriële soorten hebben zo'n dikke en complexe celwand dat deze celwand – eenmaal gekleurd – zelfs niet met zure oplossingen kan worden ontkleurd. De belangrijkste groep **zuurvaste bacteriën** zijn de mycobacteriën. **Mycobacteriën** maken een celwand waarin grote hoeveelheden van verschillende soorten wasachtige substanties voorkomen. De bescherming die deze celwand biedt, is zeer groot en maakt dat de bacteriën resistent zijn tegen vele toxische bestanddelen. Tegelijk is deze dikke celwand de oorzaak van de meestal trage groei van deze bacteriën.

De **celwand** van mycobacteriën is opgebouwd uit een dikke peptidoglycaanlaag die overgaat in een laag suikerpolysacchariden (D-arabinose en D-galactose). Bovenop deze arabinose-galactaanlaag zit een wasachtige laag mycolzuren en daarboven vinden we ten slotte nog een buitenste laag bestaande uit glycolipiden. Doorheen en tussen deze lagen vinden we lipiden, glycolipiden en peptidoglycolipiden (onder andere de zogenaamde *purified protein derivatives* of PPD, species-specifieke mycosides en koordfactor, cf. hoofdstuk VII, paragraaf 2.10 over *M. tuberculosis*). Lipiden maken 60% uit van de massa van de celwand, peptiden 15%.

2.3.4 Spirocheten



Spirocheten zijn een heterogene groep van spiraalvormige bacteriën. De opbouw van de celwand in spirocheten lijkt erg op die van gramnegatieven. Toch zijn ze microscopisch moeilijk zichtbaar na gramkleuring omdat ze zeer dun zijn (0,1 tot 0,3 µm). Een

peptidoglycaanlaag omgeeft het cytoplasmamembraan en rondom de peptidoglycaanlaag vinden we een buitenste membraan. Dit buitenste membraan lijkt op het buitenste membraan van gramnegatieven, maar bevat lipoproteïnen in plaats van LPS in het genus *Treponema* en *Borrelia* en een LPS-achtig glycolipide met verminderde endotoxine-activiteit in het genus *Leptospira*. Tussen de buitenste laag en de peptidoglycaanlaag vinden we de endoflagellen of axiale fibrillen die verankerd zijn aan beide uiteinden van de bacterie en zich longitudinaal rondom de bacterie winden, tot het midden van de bacterie. Daar overlappen ze met de endoflagellen, die vastgehecht zijn aan het andere uiteinde. Die endoflagellen zorgen voor de beweeglijkheid van de bacterie. Spirocheten delen via transversale splitsing.

2.3.5 Bacteriën zonder celwand

Van alle eubacteriën zijn de *Mycoplasmata* de enige die geen rigide peptidoglycaan-celwand bezitten. Omdat ze geen celwand hebben, kunnen deze bacteriën allerlei vormen aannemen en zijn ze niet gevoelig voor antibiotica die ingrijpen op de celwand. De afwezigheid van een rigide peptidoglycaanlaag zorgt er ook voor dat deze bacteriën zeer gevoelig zijn aan veranderingen in osmotische druk, zoals uitdroging. Deze bacteriën hebben een klein chromosoom en beperkte biosynthesemogelijkheden. Zo hebben ze nood aan sterolen om te groeien. Die sterolen worden geïncorporeerd in het cytoplasmamembraan en geven het een grotere stevigheid.

2.4 Kapsels, pili en flagellen

Bij sommige grampositieve en gramnegatieve bacteriën vinden we uitwendig van de celwand nog een in dikte variërende laag van polysachariden (bij sommige bacteriën polypeptiden) die we **kapsel of slijmlaag** noemen naargelang ze gedeeltelijk verankerd zit in het cytoplasmamembraan en gestructureerd voorkomt dan wel een eerder amorfe losse laag vormt. Een kapsel of slijmlaag is een van de voornaamste virulentiefactoren van bacteriën. Een kapsel beschermt de bacterie tegen fagocytose door de fagocyten van ons immuunstelsel. De meeste pathogene en alle bacteriën die invasieve infecties veroorzaken, vormen een kapsel of slijmlaag. Een kapsel kan ook de penetratie van antibiotica hinderen. Het kan ook de adherentie van bacteriën aan bijvoorbeeld tanden vergemakkelijken. De samenstelling van de kapsulaire polysachariden kan zelfs verschillend zijn tussen bacteriën van éénzelfde species. Het kapsulaire antigeen of **K-antigeen** kan bijgevolg gebruikt worden om onderscheid te maken tussen bacteriën van eenzelfde soort.

Door de celwand en het eventueel aanwezige kapsel heen steken bij vele bacteriën nog twee soorten van filamenten, die we pili (of fimbriae) en flagellen noemen. **Flagellen** zijn lange beweeglijke filamenten opgebouwd uit proteïnen (flagellines) en zijn verankerd

in het cytoplasmamembraan via een haak en een basaal lichaam. Ze komen enkel voor bij beweeglijke bacteriën. De energie voor de flagellaire beweging wordt geleverd door de membraanpotentiaal. Als gevolg van de schroefbewegingen van de flagellen kunnen de bacteriën zich voortbewegen. Externe structuren van bacteriën zijn sterke antigenen voor ons lichaam en flagellen maken daarop geen uitzondering. Flagellen worden ook **H-antigenen** genoemd. Vermits de antigene structuur van de flagellen kan verschillen van de ene bacterie tot de andere, kunnen bacteriën, ook indien ze tot dezelfde species behoren, soms worden onderscheiden op basis van de H-antigen specificiteit. We vinden flagellen zowel bij grampositieve als gramnegatieve bacteriën. Bacteriën kunnen een of meerdere flagellen hebben. Bij sommige bacteriën zijn alle flagellen gelokaliseerd aan een of beide uiteinden van de bacterie (uni/bipolair) en bij andere bacteriën zijn ze verspreid over het hele oppervlak (peritrich). Bewegelijkheid helpt de bacterie om zich te verplaatsen in de richting van voedingsbestanddelen of weg van mogelijke schadelijke bestanddelen. Dat verschijnsel noemen we **chemotaxis**. Vele pathogene bacteriën zijn beweeglijk.



Pili (ook fimbriae genoemd) zijn eveneens filamenteuze structuren. Ze zijn opgebouwd uit proteïne-subunits (pilin), zijn dunner dan flagellen en niet beweeglijk. Men vindt ze vooral bij gramnegatieve bacteriën en bij sommige grampositieve bacteriën. Op de tip van de pili vindt men gespecialiseerde structuren waarmee ze kunnen binden aan weefsel-specifieke moleculen. Bijgevolg spelen pili vooral een rol in de **adherentie** van bacteriën. Pili zijn meestal korter dan flagellen en ze komen meestal voor verspreid over de hele oppervlakte van de bacterie.



Je kan meer leren over **pili en de adherentie van gramnegatieve bacteriën** op Sofia.

Daarnaast spelen de pili ook nog een rol in de **virulentie** van de bacteriën. Zoals kapsels beschermen pili de bacteriën tegen fagocytose. Bovendien kunnen sommige bacteriën afwisselend een groot gamma pili – elk met een verschillend antigeen – aanmaken waardoor de aangemaakte antipili-antistoffen waardeloos worden en ons immuunstelsel verplichten steeds nieuwe antistoffen aan te maken.

Een speciale groep van pili zijn de zogenaamde **sex-pili**. Deze pili zijn langer dan de gewone pili en spelen een rol in de transfer van DNA door conjugatie. Niet alle bacteriën hebben sex-pili; de genetische informatie voor sex-pili bevindt zich meestal op plasmiden, die fertiliteitsfactor genoemd worden.

2.5 Endosporen



Wanneer voor bepaalde soorten bacteriën de groeiomstandigheden ongunstig worden, kunnen deze **endosporen** ontwikkelen. Sporenvormers komen enkel voor bij de aerobe *Bacilli*, de anaerobe *Clostridia* en enkele *Sarcinae* en *Streptomyces*. Deze organismen zijn

alle grampositief; de vorming van sporen is dus blijkbaar verbonden met het vermogen om een dikke celwand te maken.

Sporen zijn zeer **resistente, cryptobiotische verschijningsvormen** van een bacterie. Sporen weerstaan hitte en vrieskoude, droogte, straling en toxische chemicaliën. De weerstand van sporen tegen hoge temperaturen is een factor waarmee rekening gehouden moet worden bij sterilisatie. Voor de bacterie zelf is de weerstand tegen droogte waarschijnlijk het belangrijkste om langdurige ongunstige toestanden te kunnen overleven. Met de term '**cryptobiotisch**' wordt aangeduid dat sporen geen metabole activiteit vertonen, maar in gunstige groeiomstandigheden toch kunnen ontwaken en zich opnieuw omvormen tot dezelfde normale vegetatieve bacterie waaruit ze ontstonden. Bij de sporenvormende bacteriën onderscheidt men bijgevolg twee fasen: de **normale vegetatieve fase** en een **slaap- of gesporuleerde fase**. De overgang van de vegetatieve naar de gesporuleerde fase noemt men sporulatie. Het herstel van de vegetatieve fase uit een spore noemt men germinatie.

De spore is opgebouwd uit een kern en een integumentum. De **kern** bevat al het noodzakelijke opdat de bacterie terug zou kunnen beginnen te groeien. De kern bevat het chromosoom en kleine hoeveelheden van al wat nodig is om proteïnen te kunnen aanmaken, zoals ribosomen. Belangrijk is dat de kern bijna volledig gedehydrateerd is.

Het **integumentum** is opgebouwd uit verschillende lagen. Rondom de kern ligt het binnenste membraan, dat qua opbouw vergelijkbaar is met een cytoplasmamembraan. Daaromheen ligt de cortex. De cortex is een dikke, concentrisch opgebouwde, laminaire peptidoglycaanlaag. Rondom de cortex ligt opnieuw een membraan met vervolgens een keratineachtige proteïnelaag (inner coat), die aan de spore haar hoge resistentie tegen toxische chemicaliën geeft.

Ten slotte hebben sommige sporen nog een **exosporium** (outer coat): een losse proteïnen-lipidenlaag waarvan de functie niet gekend is.

2.6 Vergelijking tussen de morfologie van bacteriën en eukaryote cellen

Een vergelijking tussen bacteriën en eukaryote cellen toont dat prokaryote en eukaryote cellen verschillen op het gebied van grootte, kernstructuur, organisatie van het cytoplasma, opbouw van de ribosomen, opbouw van het cytoplasmamembraan en opbouw van de celwand.

In eukaryote cellen is het erfelijke materiaal bijeengebracht in een kern die afgebakend wordt door een membraan; in bacteriën daarentegen zweeft het DNA los rond in het

cytoplasma. Bovendien bevatten bacteriën één circulair chromosoom, terwijl eukaryote cellen meerdere chromosomen bevatten. Bacteriën kunnen daarnaast ook extrachromosomale DNA-elementen bevatten. In het cytoplasma van eukaryote cellen vinden we meerdere celorganellen, zoals endoplasmatisch reticulum, Golgiapparaat en mitochondriën. Deze organellen zijn alle omgeven door een eigen membraan. In bacteriën vinden we deze door een membraan omgeven organellen niet terug in het cytoplasma. De ribosomen van eukaryoten en prokaryoten verschillen. Dat komt tot uiting in de verschillende sedimentatiecoëfficiënten van deze ribosomen: 70S voor prokaryoten versus 80S voor eukaryoten. Het cytoplasmamembraan verschilt eveneens: het cytoplasmamembraan van prokaryoten met uitzondering van de *Mycoplasmata* bevat geen sterolen, dat van eukaryoten wel. Daarnaast bevat het membraan van prokaryoten in tegenstelling met dat van eukaryoten een grote verscheidenheid van proteïnen met belangrijke functies, zoals ademhaling of transport van voedingsstoffen. Daarentegen is het membraan van prokaryoten niet in staat tot endocytose of pinocytose. Bacteriën ten slotte hebben een complexe celwand; eukaryote cellen hebben slechts zelden een celwand, die dan nog eenvoudig van opbouw is, namelijk opgebouwd uit chitine of celulose.

Het eencellig zijn van bacteriën heeft eveneens bepaalde gevolgen. Vrijlevende eencellige organismen zoals bacteriën zijn zeer sterk afhankelijk van hun omgeving. Zo moeten bacteriën zich snel kunnen aanpassen aan de zeer wisselende beschikbaarheid van voedingsstoffen. Bijvoorbeeld darmbacteriën: meerdere malen per dag komen grote hoeveelheden voedingsstoffen ter beschikking, die dan echter ook zeer snel opgebruikt worden zodat periodes van overvloed afgewisseld worden met ogenblikken van schaarste.

Het overleven van bacteriën heeft vaak te maken met de mogelijkheid om in een bepaalde geschikte omgeving te kunnen blijven en niet weggevoerd te worden door lucht- of vochtstromen, zo bijvoorbeeld de mogelijkheid om zich vast te hechten aan de oppervlakte van tanden, urinewegen, intestinale tractus. Hiertoe hebben bacteriën structuren (pili, fibrillaire proteïnen) ontwikkeld die toelaten zich vast te hechten.

Bacteriën worden vaak geconfronteerd met schadelijke levensbedreigende omstandigheden zoals warmte, uitdroging, schadelijke chemische stoffen, DNA-beschadigende straling. De celwand en het buitenmembraan bieden aan de bacteriële cel bescherming tegen deze uitwendige schadelijke invloeden.

Het feit dat bacteriën zo klein zijn, maakt een zeer hoge metabole activiteit mogelijk, omdat hun oppervlakte-volumeratio hierdoor stijgt. Biochemische reacties worden immers gelimiteerd door diffusie, en hoe kleiner de afstanden, hoe sneller de reacties. Het metabole ritme van bacteriën is bijgevolg vele malen sneller dan dat van de eukaryoten en de delingstijd of de levensduur van een cel zal onder de meest gunstige omstandigheden niet langer zijn dan 15 minuten. Dat snelle metabolisme vereist een optimale

coördinatie tussen alle functies van de cel, maar verklaart ook het enorme potentieel van bacteriën voor adaptatie aan wisselende levensomstandigheden.



Op Sofia vind je meer informatie over **hoe klein bacteriën precies zijn**.

3. Classificatie van bacteriën

De classificatie van bacteriën gebeurde tot nu toe meestal op basis van een combinatie van morfologische en biochemische eigenschappen. Al enkele jaren beschikken we nu ook over krachtige genetische technieken die toelaten om bacteriën te klasseren op basis van genetische verwantschap. Meestal echter blijken deze twee manieren van classificatie (morfologisch-biochemisch en genetisch) overeen te komen.

In het klinische laboratorium zal meestal gebruik worden gemaakt van morfologische en biochemische eigenschappen om de bacterie te klasseren en bijgevolg te identificeren. Voor wat de morfologische eigenschappen betreft, zijn microscopisch onderzoek naar de **vorm van de bacterie** en **gramkleuring** de twee pijlers waarop deze classificatie berust. Tot voor kort was de volledige identificatie van bacteriën meestal een combinatie van morfologische karakteristieken en analyse van fysiologische eigenschappen via een cultuur van de bacteriën. Sinds enkele jaren is massaspectrometrie (MALDI/TOF) de meest gebruikte methode om bacteriën te identificeren.

3.1 De gramkleuring en de classificatie van bacteriën



De **gramkleuring** is genoemd naar een Deense microbioloog die rond de voorlaatste eeuwwisseling deze kleurtechniek op punt stelde. Ze neemt een centrale plaats in bij de classificatie van bacteriën omdat ze de meeste medisch belangrijke bacteriën via een eenvoudige kleuringstechniek kan onderbrengen in een van twee groepen, namelijk grampositieve of gramnegatieve bacteriën. Samengevat berust de gramkleuring hierop dat wanneer bepaalde bacteriën – die we **grampositief** noemen – ondergedompeld worden in een purperen kleurstof (kristalviolet) en daarna in jood (I₂), er een complex gevormd wordt dat door deze grampositieve bacteriën vastgehouden kan worden in de celwand, zelfs wanneer de bacteriën daarna gedurende korte tijd worden overspoeld met alcohol. Andere bacteriën – die we **gramnegatief** noemen – houden de kleurstof na spoelen met alcohol niet vast, ontkleuren dus en kunnen dan nogmaals gekleurd worden met een rode kleurstof (fuchsine) zodat de onder alcohol ontkleurde gramnegatieve bacteriën nu rood kleuren. Dat verschil in kleurreactie steunt op de

essentiële verschillen in de celwandstructuur tussen gramnegatieve en grampositieve bacteriën, zoals eerder besproken. Moderne genetische technieken waarmee de fylogenetische afstand tussen bacteriën kan worden gemeten, bevestigen dat er niet alleen een morfologisch verschil bestaat tussen grampositieve en gramnegatieve bacteriën, maar dat beide groepen ook genetisch aparte groepen vormen.

De overgrote meerderheid van de bacteriën die de oorzaak zijn van infecties bij de mens, behoren tot de grampositieve of gramnegatieve groep van bacteriën. Een aantal medisch belangrijke bacteriën kan niet goed of zelfs helemaal niet worden gekleurd met de gramkleuring. Deze bacteriën behoren tot de **zuurvaste** bacteriën, tot de spirocheten of tot de groep van bacteriën zonder celwand. De *Rickettsiae* en de *Chlamydiae* zijn eveneens medisch belangrijke groepen van bacteriën die – hoewel ze een celwandopbouw hebben die typisch is voor gramnegatieve bacteriën – niet worden gerekend tot de gramnegatieve bacteriën.

Zuurvaste bacteriën onderscheiden zich van grampositieve en gramnegatieve bacteriën doordat ze met de klassieke gramkleuring niet of onregelmatig kleuren. Om deze bacteriën selectief te kleuren moet een kleurmethode gebruikt worden waarbij de penetratie van de kleurstof vergemakkelijkt wordt. De Ziehl-Neelsen- en auraminekleuring zijn voorbeelden van dergelijke kleuringen. Na kleuring met een rode (Ziehl-Neelsen) of fluorescerende kleurstof (auramine) worden de bacteriën ontkleurd met een sterk zuur. De meeste (niet-zuurvaste) bacteriën verliezen snel de kleurstof; de zuurvaste bacteriën behouden echter de kleurstof. De noodzaak om beter penetrerende kleurstoffen te gebruiken en de zuurvastheid van die bacteriën zijn het gevolg van een andere opbouw van de celwand.

Spirocheten hebben een celwandopbouw die sterk lijkt op deze van gramnegatieve bacteriën. Toch kunnen ze omwille van hun geringe dikte niet worden gevisualiseerd met een lichtmicroscop en moeten er speciale technieken zoals donkerveldmicroscopie worden gebruikt.

De te geringe afmetingen zijn eveneens een reden waarom ook *Rickettsiae* en *Chlamydiae* via de microscoop niet zichtbaar zijn na gramkleuring. Voor de *Mycoplasmata* zijn er meerdere redenen waarom deze bacteriën niet zichtbaar zijn na gramkleuring; er is zowel het feit van de geringe afmetingen als de afwezigheid van een peptidoglycaanlaag.

De **vorm van de bacterie** kan variëren van bolvormig (zogenaamde cocci) tot staafvormig (bacilli) of een soort tussenvorm (coccobacillen). Kommavormig gebogen staafvormige bacteriën worden vibrio's genoemd; kurkentrekkerachtig gewonden staafvormige bacteriën worden ook spirocheten genoemd. Naast de morfologie van de individuele bacteriële cellen kan ook de schikking van de bacteriële cellen ten overstaan van elkaar bijkomende informatie verschaffen over de identiteit van de bacterie. Diplococci is de benaming voor ronde bacteriën die twee aan twee naast elkaar liggen, bijvoorbeeld de

Neisseria. Stafylokokken liggen in clusters (druiventrossen), streptokokken daarentegen liggen in een lange ketting achter elkaar.

3.2 Identificatie van bacteriën

In een klinische setting is een snelle identificatie van bacteriën nodig om een diagnose te stellen en een anti-infectieuze therapie te starten. Voor een zo volledig mogelijk begrip van de gastheer-bacterierelatie is het nodig om de identiteit van de bacterie en zoveel mogelijk van zijn algemene biologie te kennen omdat hierdoor nuttige informatie wordt verkregen over de mogelijke afloop van de infectie.

Identificatie van bacteriën kan gebeuren via niet-cultuurgebonden en cultuurgebonden technieken. Soms wordt een combinatie van beide gebruikt.

3.2.1 Cultuurgebonden technieken

Bijna alle bacteriën kunnen worden gekweekt aan de oppervlakte van **vaste voedingsbodems of in vloeibare voedingsbodems**. *Mycobacterium leprae* en *Treponema pallidum* zijn echter twee belangrijke menspathogenen die niet in vitro op vaste of vloeibare media kunnen worden gekweekt. Sommige intracellulair levende bacteriën, bijvoorbeeld *Chlamydia* en *Rickettsia*, kunnen enkel op celculturen worden gekweekt.

Er bestaat geen universeel medium waarop alle kweekbare bacteriën kunnen groeien. Anderzijds wordt er soms bewust naar gestreefd om het medium zo te maken dat er slechts één of enkele soorten op kunnen groeien, bijvoorbeeld door er substanties aan toe te voegen die remmend werken op de groei van niet-gewenste bacteriën. Men spreekt dan van **selectieve voedingsbodems**. **Rijke of niet-selectieve voedingsbodems** zijn voedingsbodems waarin vele voedingsstoffen aanwezig zijn zodat de meeste bacteriën erop kunnen groeien, bijvoorbeeld bloedbevattende voedingsbodems.

Bacteriën die in een cultuur zijn gegroeid, kunnen dan geïdentificeerd worden op basis van morfologische karakteristieken; via de gramkleuring kunnen de celmorfologie en de groepering van de cellen (ketens, paren...) worden bestudeerd. Ook de koloniemorfologie kan nuttige informatie geven. Het feit alleen al dat bacteriën groeien op bepaalde selectieve bodems, kan informatie geven over de identiteit van de bacterie. Meestal moet men echter een beroep doen op bijkomende tests om de bacterie volledig te identificeren. Die bijkomende tests waren tot voor enkele jaren vooral biochemisch, waarbij de metabole eigenschappen van de bacterie werden onderzocht. Sinds enkele jaren gebruikt men in de klinische labo's voornamelijk massaspectrometrie om bacteriën te identificeren. Die techniek wordt meestal aangeduid onder de naam **MALDI/TOF**. MALDI/

TOF is een afkorting voor *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight*. Het is een techniek waarmee proteïnen en polypeptiden kunnen worden geanalyseerd. Een kolonie van een te onderzoeken bacteriestam wordt direct op een plaatje uitgestreken en ingebed in een speciale matrix. De massaspectra die worden gegenereerd door het apparaat, worden geanalyseerd door speciaal voor dit doel ontworpen software en vergeleken met een groot aantal bestaande profielen. De identificatie van de naam van het genus (bijvoorbeeld: *Escherichia*) en meestal ook van de species (bijvoorbeeld: *coli*) gebeurt veel sneller, preciezer en goedkoper dan met de vroegere methoden.

3.2.2 Cultuuronafhankelijke identificatietechnieken

Cultuuronafhankelijke technieken die gebruikt kunnen worden voor de identificatie van bacteriën, zijn: microscopie, detectie direct op het staal van microbiële antigenen via veelal monoclonale antistoffen, detectie van genetisch materiaal specifiek voor een bacteriële soort, bijvoorbeeld door PCR. Het gebruik van PCR biedt een aantal voordelen: vooral de snelheid waarmee een resultaat kan worden verkregen (enkele uren), is een belangrijk voordeel. Deze tests vinden geleidelijk aan ingang in de klinische microbiologie. Een nadeel is echter de hoge prijs van deze tests.

Ten slotte mag men niet vergeten dat, naast de identificatie van bacteriën, het voor de behandeling ook belangrijk is een **antibiogram** te hebben, dat wil zeggen: een overzicht van de gevoeligheid of resistentie van de bacterie tegen verschillende antibiotica. Een antibiogram wordt opgemaakt aan de hand van het al of niet groeien van de bacterie in aanwezigheid van verschillende concentraties van de te testen antibiotica.

3.3 Classificatie van bacteriën in subspecies, species en genera

De **taxonomie** van bacteriën, dat is de classificatie van bacteriën, gebeurt volgens een systeem dat voor alle levende wezens wordt gebruikt en waarvan de fundamentele eenheid de species is. Een exacte definitie van de term 'species' voor bacteriën is bijna onmogelijk. Meestal wordt een **bacteriële species** gedefinieerd aan de hand van een aantal gemeenschappelijke fenotypische eigenschappen die bij de identificatie van de bacteriën worden gebruikt. Nauw verwante species worden gegroepeerd in een **genus**, nauw verwante genera worden op hun beurt samengebracht in een **familie**, families in ordes, ordes in klassen, klassen in divisies (phyla) en ten slotte worden alle levende wezens ondergebracht in koninkrijken of domeinen. Op die wijze geeft de classificatie van de bacteriën ook een maat voor de fylogenetische verwantschap van bacteriën.

Bacteriën worden volledig geïdentificeerd aan de hand van twee namen, waarvan de eerste het genus weergeeft en de tweede de species. Zo behoort *Staphylococcus aureus* tot het genus 'Staphylococcus' en de species 'aureus'. Anderzijds kunnen species nog worden onderverdeeld in **subspecies** of **typen**. De onderverdeling in typen kan berusten op faaggevoeligheid (faagtypes), op antigene eigenschappen (serotypes), op kleine verschillen in metabole activiteit (biotypes) of op genetische analyse, waarbij specifieke verschillen in bepaalde genen worden gezocht. Een stam is een reïncultuur van nakomelingen van één bacterie.



De **classificatie van bacteriën** is er echter niet enkel en alleen om de evolutionaire verwantschap aan te tonen tussen verschillende soorten van bacteriën, maar is op de eerste plaats ook een instrument dat gebruikt wordt voor de identificatie van medisch belangrijke bacteriën.



De **classificatie van bacteriën** is nog niet definitief. Meer informatie over de varianten vind je op Sofia.



Oefen je kennis over dit onderdeel op Sofia.