

## Experiment 15: Pathogenic Staphylococci of the Nose

Mikrobiologie-Bericht von Susanne Müller, Simone Oberhänsli, Claudia Buser, Mirjam Balbi

### 1. Einleitung:

In unserem Praktikum befassten wir uns mit Staphylokokken (speziell mit *Staphylococcus aureus*). Diese Bakterien sind normale Besiedler der Haut und Schleimhäute. Etwa 10% aller gesunden Menschen tragen sie ohne dadurch beeinträchtigt zu werden. *Staphylokokken* können aber sehr wohl krank machen. Durch *Staphylokokken* ausgelöste Krankheiten sind v.a. Lebensmittelvergiftungen, Infektionen, Endocarditis und Osteomyelitis. *Staphylococcus aureus* ist ein opportunistisch pathogenes Bakterium, das heisst, dass es krankmachend sein kann, aber nicht muss. *S. aureus* dringt durch Wunden in den Körper ein und führt zu leichten bis schweren Infekten (s. oben). Gefürchtet wird er, da er multiple Antibiotikaresistenzen aufweisen kann und dadurch nur schwer zu bekämpfen ist.

Gegen Staphylokokken setzt man Antibiotika ein. Ein allgemeiner Wirkmechanismus eines Antibiotikums besteht darin, die Zellwandsynthese des Bakteriums zu stören. Die in diesen Experimenten gebrauchten Antibiotika beinhalten alle  $\beta$ -Lactame, welche an spezielle Querverbindungsproteine, sogenannte PBP (penicillin-binding protein), binden. Dadurch wird die Quervernetzung der Peptidoglycane reduziert und das Bakterium kann keine neue Wand mehr bilden. Es stirbt ab und lysiert. *Staphylokokken* haben insgesamt 4 PBPs. Durch Mutation, Transformation oder Konjugation können Bakterien aber antibiotikaresistent werden. Wir haben die *Staphylokokken* mit verschiedenen Tests phänotypisch (E-Test, Hemmhof, Bouillon) und biochemisch (Nitrocefintest, MRSA Screen) auf Resistenzen getestet. Dazu benutzten wir die folgenden vier Stämme:

BB255:	Empfindlicher <i>Staphylococcus aureus</i>
BB270:	Methicillin resistenter <i>S.aureus</i> (typischer MRSA)
CHE482:	Klinisches Isolat „Drogenklon“
BB582:	BORSA

### 2. Die verschiedenen Tests:

#### **Resistenzbestimmung mittels Disk Diffusion:**

Wir bestrichen eine MH-Platte mit einer Bakteriensuspension und stempelten danach Antibiotikaplättchen auf. Nach dem Inkubieren bei 37°C wurde der Hemmhofdurchmesser abgelesen (siehe Resultate).

#### **MHK Bestimmung mittels E-Test:**

Eine MH-Platte wurde homogen mit einer Bakteriensuspension bestrichen. Dann wurde sorgfältig ein Oxacillin-E-Test Streifen aufgelegt. Nach Inkubation bei 37 Grad konnte man die minimale Hemmkonzentration ablesen. Die MHK (minimale Hemmkonzentration) ist die Konzentration, bei der die Bakterien gerade nicht mehr wachsen.

#### **MHK Bestimmung mittels Microbouillon-Verdünnung:**

Für die ersten 10 Vertiefungen der Mikrotiterplatte stellten wir eine geometrische Verdünnungsreihe von Antibiotikum mit dem Faktor 2 her. Die Vertiefung 11 blieb ohne Antibiotikum (= Wachstumskontrolle), die Vertiefung 12 wurde nicht angeimpft (= Sterilitätskontrolle). Vertiefungen 1-11 wurden mit den verschiedenen Stämmen angeimpft und bei 37°C inkubiert. Nun konnte die MHK bestimmt werden. D.h. die Konzentration des Antibiotikums, bei der sich die Bakterien gerade nicht mehr vermehren können.

**Nitrocefintest = Nachweis der Penicillinase:**

Von den Stämmen CHE482 und BB583 wurde je eine Öse voll induzierter Bakterien (aus der Randzone des Amoxi-Clav Hofes) aufgenommen und in die bereitgestellten, Nitrocefingefüllten Röhrchen gegeben. Ein Farbumschlag nach rot zeigt  $\beta$ -Lactamase Aktivität an. (Die  $\beta$ -Lactamase ist ein Enzym, welches  $\beta$ -Lactame, also auch Penicillin, spalten kann. Sie kommt bei resistenten Stämmen vor.) Die  $\beta$ -Lactamase spaltet das Nitrocefin. Das Spaltprodukt hat eine andere Farbe, daher der Farbumschlag.

**MRSA Screen, PBP2a Agglutination = Nachweis von PBP2a:**

PBP2a ist ein zusätzliches PBP, welches eine viel niedrigere Affinität für  $\beta$ -Lactame als die zelleigenen PBP hat. Deswegen funktioniert PBP2a auch bei Methicillinkonzentrationen, bei welchen die PBP schon lange inaktiviert würde. Eine Quervernetzung ist also trotz Antibiotika noch möglich!

Getestet wurden alle vier Stämme. Für die Durchführung gab es eine Art „Baukasten“, in dem alles Notwendige bereits enthalten war. Vier Tropfen Extraktionsreagenz 1 wurden in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben. Eine Öse voll Bakterien wurde darin suspendiert und dann für 3 min auf 95°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde ein Tropfen Extraktionsreagenz 2 zugegeben und die Suspension wurde geschüttelt und zentrifugiert.

Auf den Testkarten sind pro Stamm zwei Kreise eingezeichnet. Für jeden Stamm gilt die gleiche Vorgehensweise: In den ersten Kreis gab man einen Tropfen Sensitized-Latex (enthält Antikörper für PBP2a), in den zweiten Kreis einen Tropfen Control-Latex (ohne Antikörper). Dann gab man zu beiden Kreisen je 50  $\mu$ l Überstand der vorher hergestellten Suspension. Nun wurde beobachtet, ob sich eine Agglutination bildet, d.h., ob PBP2a am Antikörper bindet. Folglich ist eine Agglutination ein Indiz für eine Resistenz dieses Stammes.

**3. Resultate:**

	E-Test	Bouillon	$\beta$ -Lactamase	PBP2a	Hemmhoftest							
					AM10		AMC		CIP-5		SXT	
<b>BB255</b>	0.125	6	nt	-	50	s	40	s	40	s	30	s
<b>BB270</b>	>256	>256	nt	+	15	r	15	r	32	s	30	s
<b>CHE482</b>	1	16	+	+	19	r	23	s	30	s	0	r
<b>BB583</b>	1	4	-	-	0	r	0	r	30	s	30	s

- **Legende:** nt = nicht getestet; r = resistent; s = sensitiv
- **Interpretation der MHK Werten nach NCCLS 2004:**  
 MHK Oxacillin für *S. aureus* empfindlich < 2  
 resistent > 4

## 4. Diskussion:

Aus den Resultaten konnte man ziemlich schnell klar erkennen, dass **BB255** keine Resistenz hat und auf alle 5 Tests sensitiv reagiert hat.

Bei **BB583** war die Sache schon weniger klar. Beim E-Test und beim Bouillon-Test wurden leichte Resistenzen festgestellt, obwohl diese bei den biochemischen Tests ( $\beta$ -Lactam, PBP2a) nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Dies ist dadurch zu erklären, dass Punktmutationen in den bakteriellen PBP vorkommen können, wodurch ein Bakterium resistent wird. Der Stamm BB583 wird zwar resistent, hat aber auch an Fitness verloren und wächst langsamer. Trotzdem können die vorhandenen Bakterien genügen, um beim Bouillon-Test ein positives Ergebnis auf Resistenz zu geben.

Der Bouillontest könnte aber auch sonst nicht ganz in Ordnung gewesen sein, da es auch bei dem völlig nicht-resistenten Stamm BB255 eine minimale Hemmkonzentration von 6  $\mu\text{g/ml}$  benötigte. Wahrscheinlich war das verwendete Oxacillin nicht mehr ganz frisch und funktionstüchtig.

Bei **BB270** war schon bei den phänotypischen Tests eine Resistenz klar sichtbar, welche dann durch den MRSA-Screen auch genetisch belegt werden konnte. BB270 besitzt also zusätzlich zu den normalen PB-Proteinen noch das mutierte PBP2a, was zur Resistenz führt.

Bei **CHE482** konnte eine Resistenz klar durch den Nitrocefintest und das MRSA-Screen nachgewiesen werden. Dieser Stamm enthält also nicht nur  $\beta$ -Lactamase, welche Penicillin abbauen kann, sondern auch noch PBP2a, wodurch der Zellwandaufbau auch bei Penicillin-vorkommen erfolgen kann!

Wichtig zu realisieren ist, dass nicht jeder Stamm über denselben Resistenzmechanismus verfügt und deshalb verschiedene Tests notwendig sind, bis man sagen kann, wie genau das Bakterium gegen das Antibiotika ankämpft.

### Quellen:

Praktikumsanleitung "Pathogenic Staphylococci of the Nose"

Brock biology of microorganisms (2003), 10th Edition, Michael T. Madigan

[www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)