

Medizinische Mikrobiologie III : Pathogene Staphylokokken der Nase?

Verfasser/innen: Ariane Orosz ariane.orosz@access.unizh.ch , Eliane Wandeler ca_li75@hotmail.com , Barbara Schellenberg barbara.schellenberg@bluemail.ch , Philipp Diener pdiener@access.unizh.ch , Catherine Lippuner ca_li75@hotmail.com

Betreuerin: Prof. Dr. B. Berger-Bächi bberger@immv.unizh.ch

Einleitung

In diesem Experiment bestimmen wir die Antibiotika-Resistenz eines wichtigen menschlichen Pathogens, von *Staphylococcus aureus*. Weiter weisen wir das Penicillin-bindende Protein PBP2a nach, welches für die Resistenz gegen Beta-Lactame verantwortlich ist. Das PBP katalysiert die Quervernetzung des Peptidoglykans.

PBP = Penicillin Bindendes Protein

Vorgehen und Ergebnisse

1. Herstellung einer verdünnten Bakterienkultur

3 bis 5 Kolonien werden mit einem Wattestäbchen aufgenommen und in einem Eppendorfröhrchen mit physiologischer NaCl-Lösung vermischt. Anhand der Trübung kann man die Bakterienkonzentration bestimmen. Man vergleicht sie mit einem 0,5 McFarland Trübungsstandard, dieser Grad der Trübung entspricht 10^8 Bakterien/ml.

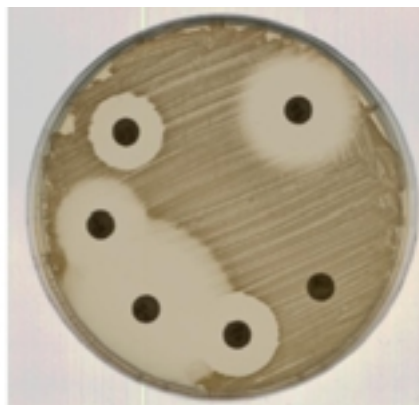
2. Resistenz Test

Ein klinischer Stamm 482, z.B. von einem Spitalpatienten, wird auf die Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika getestet.

Man taucht ein Wattestäbchen in die Bakterienverdünnung und verteilt sie gleichmässig auf eine Müller-Hinton Platte. Auf dem Bakterienrasen werden Filterpapier-Rondellen gestempelt, die je mit einem anderen Antibiotikum getränkt waren. Die Platten werden über Nacht bei 37° C inkubiert.

Auswertung:

1. Bestimmen des Durchmessers der Hemmhöfe
2. Vergleich und Interpretation anhand der Tabelle des NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): Je nach Hemmhofdurchmesser wird der Stamm gegen ein spezielles Antibiotikum als klinisch resistent oder sensitiv genannt.



Figur 1: Antibiotikaresistenzplatte. Eine Müller-Hinton Agarplatte wurde mit *S. aureus* 482 beimpft und Papierdisks, die mit unterschiedlichen Antibiotika beladen sind, aufgelegt. Der Durchmesser der Hemmhöfe ist in Tab. 1 aufgeführt.

Tabelle 1:

Antibiotikum	Hemmhofdurchmesser	sensitiv/resistent
Oxacillin	17 mm	sensitiv, sollte resistent sein*
Ampicillin	16 mm	resistent
Amoxicillin	18 mm	resistent
Gentamicin	20 mm	sensitiv
Trimethoprim	kein Hemmhof	resistent
Rifampin	>20 mm	sensitiv

* Die Methicillin Resistenz kann durch Oxacillin nicht induziert werden, da Oxacillin ein schlechter Inducer ist. Hingegen ist Cefoxitin ein guter Inducer und aktiviert das *mecA* Gen im *mec* Operon, das für PBP2a codiert -> induzierte Resistenz (siehe PBP2a Nachweis durch Agglutination)

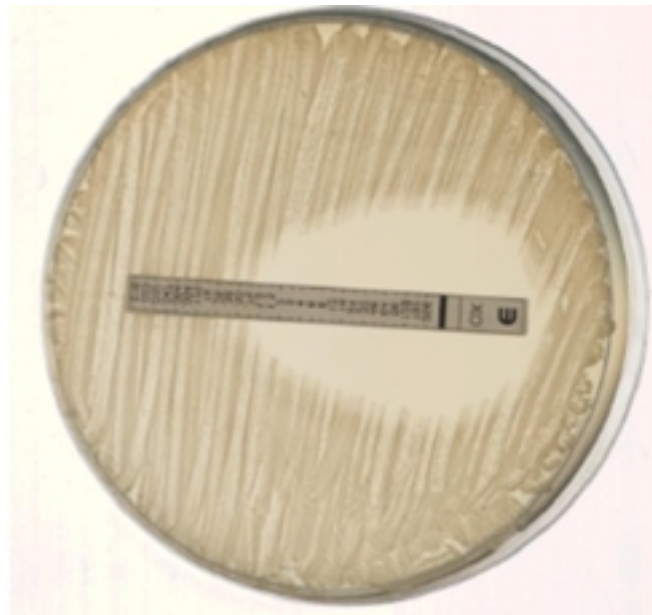
3. MIC/MHK Bestimmung

Minimal Inhibitory Concentration / Minimale Hemm-Konzentration

3.1 Etest

Auf Bakterienrasen eines jeden Stammes (482 = klinischer Stamm, 270 = resistenter Stamm, 255 = Wildstamm, empfindlich) wird ein Oxacillin-Streifen (Konzentration von unten nach oben zunehmend) gelegt. Anschliessend Inkubation bei 37°C über Nacht.

Die MIC kann an der Hemmhofgrenze zum Etest Streifen abgelesen werden.



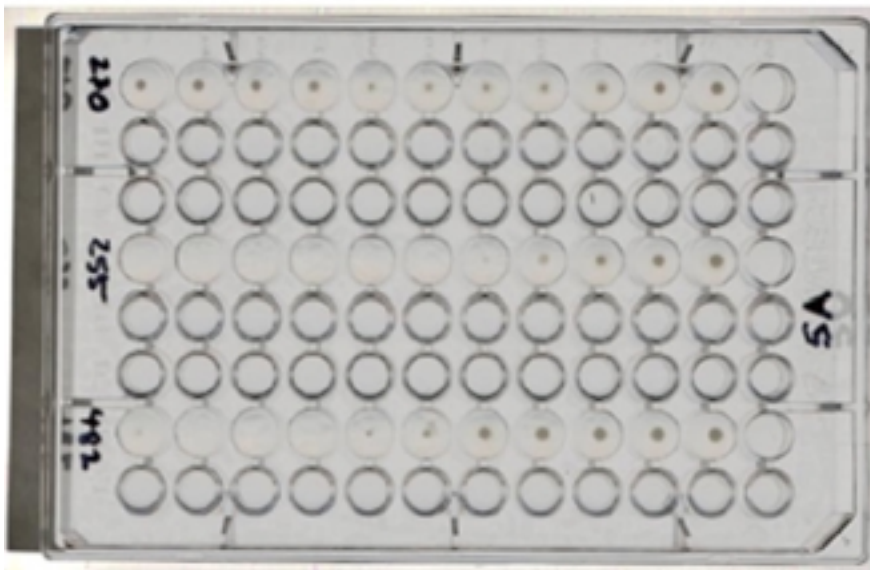
Figur 2: Etest. Ein mit Oxacillin beladener Etest Streifen wurde auf eine mit dem Stamm 482 beimpfte Müller-Hinton Platte aufgelegt. Beim Schnittpunkt des Hemmhofs mit dem Etest Streifen kann die minimale Hemmkonzentration von Oxacillin abgelesen werden.

Tabelle 2:

Staphylococcus Stammbezeichnung	MIC für Oxacillin
255	bis 0.19 µg/ml
270	kein Hof bei > 256 µg/ml
482	0.5 - 0.75 µg /ml

3.2 MIC Bestimmung mit Microbroth Verdünnung

Microtiter-Platte



Figur 3: Microbouillondilutionstest zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Oxacillin. Eine Verdünnungsreihe von Oxacillin mit dem Faktor zwei wurde in den Vertiefungen 1 bis 10 vorgelegt und mit 10^4 Bakterien beimpft. Die Ausgangskonzentration von Oxacillin beträgt 8 µg/ml. Vertiefung 11 ist eine Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum, Vertiefung 12 eine Sterilitätskontrolle des Wachstumsmediums. Wachstum wird an der Bildung eines punktförmigen Bakterienniederschlags erkannt.

Vorgehen:

50 µl Wachstumsmedium in die Vertiefungen von 2 bis 12 geben. In 1 und 2 wird 50 µl Antibiotika (Oxacillin 16 µg/ml in Wachstumsmedium) zugegeben und eine geometrische Verdünnung mit dem Faktor 2 durchgeführt (aus 2 wird 50 µl in 3 gegeben, aus 3 50 µl in 4, etc. bis 10. aus 10 wird noch 50 µl entfernt)

50 µl Bakterienverdünnung (10^4 Zellen /ml in Wachstumsmedium) in 1 bis 11 zugeben. 11 ist die Kontrolle für das Wachstum ohne Antibiotikum, 12 die Kontrolle, dass das Wachstumsmedium nicht kontaminiert ist.

Tabelle 3:

Vertiefungsnr.	[Antibiotikum] Oxacillin µg/ml	Stamm 482	Stamm 270	Stamm 255
1	8	-	+	-
2	4	-	+	-
3	2	-	+	-
4	1	-	+	-
5	0.5	+	+	-
6	0.25	+	+	+
7	0.125	+	+	+
8	0.0625	+	+	+
9	0.03125	+	+	+
10	0.015625	+	+	+
11	-	+	+	+
12	-	-	-	-

Bemerkung: +, Wachstum; -, kein Wachstum

MIC von 482: 1 µg/ml

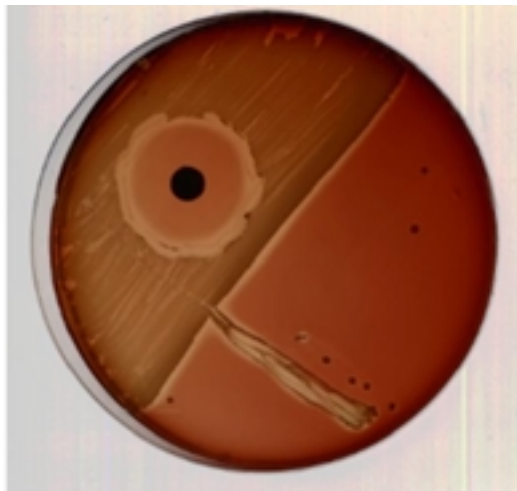
MIC von 270: > 8 µg/ml resistent

MIC von 255: 0.5 µg/ml

4. Induktion von PBP2a

Mit einem Wattestäbchen wird die Bakterien-Suspension vom Stamm 482 auf der einen Hälfte einer Blutagarplatte ausgestrichen. Mit einer Impföse wird die Suspension noch etwas ausgedünnt (fraktioniert), so dass man später einzelne Kolonien ausmachen kann. Auf die Hälfte mit den Bakterien wird ein Cefoxitin Disk (Cefoxitin ist ein Penicillin-Derivat) gelegt.

Wir erwarten nur PBP2a Produktion in den Bakterien nahe des Cefoxitin Disks. Die Bakterien, welche PBP2a produzieren, werden als induziert bezeichnet, die andern als nicht-induziert.



Figur 4: Schafblutplatte mit Stamm 482. In der ersten unverdünnten Fraktion wurde ein Cefoxitin Disk aufgelegt zur Induktion von PBP2a. Material wurde sowohl um den Cefoxitinhemmhof wie auch von der 2. uninduzierten Fraktion für den Nachweis von PBP2a entfernt. Klar kommt die haemolytische Aktivität des Stammes 482 durch Entfärbung der Blutplatte zutage.

Latex Agglutination zum Nachweis von PBP2a

Für den Nachweis von PBP2a durch Latex Agglutination im Stamm 482 werden Bakterien von der Hemmhofgrenze und von den weit entfernten Kolonien genommen. Zum Vergleich werden auch noch Agglutinationen mit den Bakterien von Stamm 270, der PBP2a konstitutiv bildet, und vom empfindlichen Stamm 255, der kein *mecA* Gen enthält und daher kein PBP2a produziert, ausgeführt.

Prinzip: man gibt Latex-Kügelchen, die mit anti-PBP2a Antikörpern beladen sind zu einer Bakterien Suspension. Die anti-PBP2a Antikörper bilden mit dem PBP2a einen Komplex, der als Niederschlag sichtbar ist. Ist kein PBP2a vorhanden, geschieht nichts.

Vorgehen:

Man gibt 4 Tropfen Extraktions Reagenz 1 in ein 1,5 ml Eppendorfröhrchen, dazu eine Impföse voll Bakterien. Die Suspension wird für 3 Minuten bei 95°C erhitzt und nachher wieder auf Zimmertemperatur abgekühlt, mit einem Tropfen Extraktionsreagens neutralisiert, und am Schluss noch für 5 Minuten bei 4500 rpm zentrifugiert.

Testkarte anschreiben (mit einem Ring für die Probe und einem für die Kontrolle).

Auf den ersten Ring kommt ein Tropfen Sensitized-Latex (mit PBP2a Antikörper beschichtete Latexkügelchen) und 50µl aus dem Eppendorfröhrchen, mit Plastikstäbchen vermischen. Auf den zweiten Ring kommt Control-Latex ohne Antikörper, sonst wie beim ersten Ring verfahren. Testkarte 3 Minuten von Hand schwenken, ist Niederschlag vorhanden?



Figur 5: Testkarte für Agglutination zum Nachweis von PBP2a. Ringe 1 und 2: Testung von *S. aureus* 270 der konstitutiv PBP2a bildet; Ringe 3 und 4: Testung eines isogenen empfindlichen Stammes. Ringe 1 und 3 wurden mit mit anti-PBP2a beschichteten Latexkügelchen getestet, Ringe 2 und 4 mit unbeschichteten Latexkügelchen.

Auswertung:

Bakterienstamm 270 (nicht induziert) bildet PBP2a konstitutiv → resistent gegen Methicillin und alle anderen Beta-Laktame.

Bakterienstamm 482 , nahe Hemmhof: induzierte Bildung von PBP2a → resistente Kolonien. Entfernte Kolonie: nicht induziert → keine Bildung von PBP2a → phaenotypisch nicht resistent.

Bakterienstamm 255 → keine Agglutination → nicht resistent

Anhang:**Kursanleitung**

Kapitel aus BBOM 9th: 3.7, 18.7, 18.8, 18.12

Links sind in der Kursanleitung 15 angegeben