

## Experiment 15: Staphylokokken

**VerfasserInnen:** Philip Rieder  
Christine Gutzwiller  
Lena Senn

**Betreuerin:** Brigitte Berger

### Einleitung

Staphylokokken sind normale Besiedler der Haut und Schleimhäute. 10% der gesunden Bevölkerung sind Träger von *Staphylococcus aureus* ohne krank zu werden.

Ziele dieses Experimentes sind das Testen von Stämmen auf Antibiotika-Resistenzen, Ermitteln der minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Antibiotikums und Nachweis zweier Resistenz-Mechanismen.

### Verwendete Stämme von *S. aureus*:

BB255 empfindlicher *S. aureus*  
BB270 Methicillin resistenter *S. aureus* (typischer MRSA)  
CHE482 klinisches Isolat "Drogenklon"  
BB583 BORSA

### Verwendete Antibiotika:

AM-10 Ampicillin  
Ox-1 Oxacillin  
AMC Amoxicillin-Clavulanate  
CIP-5 Ciprofloxacin  
SXT Bactrim

**Wirkung von Penicillin:** Es hemmt die Zellwandsynthese bei Bakterien, inhibiert die „Penicillin-Binding-Proteins“ (PBP), verhindert die Quervernetzung und führt somit zum lytischen Zelltod.

**Vorgestellte Resistenzmechanismen:** Bildung von Penicillinase, Exprimierung des PBP2a Genes.

### Experimente

#### Experiment 1: Resistenzbestimmung mittels Disk-Diffusion

Eine Agarplatte wurde gemäss Anleitung vorbereitet und während 24h bei 37°C inkubiert. Anhand der Hemmhofdurchmesser wurde bestimmt, ob die Bakterienstämme resistent oder sensitiv sind.

Resultate:

Stamm	BB255		BB270		CHE482		BB583	
	mm	Interpr.	mm	Interpr.	mm	Interpr.	mm	Interpr.
AM-10	40	Sensitiv	13	Resistent	16	Resistent	26	Resistent
Ox-1	24	Sensitiv	6	Resistent	20	Sensitiv	22	Sensitiv
AMC	42	Sensitiv	15	Resistent	22	Sensitiv	25	Sensitiv
CIP-5	30	Sensitiv	29	Sensitiv	25	Sensitiv	29	Sensitiv
SXT	29	Sensitiv	32	Sensitiv	5	Resistent	28	Sensitiv

**Experiment 2: MHK Bestimmungen mittels E-Test**

Gemäss Versuchsordnung wurden E-Test-Streifen mit einem Oxacillin-Konzentrationsgradienten auf die Agarplatten gelegt. Wo der Hemmhof die Teststreifen schneidet, kann die MHK abgelesen werden.

Resultate:

Stamm	BB255	BB270	CHE482	BB583
$\mu\text{g/ml}$	0,125	>256	0,75	1

**Experiment 3: MHK-Bestimmung mittel Microbouillon-Verdünnung**

Für jeden Bakterienstamm wurde in die Mikrotiterplatte nach Anleitung eine Verdünnungsreihe von Oxacillin mit dem Faktor 2 hergestellt. Die Konzentration in der aufsteigenden Konzentrationsreihe bei welcher keine Bakterien mehr wachsen, entspricht der MHK.

Resultate:

Stamm	BB255	BB270	CHE482	BB583
$\mu\text{g/ml}$	<0,5	256	<0,5	32

Bei beiden Diffusionsverfahren und der Microbouillon-Dilution ist der Stamm BB270 übereinstimmend resistent gegenüber Oxacillin. Die unterschiedlichen MHK von Stamm BB583 aus den Experimenten 2 und 3 resultieren aus den unterschiedlichen Wachstumserfolgen je nach Nährmedium (schlechteres Wachstum auf Agar als im Flüssigmedium).

**Experiment 4: Nitrocefintest, Nachweis der Penicillinase**

Mit diesem Verfahren kann der Resistenz-Mechanismus der Enzyymbildung von Penicillinase nachgewiesen werden. Die bakterielle Penicillinase kann Penicillin inaktivieren und wird praktisch nur in Anwesenheit von Penicillin produziert (induziert). So vermittelt sie Resistenz gegen Penicillin, nicht aber gegen die Penicillinase-festen Penicilline, wie Oxacillin. Ein Farbumschlag nach rot zeigt Beta-Lactamase Aktivität an.

**Experiment 5: MRSA Screen, PBP2a Agglutination, Nachweis von PBP2a**

Der Erwerb eines neuen Zielmoleküls PBP2a, das eine tiefere Affinität gegenüber Beta-Lactamen als die normalen PBPs aufweist, führt zu einer Resistenz gegen alle Beta-Laktame. Eine Testkarte wurde gemäss Anleitung vorbereitet. Zeigt das „Sensitized-Latex“ (mit Antikörpern) keine Agglutination, ist kein PBP2a vorhanden. Keine Agglutination am Control-Latex bei gleichzeitiger Agglutination am „Sensitized-Latex“ weist auf PBP2a hin. Vom Stamm CHE 482 wurden Bakterien vom Hemmhofrand des AMC Plättchens (induziert) aus Experiment 1 und von der Mitte des Rasens (uninduziert) genommen.

Resultate Experiment 4 und 5:

Stamm	Agglutination PBP2a	Nitrocefintest Farbumschlag
CHE482 uninduziert	Sehr langsam, ca. nach 3 min	Orange
CHE482 induziert	Sofortige Agglutination	Rot
BB583	Keine Agglutination	gelb
BB255	Keine Agglutination	Nicht getestet
BB270	Agglutination	Nicht getestet

Die Resultate des Agglutinations-Tests zeigen, dass der Stamm BB270 konstitutiv PBP2a herstellt, d.h. dass das Protein immer exprimiert wird. BB255 besitzt kein PBP2a, auch BB583 nicht, aber dieser Stamm ist intermediär Methicillin-resistent wegen Punktmutationen und Überexpressionen seiner eigenen PBPs. Beim Stamm CHE482 hingegen wird durch die Anwesenheit von Penicillin im Medium die Produktion von PBP2a in der Zelle induziert.

**Anhang** Chapters in BBOM 10th Edition: 4-8, 20.7, 20.8, 20.12, 24.3