



Mikrobiologi i fortid og fremtid – betydningen av dyrkningsmedier

Fredrik Müller

Avdelingsleder, Avdeling for mikrobiologi, OUS

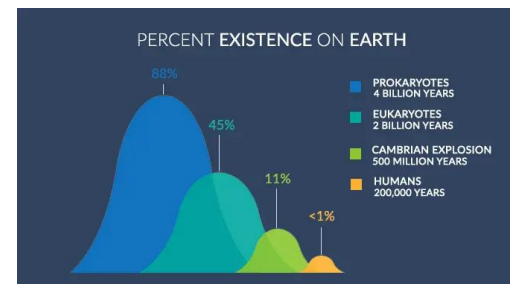


**Ønsker å ta dere med på en liten reise
fra mikroorganismenes begynnelse for
lenge, lenge siden til mikrobenes
betydning i menneskenes historie.**

**Og videre til dagens diagnostikk av
infeksjonssykdommer og hvordan
dette kanskje blir i fremtiden – med
vekt på dyrkning av bakterier og sopp!**

➤ Bakterier – det første liv på jorden

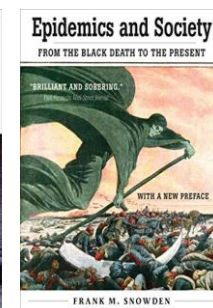
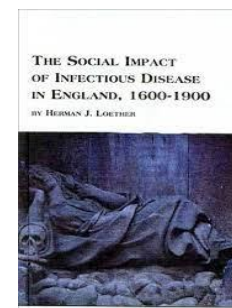
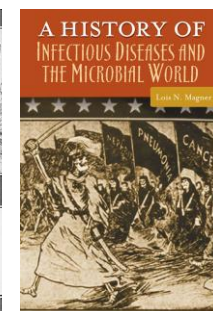
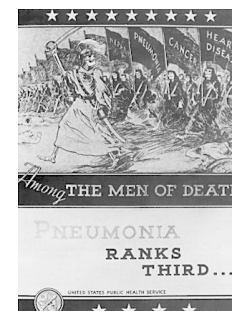
- De første bakterier på jorden ~ 3,5 - 4 milliarder år siden
- Oksygen i atmosfæren: ~ 2,4 milliarder år siden
- Eukaryoter kom til for ~ 2 milliarder år siden
- Homo sapiens har levd på jorden ~ 200.000-300.000 år



✓ Infeksjonssykdommene har fulgt menneskeheten:

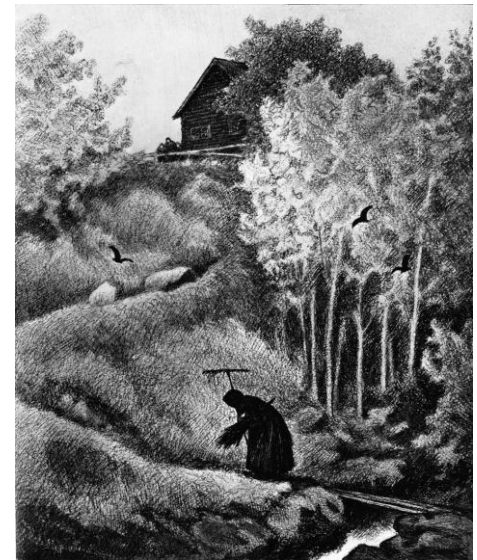
Tilbakevendende epidemier og pandemier – særlig etter at jordbrukssivilisasjonene ble etablert for ca 10.000 år siden

- Befolkningstetthet
- Kontakt med dyr
- Ernæring
- Kommunikasjon
-



Noen viktige pandemier

- Den justinianske pesten (541-542) ~ 30-50 millioner døde. *Yersinia pestis*.
- Svartedauden (1347-1351) ~200 millioner døde. *Yersinia pestis*.
- Koppeepidemien i «den nye verden» (1520) ~ 50-60 millioner døde
- De store koleraepidemiene (1817-1923) ~1 million døde. *Vibrio cholerae*
- Tuberkulose (1882-) 1-2 millioner døde årlig. *Mycobacterium tuberculosis*.
- Spanskesyken (1918-1920) ~50-100 millioner døde. Influensavirus
- HIV/AIDS (1981-) ~ 25-30 millioner døde
- SARS-CoV-2 (2019-) ~ 6 millioner døde



Mikrobiologien – noen tidlige saker

✓ Edvard Jenner m fl:

- De som hadde blitt smittet med kukoppevirus ble ikke smittet med kopper. F eks budeier.
- Sekret/puss fra blemmer (kukoppevirus) inokulert i begge armene på en forsøksperson. Senere fikk han tilført materiale fra pasient med kopper, men viste ingen tegn til koppeinfeksjon
- Vacca (latin) = ku. Vaksinasjon!



- ## ✓ Ignaz Semmelweis - ~1848 : observerte høy dødelighet av barselfeber i avdelingen der leger og studenter arbeidet. De gikk rett fra obduksjon til fødestuen uten å vaske seg. Innførte hånddesinfeksjon og reduserte dødsraten fra 12% til 1%. Han ble ledd av og motarbeidet av legestanden!

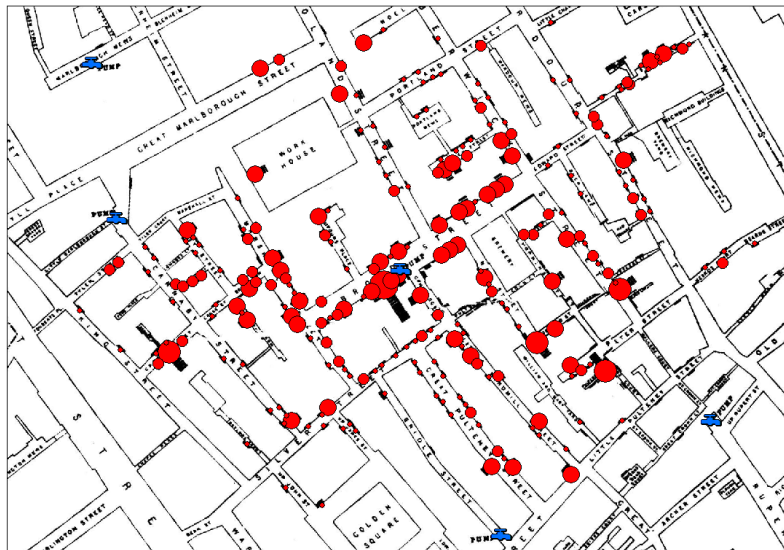


Bakteriologiens «gullalder» - (siste halvdel av) 1800-tallet

1800-tallet: Miasmeteori vs «kontagie»/»kim» oppfatning

- Miasmer: Sykdom fra skadelige gasser fra råtten materie i jord
- Kontagieoppfatning: spredning via fast smittestoff

✓ John Snow og vannpumpen i Broad Street, London - 1854:



Miasmetårn/luftetårn
Ullevål sykehus, 1887

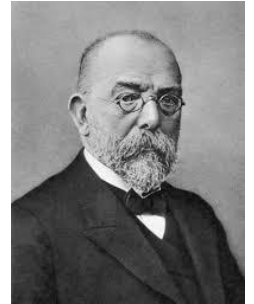


Miasme-mur rundt
gamle Rikshospitalet,
1874-83

Bakteriologiens «gullalder» - siste halvdel av 1800-tallet

✓ Grunnleggerne av moderne bakteriologi:

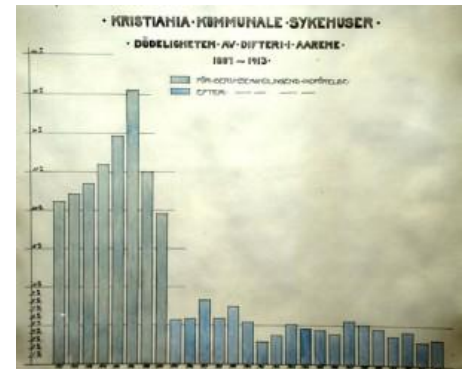
- Louis Pasteur (1822-1895): moderne teori for bakterier som årsak til sykdom, gjæring og pasteurisering, anaerobe bakterier, svekkede bakterier som vaksiner, bl a miltbrann
- Robert Koch (1843-1910): Dyrket bakterier i renkultur på faste medier. *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Vibrio cholerae* +++, Kochs postulater. «Virulens»



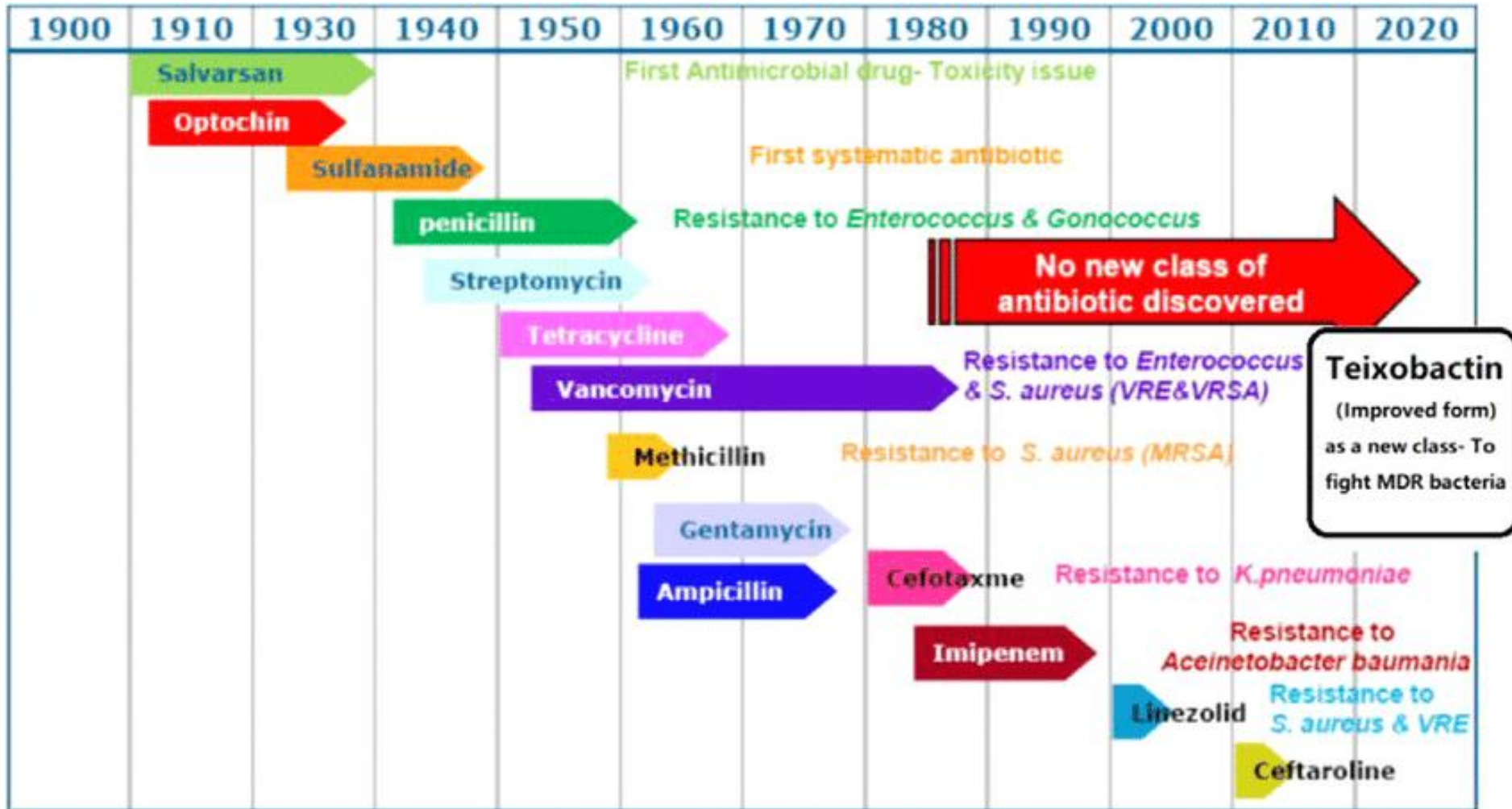
✓ Flere oppdagelser:

- Edwin Klebs (1834-1913): *C. diphtheriae*
- Joseph Lister (1827-1912): desinfeksjon av kirurgiske instrumenter
- Armauer Hansen (1841-1912): *Mycobacterium leprae*
- Emile von Behring (1854-1917): serumterapi, viktig bl a ved tetanus og difteri

Innføring av serumbehandling på Ullevål i 1895:



Antimikrobiell behandling



Ruddajaru LK et al. 2019.

Bakteriologisk diagnostikk – et tilbakeblikk

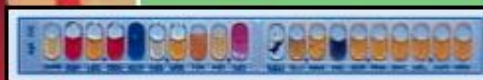
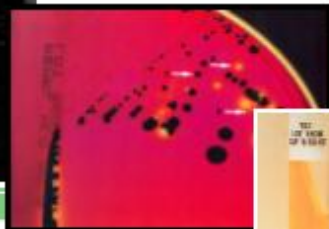
Mikroskopi



**Resistens-
bestemmelse**



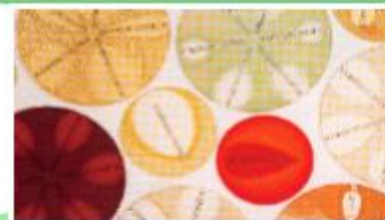
**Dyrkning på
faste medier**



**Masse-
spektrometri**



**Biokjemiske
tester**



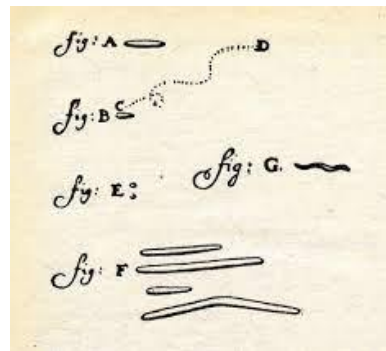
**Molekylære
tester**



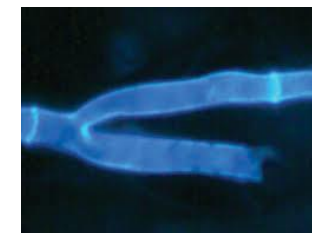
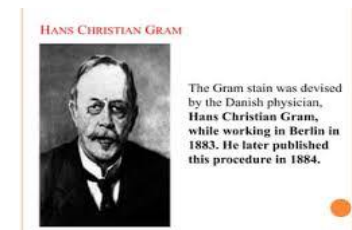
Mikroskopi

- ✓ Anton van Leeuwenhoek (1632-1723)

Beskrev bakterier i 1676.
Figur viser bakterier fra
Leeuwenhoeks munnhule:



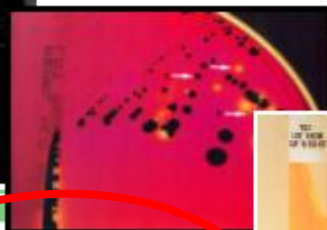
- ✓ Viktig verktøy i bakteriologiens «gullalder»:
 - Hans Christian Gram (1853-1938): Gram-farging (1884)
 - *M. tuberculosis*: Ziehl- Neelsenfarging
- Robert Koch - Paul Ehrlich - Friedrich Ziehl og Friedrich Neelsen (ca 1883)
- ✓ «Nyere» fargeteknikker basert på immunfluorescens:
 - Auraminfarging
 - Calcofluor white
 - Bruk av merkede antistoffer, f eks Pneumocystis fra 1990-tallet



Bakteriologisk diagnostikk – et tilbakeblikk



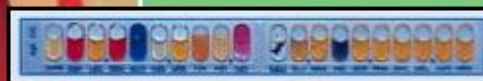
Mikroskopi



*Resistens-
bestemmelse*



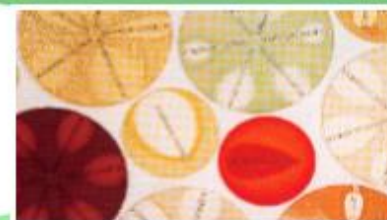
*Dyrkning på
faste medier*



*Masse-
spektrometri*



*Biokjemiske
tester*



*Molekylære
tester*



Dyrkningsmedier

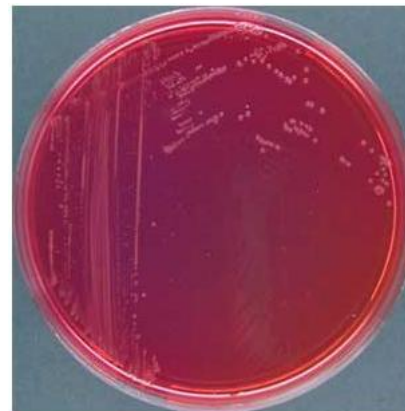
- ✓ Liebig Extract of Meat Company (Lemco; 1865) laget bl a kjøttekstrakter (buljonger)– til dyrkning og som matvare. Skiftet etter hvert navn til Oxo, senere Oxoid.
- ✓ 1881: Robert Koch skiftet til faste medier (gelatin)
- ✓ Fannie Hessie i 1882 i Robert Koch's lab:
Erstattet gelatin med agar etter gode erfaringer med å lage fruktgelé!
- ✓ Agar + kjøttekstrakt – begrenset næringstilbud.
- ✓ Fredrick Loeffler tilsatte peptoner og salt
- ✓ Richard J Petri (1887): introduserte dyrkning i skåler av glass med lokk (petriskåler)
- ✓ Fra 1890-tallet: videre utvikling av dyrkningsmedier basert på biokjemiske kunnskaper om bakterier (og sopp)



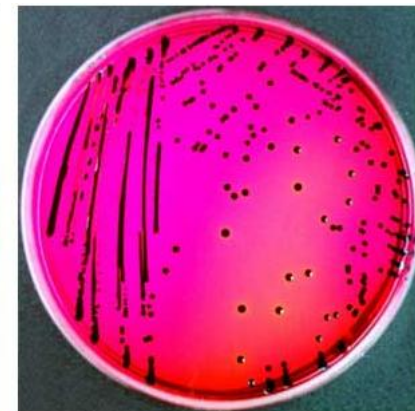
Medier: Eksempler på smarte løsninger

XLD agar (Salmonella, Shigella; 1965)

- Gjærekstrakt
- Agar
- L-lysin
- Xylose
- Laktose
- Sukrose
- Natriumdeoksykolat
- Natriumklorid
- Natriumtiosulfat
- Jern ammoniumsitratt
- Fenolrødt



Shigella on XLD.



Salmonella on XLD.

- Natriumdeoksykolat hemmer G+ flora.
- Xylose: nesten alle *Enterobacterales* utenom *Shigella* fermenterer xylose
- L-lysin: *Salmonella* spalter xylose, men har lysin dekarboksylase (LDC) – gir alkalisk pH (rød)
- *Salmonella* reduserer tiosulfat til sulfitt og H₂S. H₂S reagerer med jern i alkalisk miljø – gir svart jernsulfid
- Andre *Enterobacterales*: xylose, laktose og sukrose gir fermentering – sur pH (gul)

Medier: Eksempler på smarte løsninger

Listeria agar (1980-tallet)

- Peptoner «næring»
 - Agar
 - Esculin
 - Jern ammonium citrat
 - Litiumklorid - antibakteriell effekt
 - Amfotericin B – anti-sopp effekt
 - Colistin sulfat – G- antibakteriell effekt
 - Akriflavin – G+ antibakteriell effekt
 - Cefotetan – ganske bred antibakteriell effekt (2. gen cefalosoprin)
 - Fosfomycin - ganske bred antibakteriell effekt
- Egnert for påvisning av *Listeria monocytogenes* i prøvematerialer som inneholder annen flora.
- Vekst av annen flora (G+ og G- bakterier, sopp) hemmes.
- *L. monocytogenes* har β -glukosidase: spalter esculin til glukose og esculetin. Esculetin binder jern: gir brun-svart pigment.



Kromogene medier

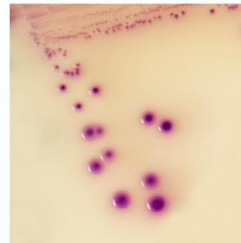
Publikasjoner på kromogene medier fra 1993

Eksempel:

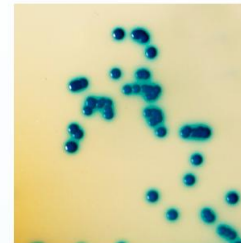
Chromagar BBL UVI

- ✓ *E. coli*: β -galaktosidase – rosa kolonier
- ✓ Enterokokker: β -glukosidase – blå-grønne kolonier
- ✓ *Proteus/Morganella/Providencia*: tryptofan deaminase – brune kolonier
- ✓ *Klebsiella/Enterobacter/Serratia*: jern+ β -glukosidase – «metallisk» blå kolonier

Colonies Appearance



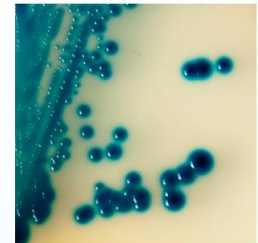
E. coli
Dark pink to reddish



Enterococcus
Turquoise blue



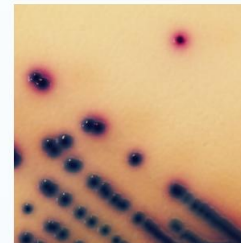
Proteus
Brown halo



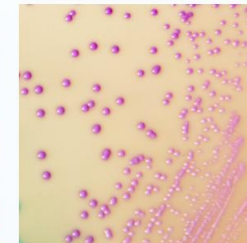
Klebsiella, Enterobacter, Serratia
Metallic blue



S. aureus
Golden, opaque, small



Citrobacter
Metallic blue with red halo



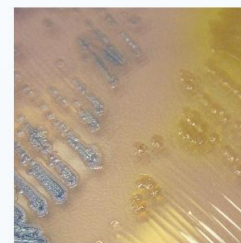
S. saprophyticus
Pink, opaque, small



Candida albicans
Colourless



Streptococcus agalactiae
Light blue

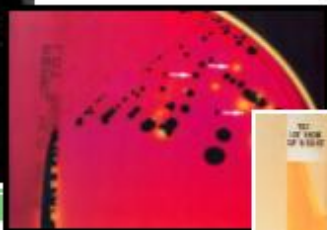


Pseudomonas aeruginosa
Translucent, cream to blue

Bakteriologisk diagnostikk – et tilbakeblikk



Mikroskopi



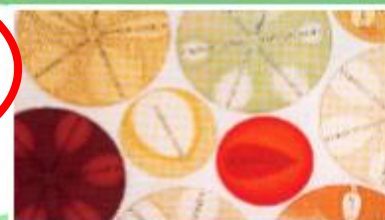
*Resistens-
bestemmelse*



*Dyrkning på
faste medier*



*Biokjemiske
tester*



*Masse-
spektrometri*



*Molekylære
tester*



Biokjemisk identifikasjon: «Cowan and Steel's»

[6.3]

CHARACTERS OF GRAM-POSITIVE BACTERIA

Table 6.3b. Third-stage table for *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Aerococcus* and *Gemella*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Haemolysis	β	β/-	β	α	β	β	β	β/-	β	α/-	β/-	β	α	α/β	α/β	-	+
Requires CO ₂ for growth	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth in 6.5% NaCl broth	-	d ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth on 40% Bile Agar	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leucine aminopeptidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bile-aesculin test	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer test ^b	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyrolydonylarylamidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pyridoxal or cysteine dependence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of																	
hippurate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	d	-	+	d	-	-
aesculin	d	-	-	-	d	d	d	d	+	+	+	+	d	+	-	-	-
arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
starch ^c	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sensitive to bacitracin (0.1 unit)	+	d	d	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
optochin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ O ₂ production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentation of																	
pyruvate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ribose	-	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
mannitol	D ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sorbitol	-	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
lactose	+	d	-	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Polysaccharide from sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yellow pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lancefield antigen	A	B	C	C	C	C	C	G	-/F/	E/P/	-/E	R/S/	L	-	-/H	-/O/K-	-
									G/C/A	U/N/-	T/-						

- 1 *Streptococcus pyogenes*; *S. haemolyticus*
- 2 *Streptococcus agalactiae*
- 3 *Streptococcus equi*
- 4 *Streptococcus dysgalactiae*
- 5 *Streptococcus zooepidemicus*
- 6 *Streptococcus equisimilis*
Streptococcus spp. group C

- 7 *Streptococcus* spp. group G (large colony variety); *Streptococcus canis*
- 8 *Streptococcus anginosus*; '*S. milleri*'
minute colony haemolytic streptococci;
S. intermedius-MG; *S. constellatus*
- 9 *Streptococcus porcinus*; *S. lentus*
- 10 *Streptococcus uberis*
- 11 *Streptococcus suis*

- 12 *Streptococcus* spp. group L
- 13 *Streptococcus pneumoniae*; pneumococci
- 14 *Streptococcus sanguis*
- 15 *Streptococcus oralis*; '*S. mitior*'
- 16 *Streptococcus* spp. pyridoxal or cysteine dependent
- 17 *Streptococcus morbillorum*

- α Green zone around colonies on Blood Agar
β Clear, colourless zone around colonies on Blood Agar
a Some strains will grow in 4% NaCl broth
b More strains positive in a medium containing pyruvate than in Glucose Phosphate Broth
c Zone of clearing greater than 2 mm diameter around growth on Starch Agar stained with Lugol's iodine
d Strains of M-type 6 and M-type 55 ferment mannitol

- e Strains of Lancefield serological Group R ferment raffinose
f May be opposite reaction with strains of serotypes d or g
g Positive reactions with strains of serotypes b, d and g
h Usually positive with human isolates
j Both antigens may be present in a single strain
Dx = Dextran (glucan)
Lv = Levan (fructan)

Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria

Third Edition

Edited by
G.I. Barrow and R.K.A. Feltham



Trerørs forgjæring

Hajna-skjema

Antall kopier: 13

Plassering: Avlesningsplasser rom 3037/ 3043/ 3064

✓ Kligler-iron (Hajna)

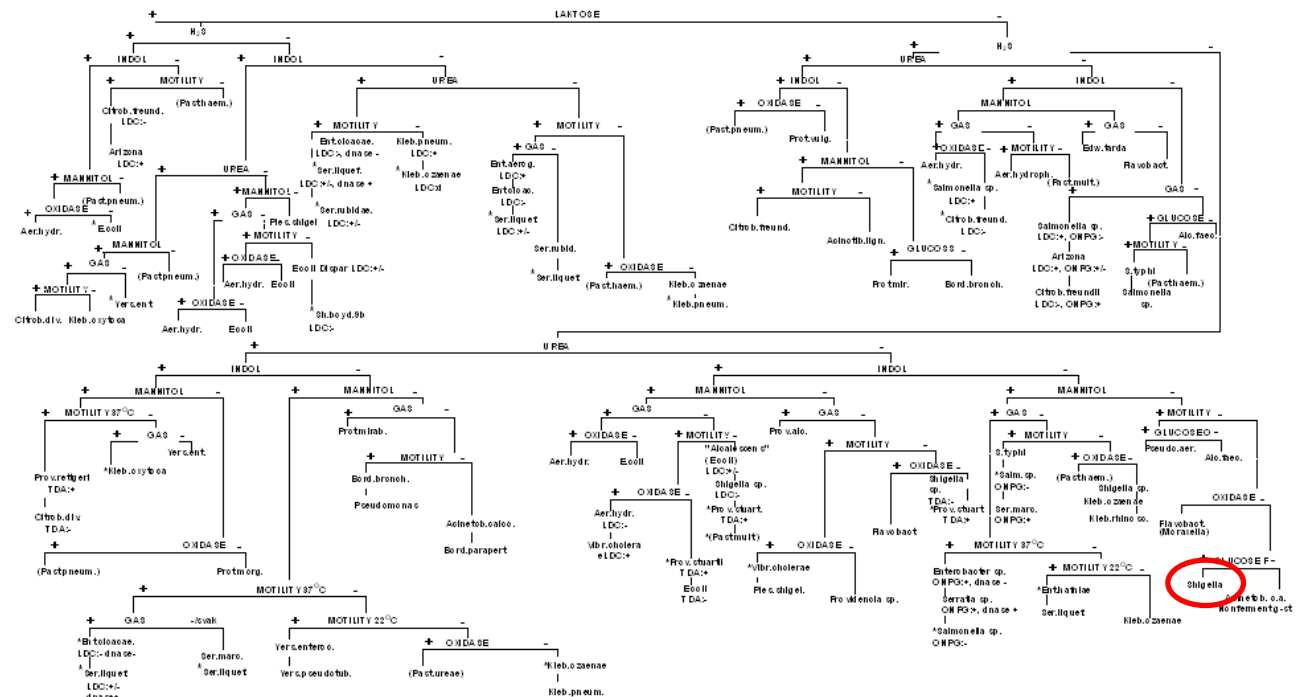
- Laktose
- Glukose
- H₂S
- Gass

✓ Mannitt-bevegelighet

- Mannitol
- bevegelighet

✓ Urea/indol

- Urea
- indol

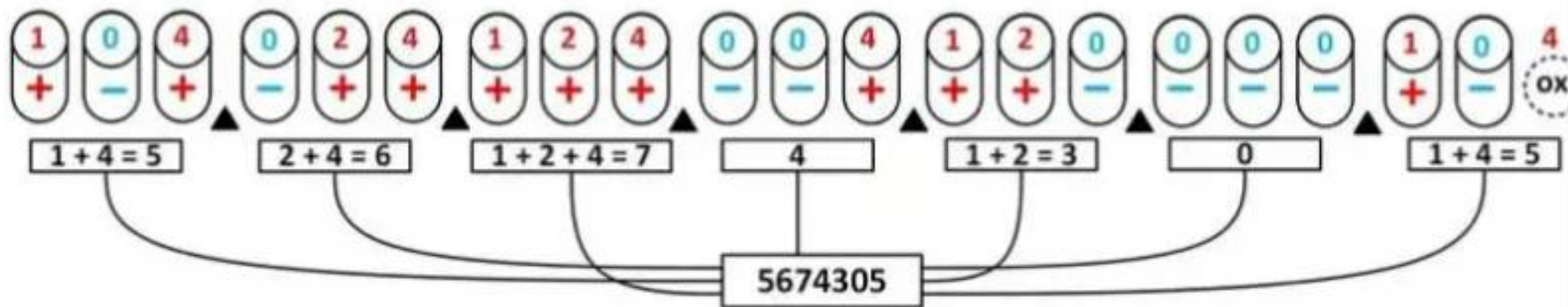


Posisjoner markert med*: forekommer sjeldent - De fleste serratia er dnase+, og alle har minimal gassproduksjon

Biokjemiske tester, som API, f eks API 20E:



Prinsipp for avlesning – ikke relatert til figur over:

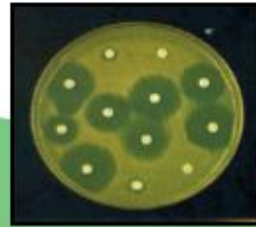


Bakteriologisk diagnostikk – et tilbakeblikk

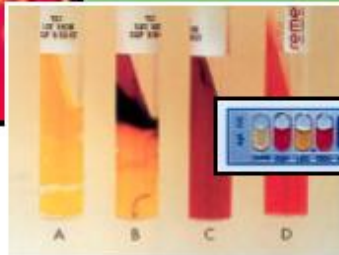


Mikroskopi

*Resistens-
bestemmelse*



*Dyrkning på
faste medier*



*Biokjemiske
tester*



*Masse-
spektrometri*



*Molekylære
tester*

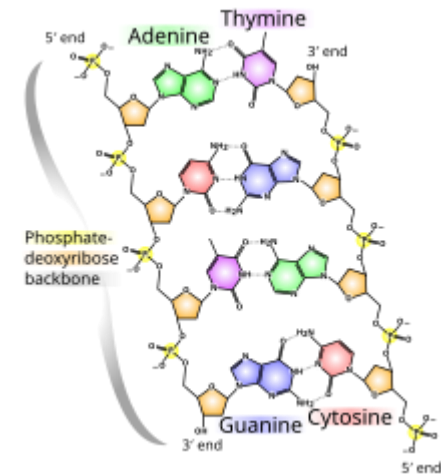
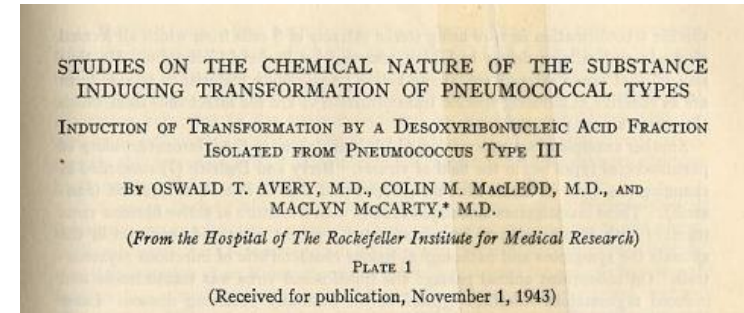


Påvisning av nukleinsyre

✓ Oswald Avery, 1944:

- Pneumokokker: virulente «S» (kapsel) og avirulente «R» (akapsulære)
 - «S» til mus: musene døde
 - «R» til mus: musene overlevde
 - «R» + drept «S» til mus: musene døde, levende «S» isolert fra blod
- Kunne vise at det var overføring av DNA ved transformasjon som ga endring fra «R» til «S».

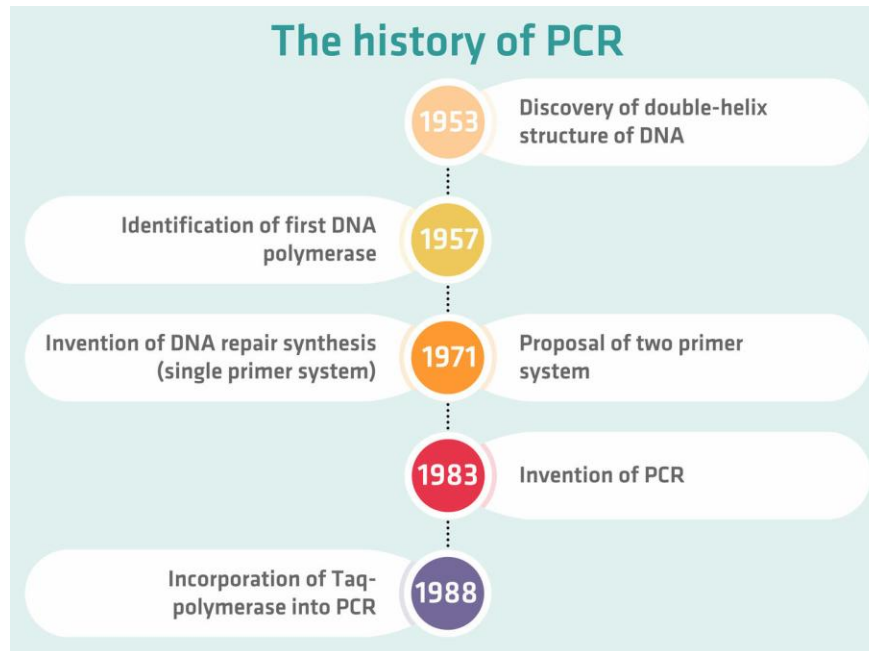
- ✓ Watson, Crick m fl 1953: DNA helix
- ✓ DNA - RNA - Protein
- ✓ 1950-1970 årene restriksjonsenzymmer
- ✓ Fred Sanger: Sanger sekvensering utviklet i perioden 1965-1977
- ✓ Sekvenseringsinstrumenter fra 1980-tallet
- ✓ 16S sekvensering fra 1980-tallet
- ✓ Første helgenom: *H. influenzae* i 1995



Påvisning av nukleinsyre

✓ PCR

- 1976: isolert termostabil Taq polymerase
- 1983: PCR som prinsipp (Kary Mullis)
- 1988: Taq polymerase brukt i PCR
- 1989: Taq polymerase «Molecule of the Year» i Science
- 1990: Første kommersielle PCR-instrument (Perkin Elmer)
- 1993: Kary Mullis får Nobelprisen
- 1996: de første kommersielle real-time PCR instrumentene lanseres



Bakteriologisk diagnostikk – et tilbakeblikk



Mikroskopi

*Resistens-
bestemmelse*



*Dyrkning på
faste medier*



*Biokjemiske
tester*



*Masse-
spektrometri*



*Molekylære
tester*



MALDI-TOF

- ✓ Startet arbeid i 2008 (RH) –ett Bruker-instrument på lån, senere kjøp med støtte fra FHI
- ✓ Flere prosjekter
- ✓ Søkt som ny metode for akkreditering i mars 2010 – godkjent av NA
- ✓ Etter hvert satt opp som «standard identifikasjon» på BAKR og BAKUL
- ✓ Senere: id av mykobakterier, muggsopp
- ✓ Standardmetode for identifikasjon av bakterier og sopp fra renkultur internasjonalt, inkl direkte fra pos. blodkultur



Norsk Akkreditering
Fetveien 99
2007 Kjeller

att: Anne Grøndsen

Deres ref.:
Vår ref./saksbeh./dir.tlf.:
Dato: 22.02.2010

TEST 227 (Mikrobiologisk institutt, Rikshospitalet) - Søknad om fornyelse (NS-EN ISO 15189) med utvidelse i forbindelse med bedømmelse 22.-23. mars 2010

I forbindelse med NA's bedømmelse 22.-23. mars 2010 søkes det om følgende utvidelse:

1. 2.LAB.MIK.BAK.6.41: MALDI-TOF massepektrometri for identifikasjon av bakterier og sopp.
2. 2.LAB.MIK.MOL.3.03: Dermatofytt PCR (deteksjon v hj a SYBRGreen)
3. 2.MIK.VIR.2.8.01: TB IGRA Test Quantiferon Tuberkulosecreening i blod

Alle metodene representerer nye måleprinsipper i forhold til tidligere akkrediterte metoder.

Oslo universitetssykehus HF

Mikrobiologisk avdeling -

Rikshospitalet

Postadresse:
Sognsvannsveien 20
0627 Oslo

Sentraltbord:
23070000

Org.nr:
NO 993 467 049 MVA

www.oslo-universitetssykehus.no



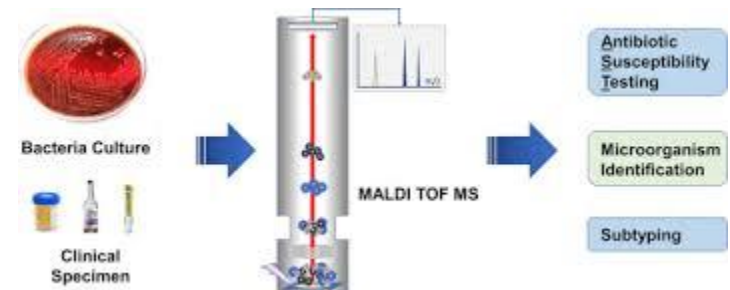
microflex™

User Manual



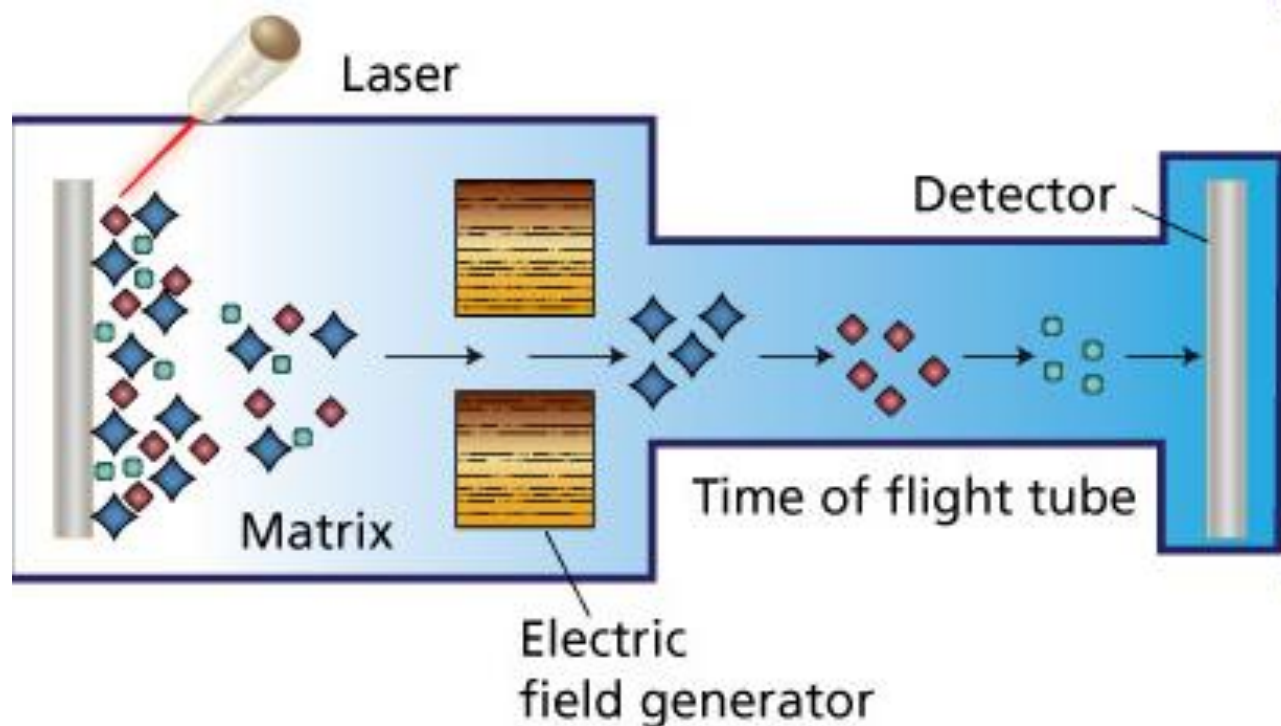
Bruker Daltonics

Version 1.2 (August 2008)

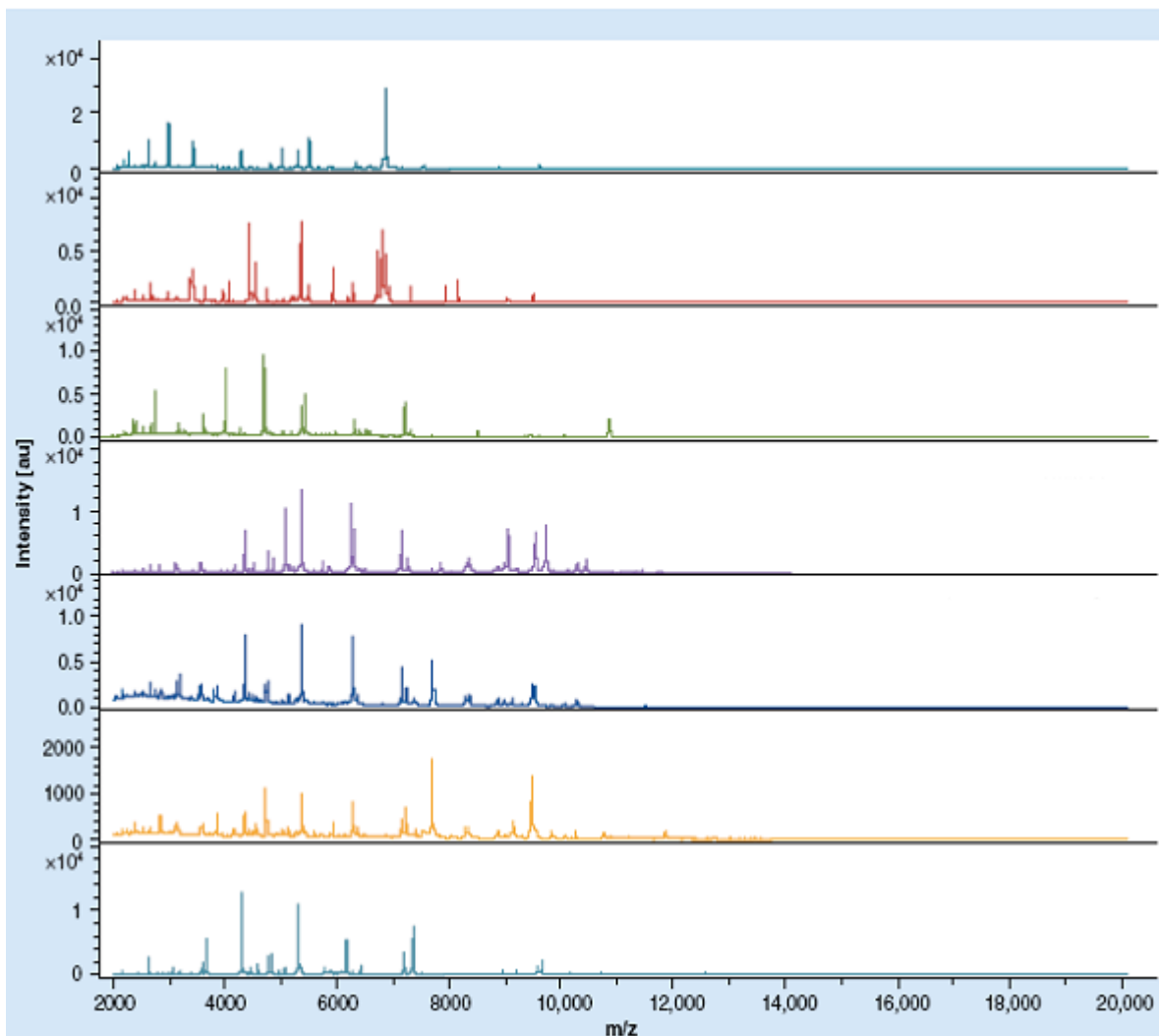


MALDI-TOF masse spektrometri - prinsipp

- Mikroorganismer på plate
- Matriks på plate
- Utfør analysen:



Plassering av et protein (topp) avhenger av molekylets masse/ladning (m/z)



Staphylococcus aureus

Streptococcus pyogenes

Corynebacterium diphtheriae

Escherichia coli

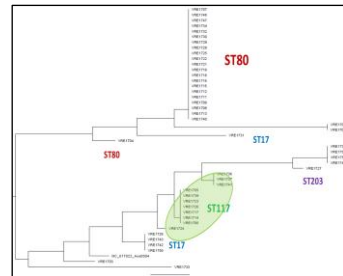
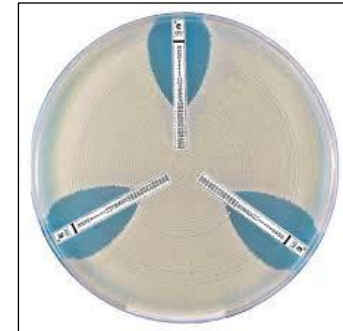
Klebsiella pneumoniae

Klebsiella ozaenae

Legionella pneumophila

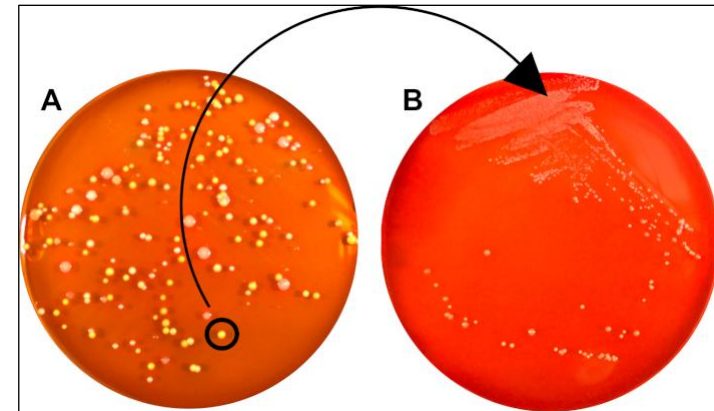
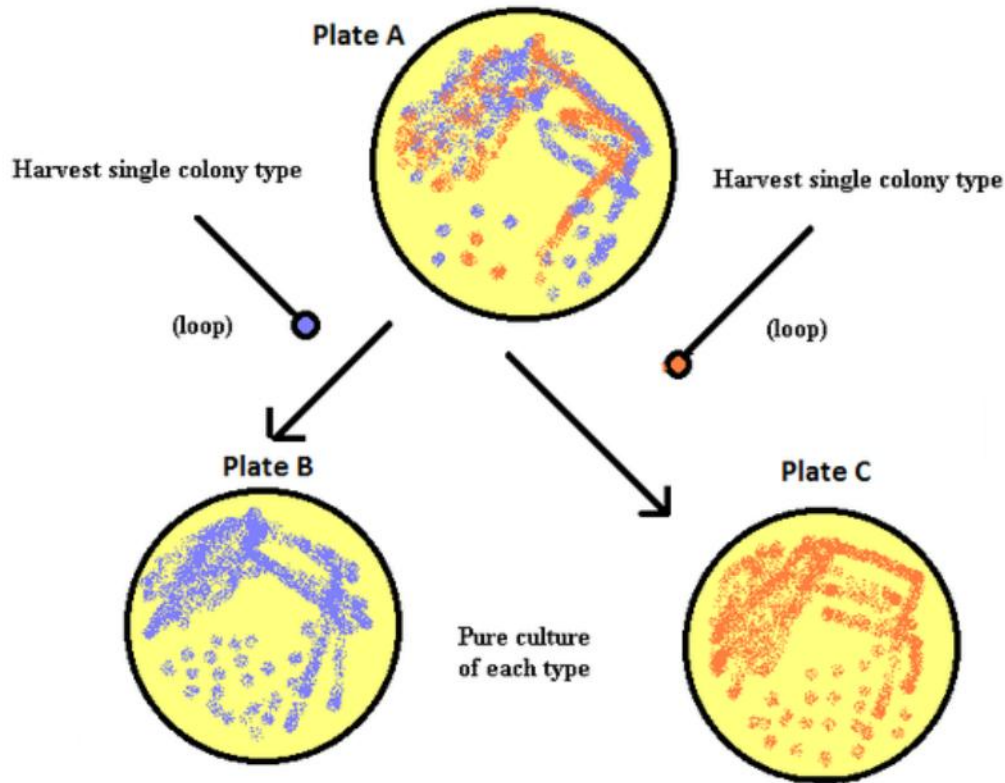
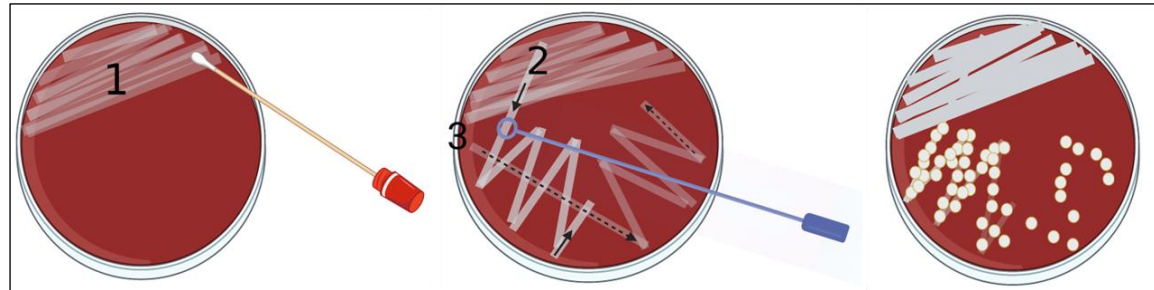
Dyrkning av bakterier og sopp – i diagnostikk og forskning

- ✓ Helt grunnleggende metoder i diagnostikk av bakterie- og soppinfeksjoner
- ✓ Resistensbestemmelse: krever dyrkning og renkultur
- ✓ Oppklaring av infeksjonsutbrudd: Helgenomsekvensering av bakterier og sopp krever dyrkning og renkultur



Dyrkning av bakterier og sopp – i diagnostikk og forskning

Renkultur



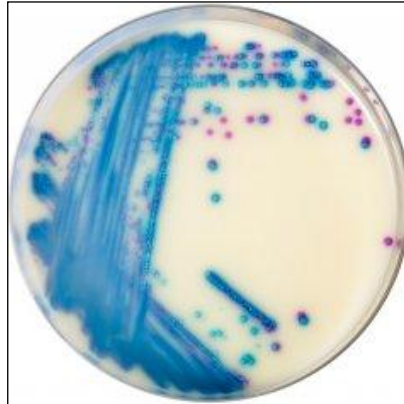
- ✓ Identifikasjon
- ✓ Resistensbestemmelse
- ✓ Typing ved sekvensering

Dyrkning av bakterier og sopp – i diagnostikk og forskning

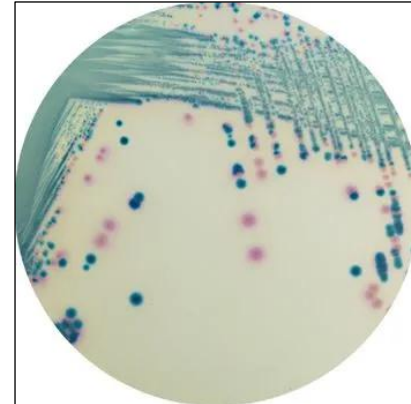
Screening for resistente bakterier



MRSA



VRE

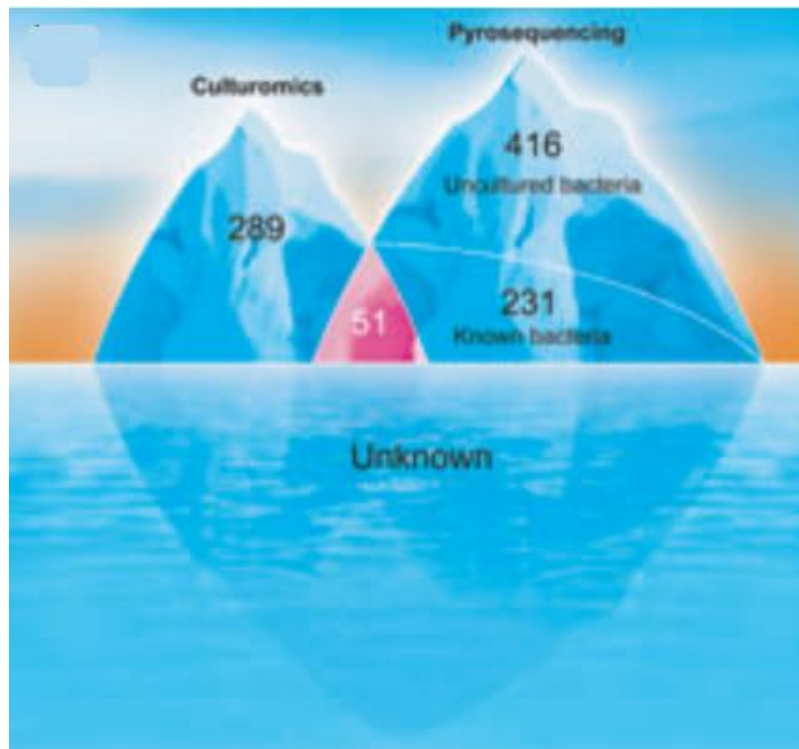


ESBL_{CARBA}

- ✓ Noen resistensbakterier har «enkle resistensmekanismer» - kan gjøres med PCR. F eks MRSA (*mecA* gen), VRE (*vanA*, *vanB* gen)
- ✓ Andre har meget komplekse og varierende mekanismer, f eks Gram-negative bakterier ekstendert spektrum beta-laktamaser (ESBL) – flere hundre ulike gener.

Dyrkning av bakterier og sopp – i diagnostikk og forskning

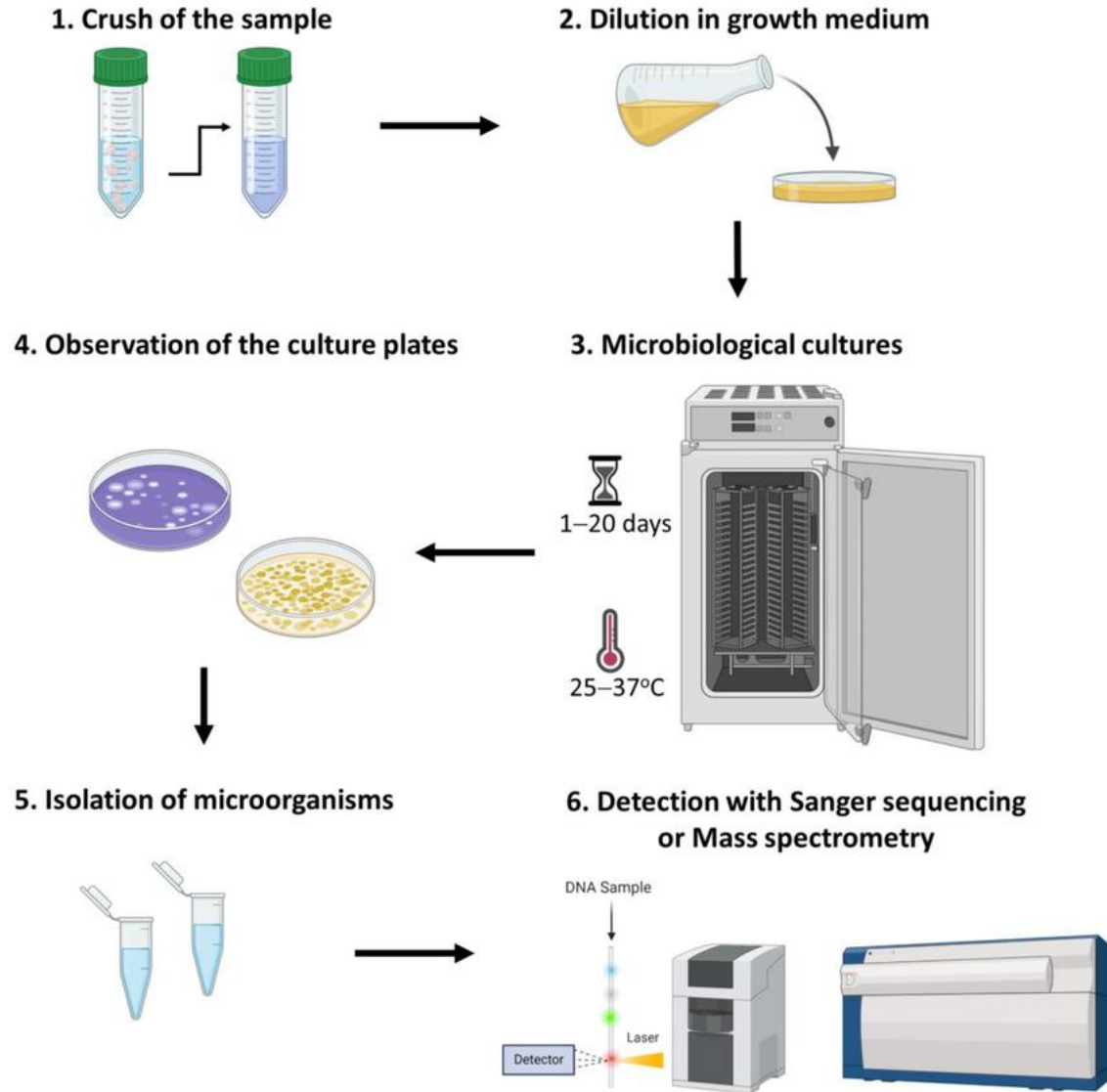
- ✓ Viktig i forskning på mikrobiota (=normalflora) sammen med molekylære metoder
- ✓ Dyrkning: «Culturomics»



- 340 bakteriearter påvist ved dyrkning
- 698 bakteriearter påvist ved NGS
- Kun 51 påvist ved begge metoder!

Lagier J-C et al. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. CMI 2012; 18: 1185-93.

Culturomics



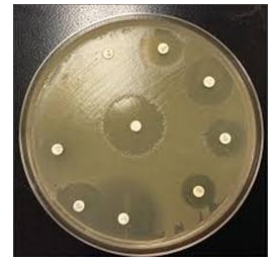
Dyrkning av bakterier og sopp - automasjonsløsninger

- ✓ Mange laboratorier har anskaffet eller er i ferd med å anskaffe automasjonsløsning innen bakteriologi
- ✓ Understreker at dyrkning fortsatt vil være en viktig metode i mange år



Dyrkning av bakterier og sopp - automatisjonsløsninger

- ✓ Automatisert utsæd av de fleste prøvematerialer
- ✓ Deretter fraktes skåler på bånd til en inkubator
- ✓ Etter definerte tidsperioder avfotograferes skålene
- ✓ Avlesning av skåler på skjerm med merking av hvilke kolonier som ønskes identifisert
- ✓ Identifikasjon ved Maldi-tof
- ✓ Subkultivering av valgte kolonier: renkultur for resistensbestemmelse
- ✓ Avlesning av hemningssoner ved diskdiffusjon på skjerm
- ✓ Automatisert tolkning av kolonier på kromogene medier



Oppsummert

Medier for dyrkning av bakterier og sopp:

- ✓ har vært svært viktige siden bakteriologiens «gullalder» på slutten av 1800-tallet
- ✓ er en nødvendig forutsetning for dagens mikrobiologiske diagnostikk
- ✓ er viktige innen forskning på bl a mikrobiota (normalflora)
- ✓ er viktige i de kommende år – stor satsing på automasjon i bakteriologi
- ✓ er viktig å kunne produsere «in house» bl a av beredskapshensyn, selv om IVDR gjør dette mer krevende

Takk for oppmerksomheten!

