

# Klasyka zawsze modna

nie zapominajmy o klasycznych metodach  
mikrobiologicznych

Alicja Kuch



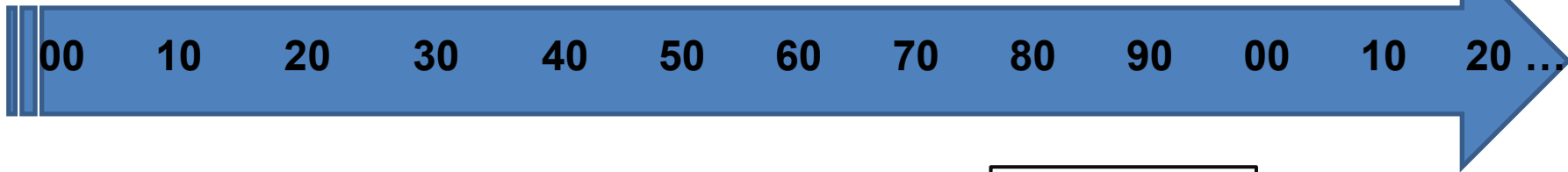
Krajowy Ośrodek Referencyjny  
ds. Diagnostyki  
Bakteryjnych Zakażeń  
Ośrodkowego  
Układu Nerwowego



wiek XIX

wiek XX

wiek XXI



mikroskopia  
 metody hodowlane.....

IEA

FISH

PCR / Seq  
 podłoża  
 chromogenne

MS  
 WGS  
 ...

**„OMIC’s gold age”**

- genomics
- proteomics
- transcriptomics
- .....CULTUROMICS

# Metody klasyczne vs „nowoczesne”

	Metody „nowoczesne”	Metody klasyczne
Koszt początkowy	często bardzo wysoki; niższy w trakcie użytkowania	niski początkowy i niski w trakcie użytkowania
Szybkość badania	„real time” /minuty/godziny	Minuty/godziny/dni/ tygodnie
czułość	wysoka (VBNC –viable but non-culturable)	często niska
Wymagania dotyczące wykonania (sprzęt/pracownicy)	niskie	często wysokie (doświadczenie....)

serotypowanie, PCR, hybrydizacja, PFGE, MLVA,  
sekwencjonowane, wykrywanie genów oporności/wirulencji



Whole-genome-sequencing

**WGS**

*„Jeden, by wszystkimi rządzić,  
Jeden, by wszystkie odnaleźć...”*



**In science, read, by preference, the newest works; in literature, the oldest. The classic literature is always modern.**



**Edward G. Bulwer-Lytton**  
English Novelist

1803 - 1873

QUOTEHD.COM

**Ale.....**

# Diagnostyka mikrobiologiczna - Metody

## Hodowlane

- Identyfikacja
- Wrażliwość
- Typowanie serologiczne
- Typowanie molekularne

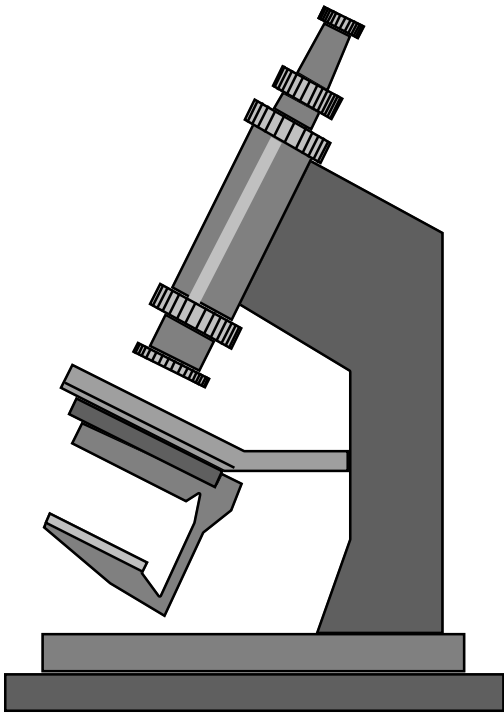
## Niehodowlane

- Preparat
- Wykrywanie specyficznych sekwencji DNA oparte na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)
- Sekwencjonowanie wybranych genów
- WGS

## Klasyczne / tradycyjne / konwencjonalne

- Mikroskopia
- Hodowla
- Wykrywanie antygenów, Serologia
- Biochemia

# Mikroskopia



**preparat bezpośredni (pmr)**

## **Barwienie metodą Grama**

**Barwienie błękitem metylenowym**

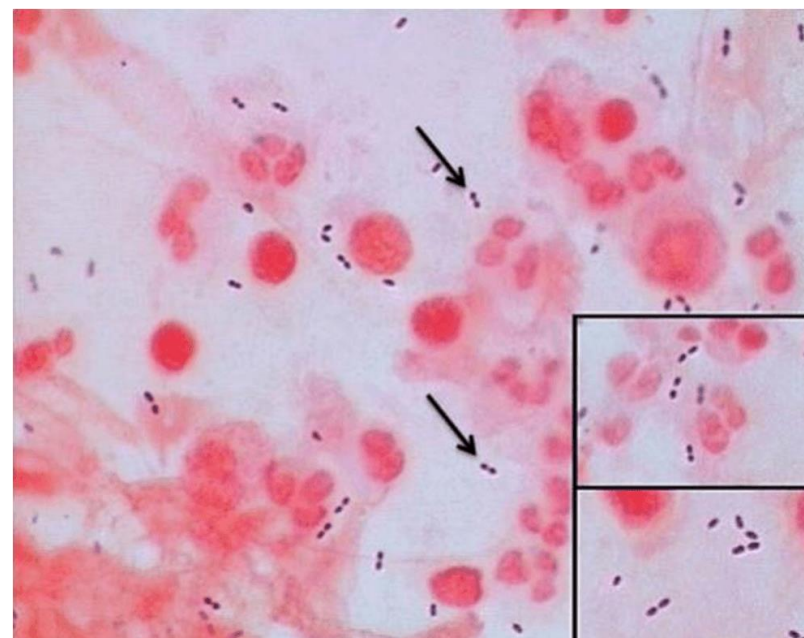
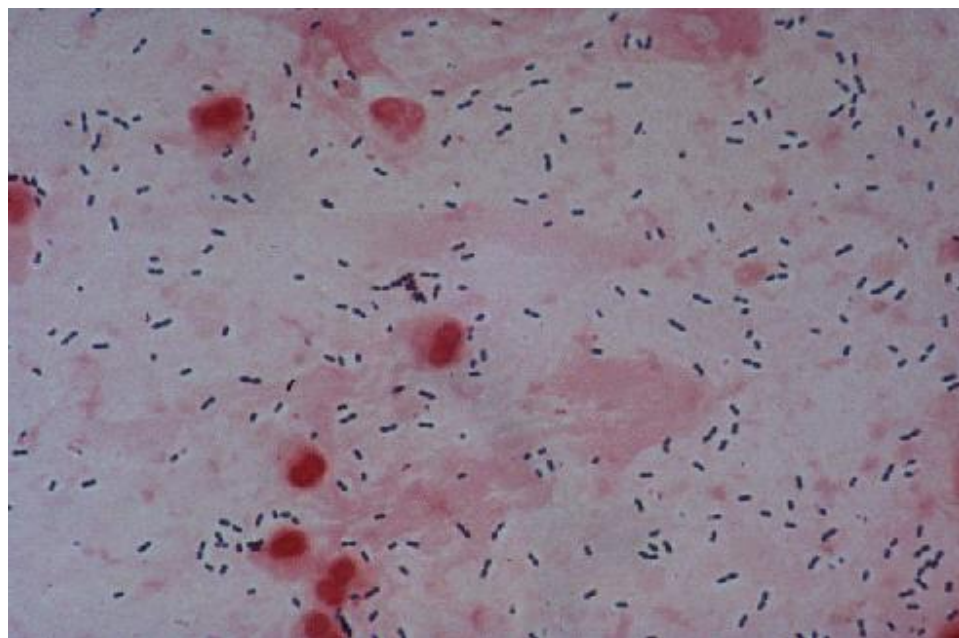
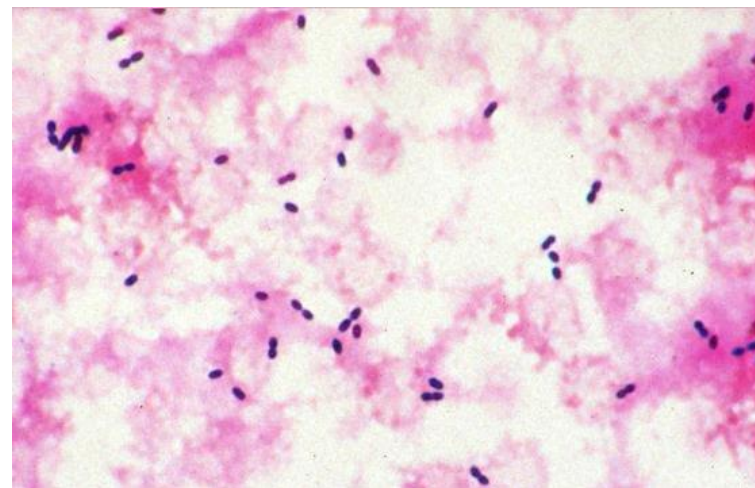
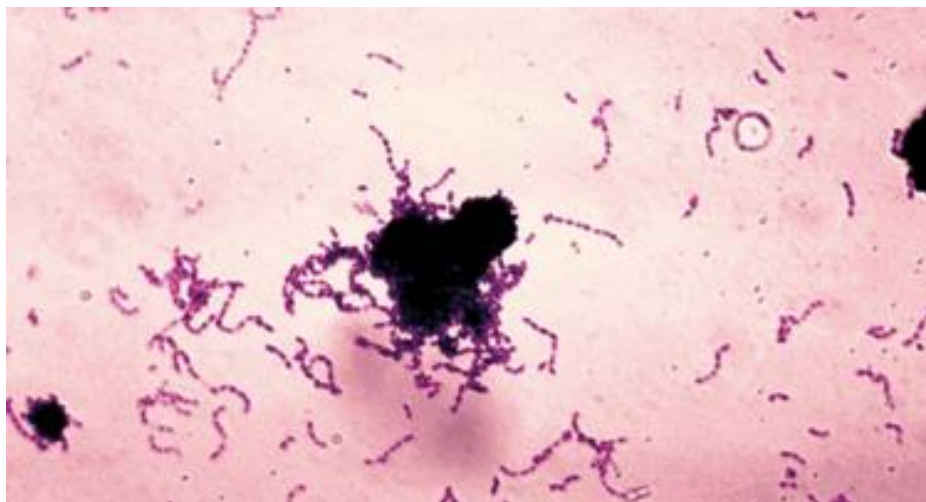
**Barwienie oranżem akrydyny**

# Barwienie metodą Grama - zalety

- 75-90% pozytywnych hodowli PMR jest pozytywne w tym barwieniu
- Ukierunkowanie terapii
- Szybkie, łatwo dostępne badanie, niski koszt
- Po przeszkoleniu każdy może je wykonać
- „gold standard” diagnostyka pasożytów (malaria) ale w większości przypadków stanowi diagnozę wstępną



# Barwienie Gram



# Wykrywanie antygenów

- testy lateksowe
- surowice diagnostyczne



# Testy lateksowe - zalety

- **Bardzo szybka identyfikacja czynnika etiologicznego również bezpośrednio z materiału klinicznego**
- **Test prosty w wykonaniu i interpretacji**
- **Możliwa identyfikacja czynnika etiologicznego nawet po zastosowaniu leczenia przeciwbakteryjnego, kiedy wyniki hodowli są zazwyczaj ujemne (wykrywaniu antygenów także z uszkodzonych i zabitych bakterii)**
- **nie mogą być stosowane jako substytut hodowli bakteryjnej!!!**

# Serotypowanie

## *Streptococcus pneumoniae*



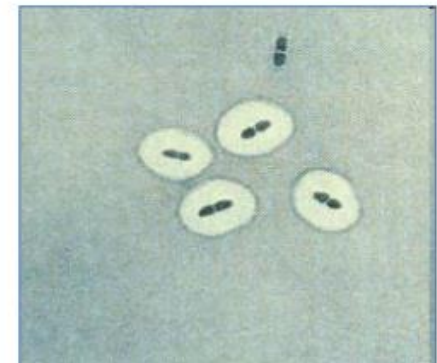
➤ **Quellung reaction** (reakcja pęcznienia otoczek)

Pierwszy raz opisana w **1902** przez niemieckiego uczonego Freda Neufelda; Quellung niemieckie słowo oznaczające „pęcznienie”

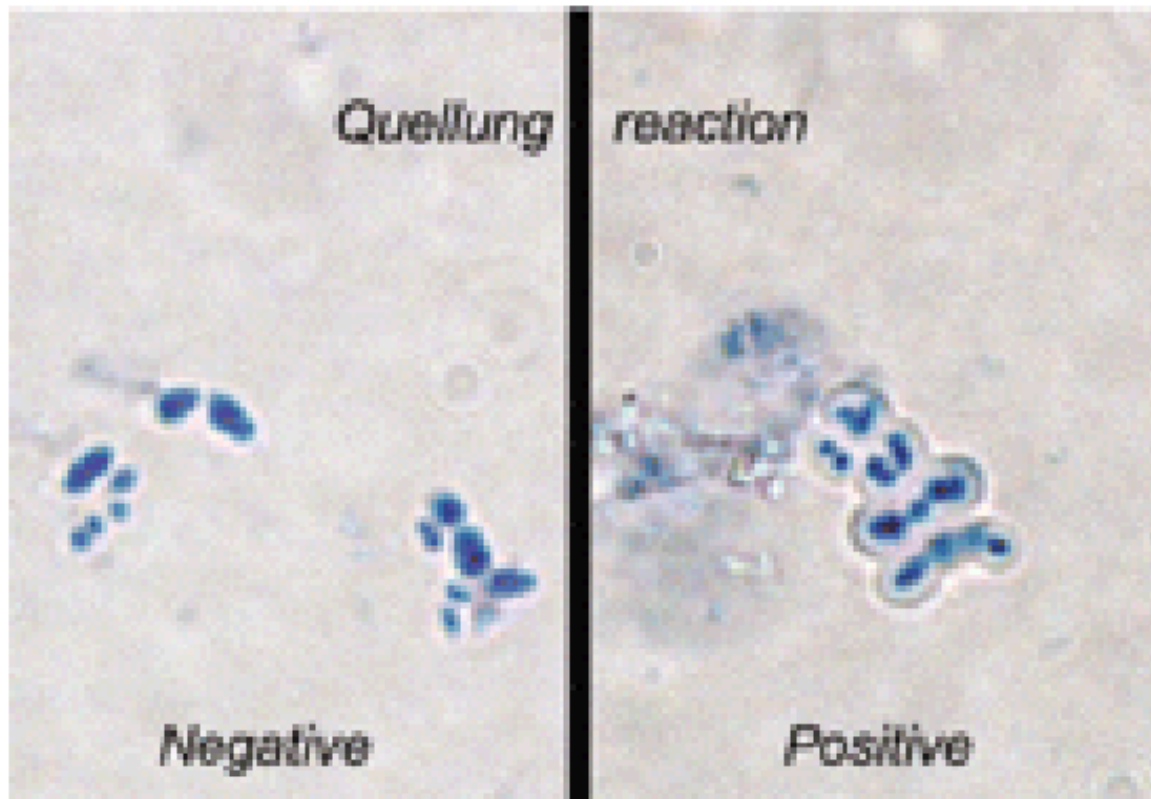
➤ **1940s** the *Streptococcus* Unit at Statens Serum Institute, Denmark, wyprodukowanie diagnostycznych surowic pneumokokowych i ich wprowadzenie do sprzedaży

# Quellung reaction (reakcja pęcznienia otoczek)

- „gold standard”, wysoce specyficzny test
- „pęcznienie otoczki” jest wynikiem reakcji polisacharydu otoczki bakteryjnej z specyficznymi przeciwciałami
- badanie polega na wymieszaniu oczka ezy kolonii bakteryjnych z równą ilości poszczególnych surowicy, a następnie zbadani pod powiększeniem 1000X –obserwacja ”pęcznienia otoczek” (mikroskop kontrastowo-fazowy)
- Jeśli reakcja jest pozytywna, otoczka się (wygląda na spęczniałą)

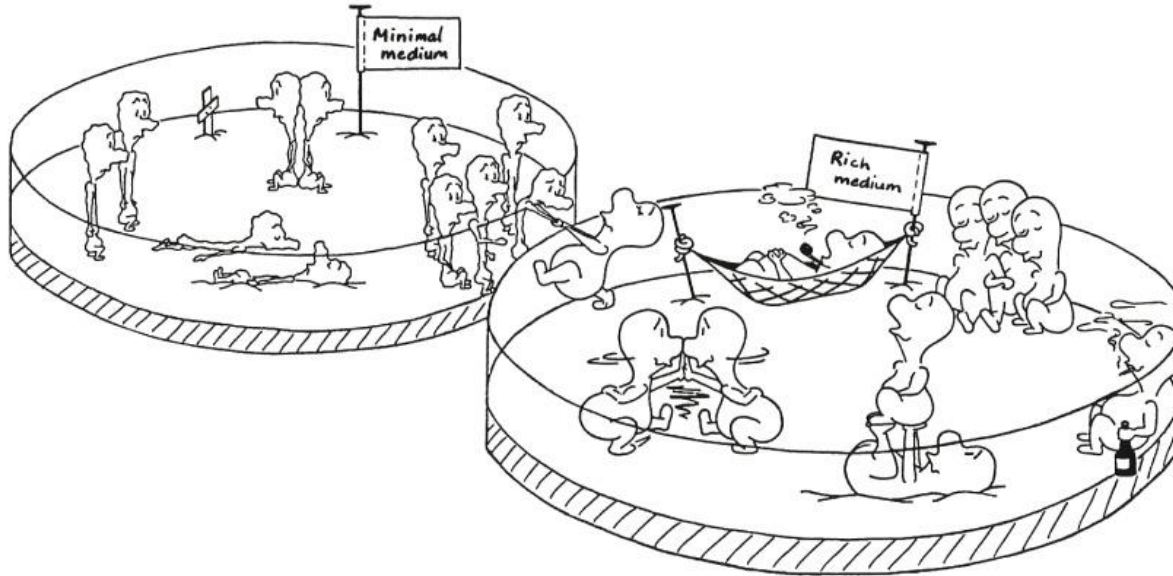


## ***S.pneumoniae* Quellung reaction (capsular swelling)**



Po reakcji pneumokoka z odpowiednią surowicą, komórki bakteryjne powiększają się, wydaje się być otoczony aureolą

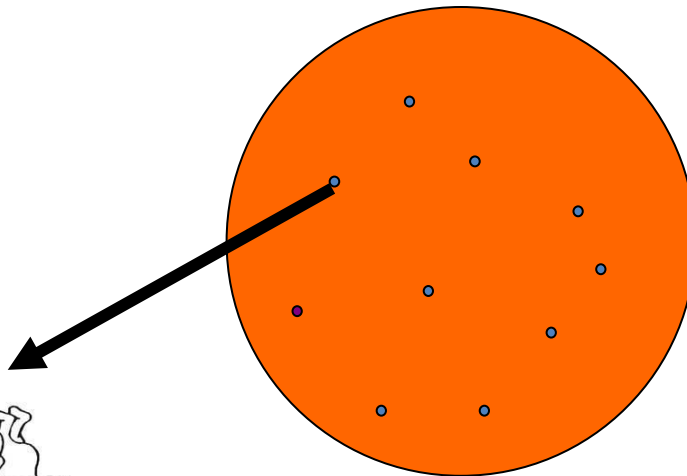
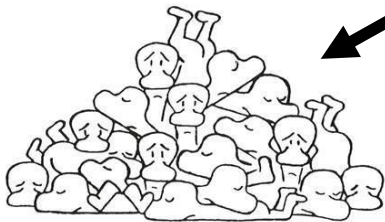
# HODOWLA



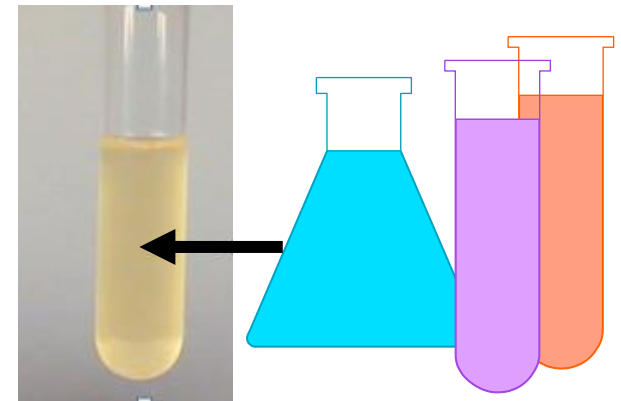
- Podłoża:
- wzbogacone
  - różnicujące,
  - selektywne
  - chromogenne

- Podłoża:
- stałe
  - płynne

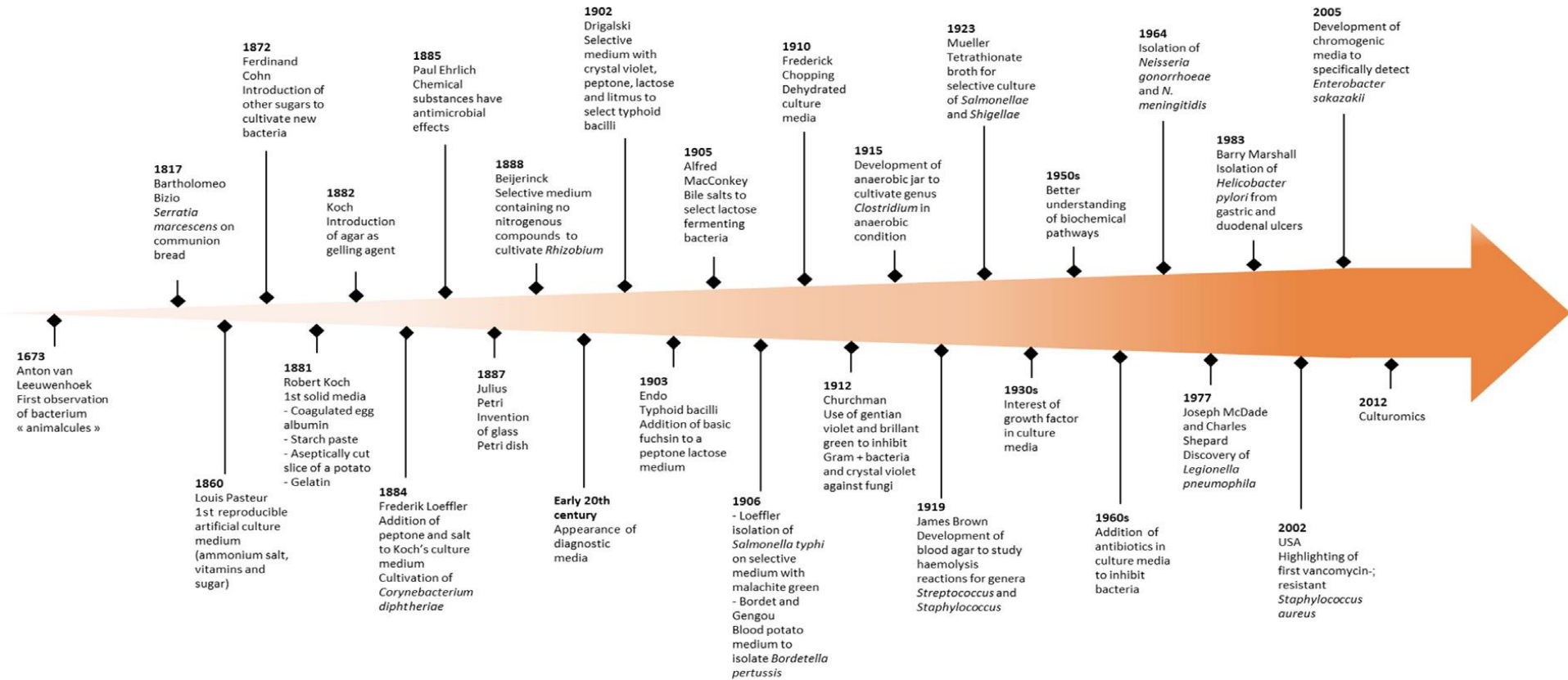
**Kolonia  
bakteryjna**



**Colony forming  
units  
(CFU/ml)**



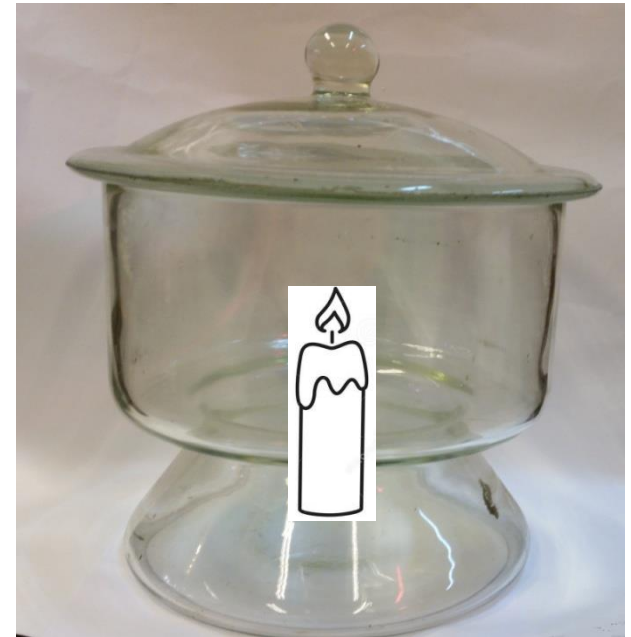
# Ewolucja pożywek hodowlanych od pierwszej hodowli bakteryjnej (1860) do „CULTUROMICS”





# HODOWLA

eksykator



# The Rebirth of Culture in Microbiology through the Example of Culturomics To Study Human Gut Microbiota

Jean-Christophe Lagier, Perrine Hugon, Saber Khelaifia, Pierre-Edouard Fournier, Bernard La Scola, Didier Raoult

Aix Marseille Université, URMITE, UM63, CNRS 7278, IRD 198, INSERM 1095, Marseille, France

## **Culturomics – hodowla i identyfikacja bakterii z zastosowaniem różnych warunków hodowli z użyciem selektywnych i/lub wzbogaconych podłoży w połączeniu z szybką identyfikacją MALDI-TOF MS**

- Metody molekularne wykrywają bakterie obecne w stolcu ludzkim w stężeniu  $10^6$  cfu/ml kału pomijając populacje umniejsz ale potencjalnie patogenne, np. *S. typhi*, *Yersinia enterocolitica* (obecnie w ilościach  $< 10^5$  cfu/ml )
- „Non-cultivable species”
- Badano 3 próbki kału
- **Culturomics:** zastosowano 212 różnych warunków hodowli : wzbogacanie pożywek i warunki hodowli; przeanalizowano 32 500 koloni metodą MALDI-TOF (340 różnych gatunków : 174 nigdy nie opisane); rekordowa liczba bakterii wyhodowanych z jednego stolca (219 gatunków)
- **Pirosekwencjonowanie 16S rDNA** tylko 51 gatunków zgodnych z 340 wyhodowanymi (culturomics zwiększyła o 30% reperytuar mikrobiologiczny ludzkiego jelita wykryty technikami mikrobiologicznymi)

## Culturomics: a new approach to study the human microbiome

**G. Greub**

*Institute of Microbiology, University Hospital Centre and University of Lausanne, Lausanne, Switzerland*

*E-mail: gilbert.greub@chuv.ch*


**TABLE I.** Comparison between metagenomics and culturomics

	Metagenomics	Culturomics
Definition	Method allowing the description of the microbial composition by high-throughput sequencing	Method allowing the description of the microbial composition by high-throughput culture
Methodology	Pyrosequencing of 16S rRNA amplicons and/or direct metagenomics without amplification step	Use of various selective and/or enrichment culture conditions coupled to MALDI-TOF MS identification
Limitations	Does not provide a strain for further studies Misses minority population (depth bias) <sup>a</sup> Only detects eubacteria <sup>b</sup> Does not provide information on enzymatic abilities <sup>b</sup>	Misses so-called 'non-cultivable' microorganisms Does not directly provide information on enzymatic abilities Major workload
Advantages	Detects 'non-cultivable' microorganisms	Detect minority populations Open approach Detects only viable bacteria <sup>c</sup>
Rate of success	Approximately 200 bacterial species/sample <sup>d</sup>	Approximately 100 bacterial species/sample <sup>d</sup>
Possible future developments	Increased depth of sequencing because of new technology Coupling pyrosequencing with direct metagenomics	Automated detection of microbial growth <sup>e</sup> Automated identification <sup>f</sup> Miniaturization Other innovative culture conditions



*Review*

# Culturomics Approaches Expand the Diagnostic Accuracy for Sexually Transmitted Infections

Ellinor Anna Wolf <sup>1,†</sup>, Hannah Clara Rettig <sup>1,†</sup>, Mariia Lupatsii <sup>1</sup>, Britta Schlüter <sup>2</sup>, Kathrin Schäfer <sup>1</sup>, Dirk Friedrich <sup>1</sup>, Simon Graspentner <sup>1,3</sup>  and Jan Rupp <sup>1,3,\*</sup>

---

*Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 10815. <https://doi.org/10.3390/ijms221910815>

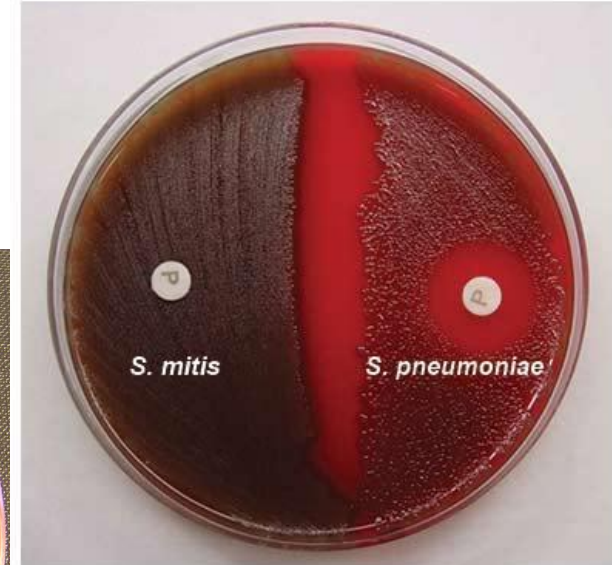
# **OPTOCHINA = Etylohydrokupraina**

(pochodna hydrochininy )

- **wprowadzona w 1911 roku przez Morgenrotha i Levy'ego z zamiarem leczenia pneumokokowego zapalenia płuc.**
- **Niestety, ze względu na dużą toksyczność podawanie jej zostało zarzucone w 1917 r.**
- **w bardzo dużych rozcieńczeniach hamuje wzrost przedstawicieli pneumokoków in vitro (zmienia napięcie powierzchniowe ściany komórkowej i powoduje lizę komórek)**

# OPTOCHINA

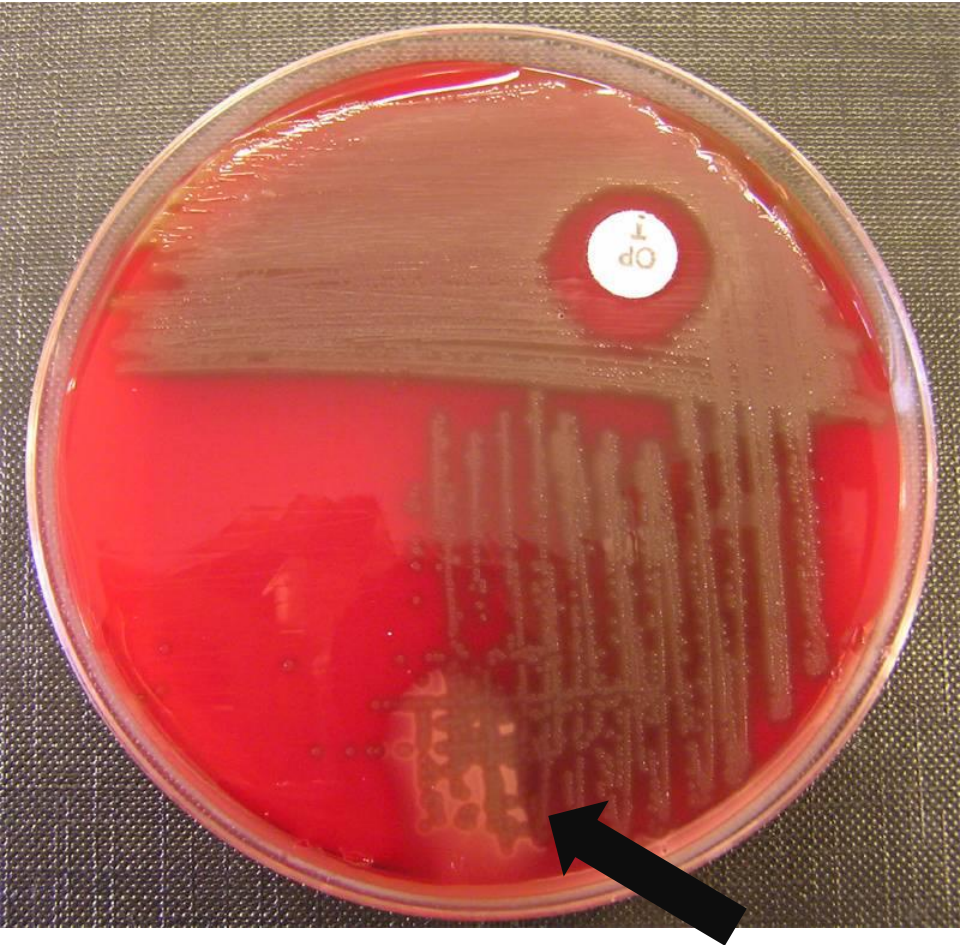
Krążek o zawartości 5  $\mu\text{g}$



- opisano szczepy *S. pneumoniae* odporne na optochinę
- Wyniki fałszywie ujemne obserwowano dla hodowli prowadzonych w wysokich stężeniach  $\text{CO}_2$

# Rozpuszczalność w 10% dezoksycholanie sodu (sole żółci, 10-20% żółć wołowa)

W obecności soli żółci dochodzi do aktywacji autolizyn (amidase)  
i do lizy ściany komórkowej

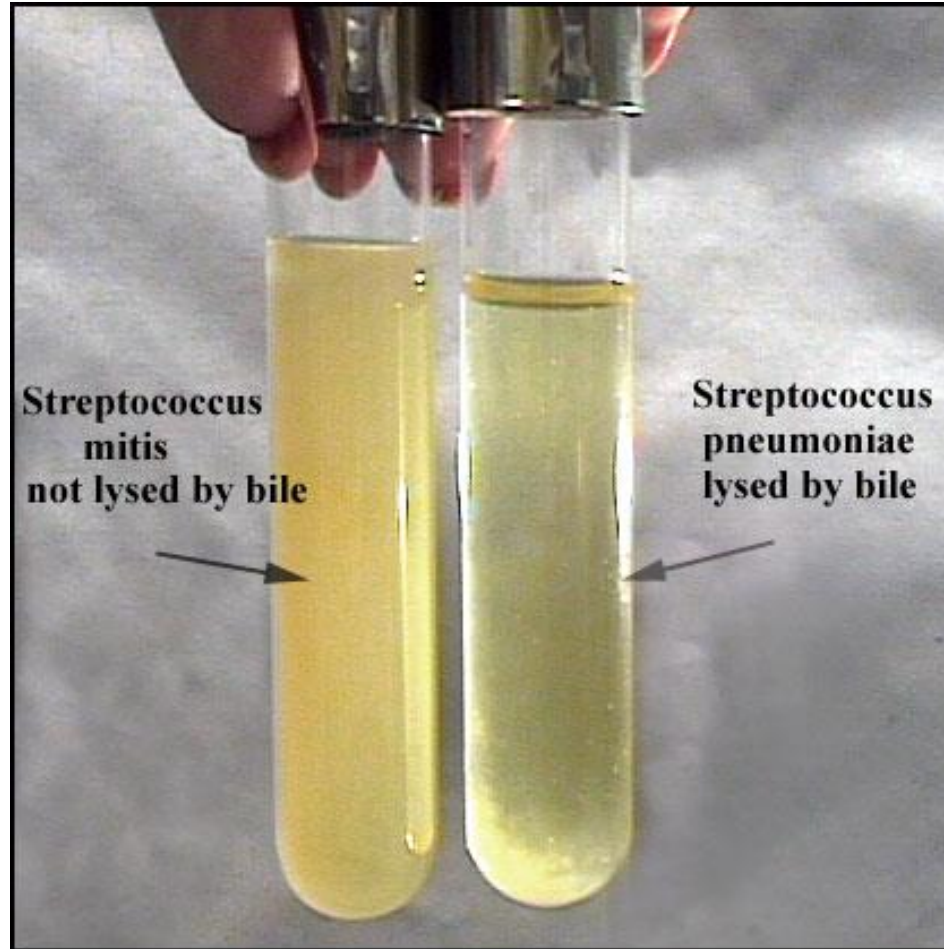


Test „płytkowy”



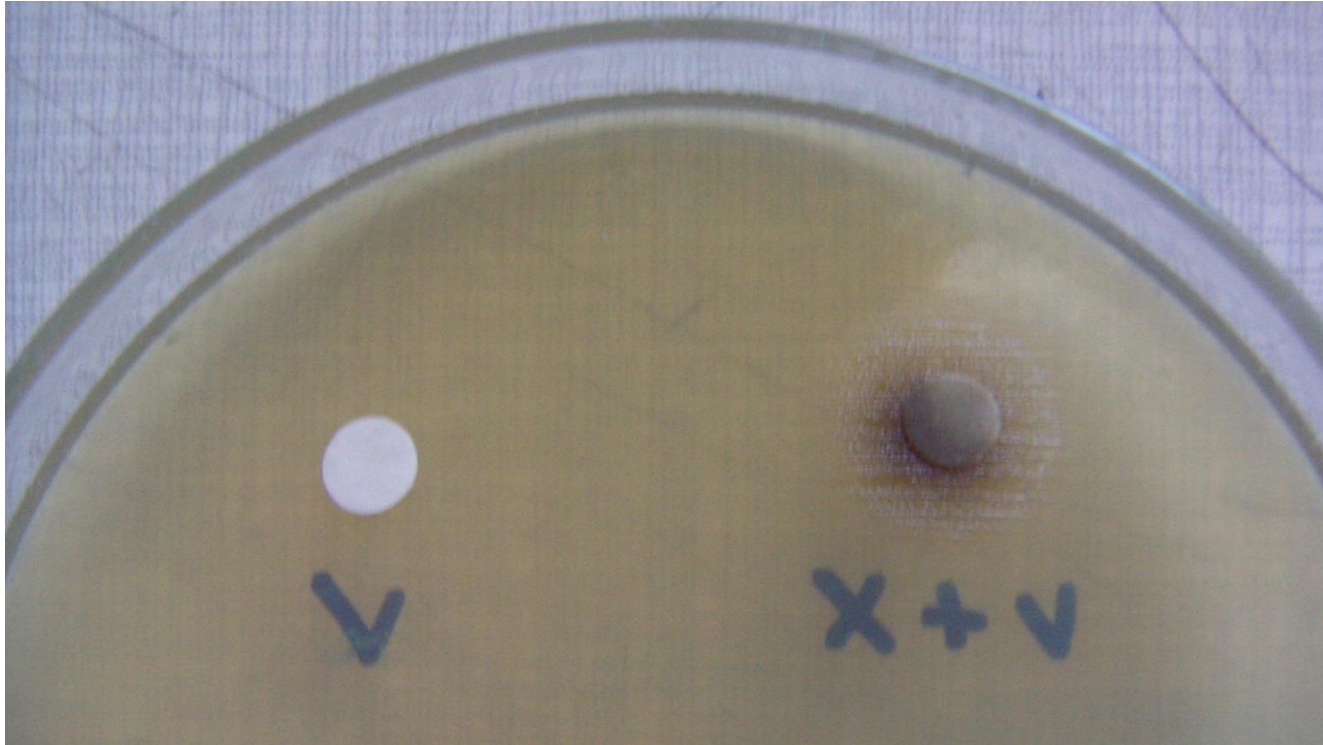
Źródło: materiały własne

# Test „próbówkowy





# Identyfikacja of *H. influenzae* z użyciem krążków „growth factors X, XV and V”



**X - hemin**

**V - NAD (nicotinamide adenine dinucleotide)**

# Koagulaza

## Koagulase test:

1. Free coagulase (extracellular coagulase)
2. Bound coagulase = clumping factor

Coagulase

Fibrynogen  
rozpuszczalny

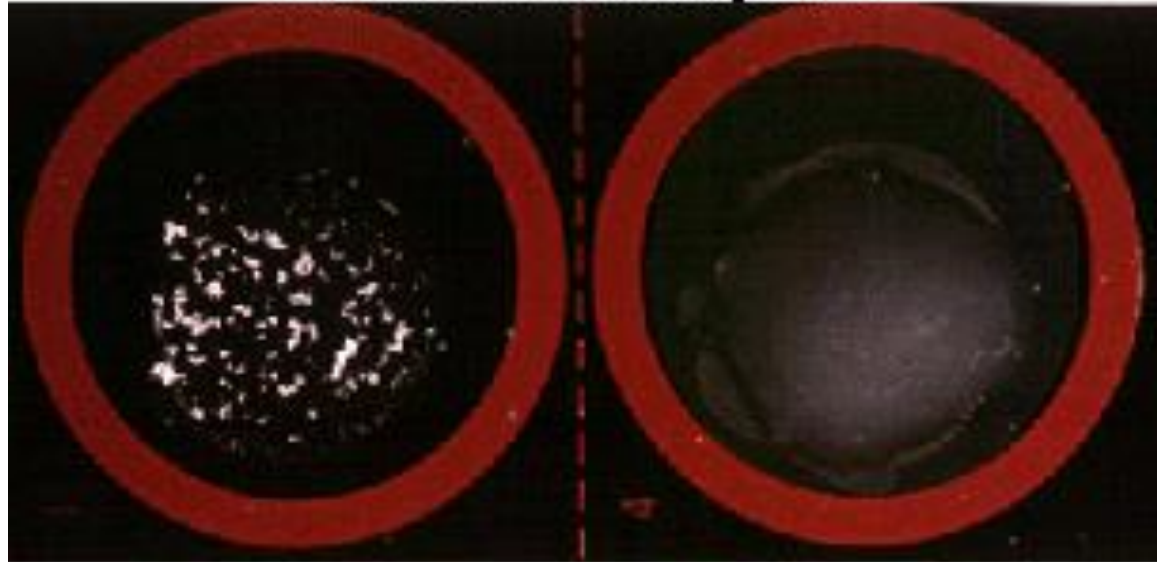
**Koagulaza = free coagulase**

**+ CRP (plasma coagulase-reacting factor)**

Fibryna  
skrzep

**Koagulase/CRP complex**

**Clumping Factor Test  
(correlates with coagulase)**

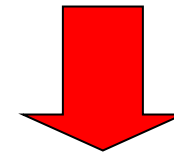
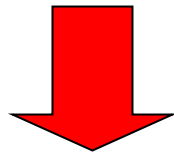


**Staphylococcus  
aureus**

**Staphylococcus  
epidermidis**

**CoNS - Coagulase - negative staphylococci**

**CoPS - Coagulase -positive staphylococci**



**Staphylococcus epidermidis**

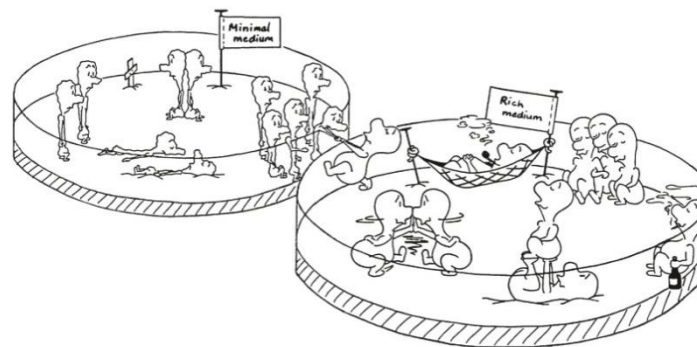
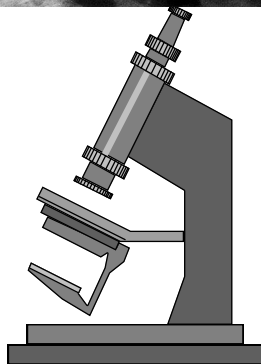
**Staphylococcus aureus**

**Staphylococcus lugdunensis**

# Testy biochemiczne (dawniej krótki i długi szereg)



# KLASYKA ZAWSZE MODNA



# Dziękuję za uwagę 😊

Podziękowania dla wszystkich uczestników sieci BINet i osób, które przesyłają szczepy i materiał do KOROUN

## Zespół KOROUN:

- Waleria Hryniewicz
- Anna Skoczyńska
- Agnieszka Gołębiewska
- Patrycja Ronkiewicz
- Marlena Kiedrowska
- Izabela Wróbel-Pawelczyk
- Kinga Błaszczak
- Alicja Kuch

Krajowy Ośrodek Referencyjny  
ds. Diagnostyki  
Bakteryjnych Zakażeń  
Ośrodkowego  
Układu Nerwowego



[www.koroun.nil.gov.pl](http://www.koroun.nil.gov.pl)