

Gruppenbericht zu Experiment 15

Claudine Largo
Sabrina Dudli
Jeroen Affolter
Michael Seyffert

Untersuchung von Antibiotikaresistenzen des *Staphylococcus aureus*

Wir prüften mittels verschiedener Tests welche Stämme von *S. aureus* auf Antibiotika resistent sind. *Staphylococcus aureus* ist ein Bakterium, welches relativ weit verbreitet ist. Da es ziemlich unangenehme Wirkungen auf Menschen zeigt, wird es vor allem in Spitälern hartnäckig mit Antibiotika bekämpft. Oft jedoch sind diverse Stämme resistent gegen herkömmliche Antibiotika.

Resistenzbestimmung mittels Disk- Diffusion

4 Agarplatten wurden gemäss Anleitung mit Bakteriensuspension bestrichen und mit jeweils mit 5 Antibiotika- Plättchen bestempelt. Diese 5 Antibiotikas waren:

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

Die Platten wurden dann während 24 Stunden bei 37° Celsius inkubiert. Danach wurde der Hemmhofdurchmesser bestimmt, anhand dessen erkannt werden konnte, ob die Bakterienstämme resistent, intermediär oder sensitiv auf das entsprechende Antibiotikum sind.

Resultate:

Stamm	BB255		BB270		CHE482		BB583	
	mm	Interpr.	mm	Interpr.	mm	Interpr.	mm	Interpr.
AM-10	0	Resistent	14	Resistent	14	Resistent	10	Resistent
Ox-1	-	-	-	-	-	-	-	-
AMC	~50	Sensitiv	17	Resistent	20	Sensitiv	28	Sensitiv
CIP-5	~50	Sensitiv	27	Sensitiv	30	Sensitiv	20	Intermediär
SXT	~30	Sensitiv	24	Sensitiv	0	Resistent	32	Sensitiv

Ox-1 konnte nicht bestimmt werden, da das Oxacillinplättchen nicht mehr aktiv war. Alle Stämme zeigten Resistenz, obwohl bei Stamm BB255 und einigen anderen Stämmen eine sensitive Reaktion erwartet wurde.

MHK Bestimmung mittels E-Test

Analog zum obigen Test wurden 4 Agar-Platten vorbereitet und mit denselben Bakteriensuspensionen bestrichen. Auf die Platten wurden dann Oxacillin-E-Test Streifen gelegt.

Die Platten wurden 24 Stunden bei 37° Celsius inkubiert und abgelesen.

Resultate:

Stamm	BB255	Interpr.	BB270	Interpr.	CHE482	Interpr.	BB583	Interpr.
_g/ml	0.125	Sensitiv	256	Resistent	1	Sensitiv	2	Sensitiv

NB: Die Interpretationen sind gemäss MHK Werten der NCCLS 2004.

Fazit: Nur Stamm BB270 war nach dem E-Test Oxacillin resistent.

MHK Bestimmung mittels Microbouillon-Verdünnung

Eine Mikrotiterplatte wurde mit 4 Verdünnungsreihen (mit Faktor 2) des Antibiotikums (Oxacillin) beschickt. Dann wurden die 4 Bakterienstämme auf je eine Verdünnungsreihe verteilt. Auch hier wurde die Platte während 24 Stunden bei 37°Celsius inkubiert.

Resultate:

Stamm	BB255	Interpr.	BB270	Interpr.	CHE482	Interpr.	BB583	Interpr.
_g/ml	2	Sensitiv	256	Resistent	8	Resistent	32	Resistent

Fazit: Ausser Stamm BB255 waren alle anderen Stämme Oxacillin-resistent. Man konnte bei den Stämmen CHE482 und BB583 eine deutliche Abweichung der Resultate des Microbouillon-Tests im Vergleich zu den anderen Tests feststellen, was uns vermuten liess, dass es sich dabei um einen eher ungenauen Test handelt, oder dass die Oxacillinstammlösung an Aktivität verloren hatte.

Nitrocefintest zum Nachweis der Penicillinase

Mit diesem Verfahren wurde der Resistenz-Mechanismus zur Enzymbildung nachgewiesen. Penicillinase inaktiviert Penicillin und wird induziert - das heisst, die Penicillinase wird fast nur in Anwesenheit von Penicillin produziert. Getestet wurden CHE482 und BB583.

Eine Oese voller Bakterien wurde jeweils in der Nähe des Amoxi-Clav-Hofes aufgenommen und in Nitrocefin suspendiert. Ein Farbumschlag zeigt Beta-Lactamase Aktivität an. Folgendes ist passiert:

	Beim Amoxi-Clav-Hof	Entfernt vom Amoxi-Clav Hof
CHE482	Rot, nach ca. 1-3 Minuten	Rot, nach ca. 5 Minuten
BB583	Nichts	Nichts

Fazit: Stamm CHE482 besitzt eine induzierbare beta-Lactamase. Stamm BB583 besitzt keine beta-Lactamase.

MRSA Screen, PBP2a Agglutination = Nachweis von PBP2a

Problem:

Die *methicillin-resistenten* Staphylokokken sind gegen Penicillin und alle andern beta-Lactame resistent. Das Antibiotikum wird zwar nicht zerstört, doch verliert es

jegliche Auswirkungen auf den **Methicillin-resistenten-*Staphylococcus aureus* (MRSA)**. Die Resistenz ist dem *mecA*-Gen zuzuschreiben, welches für das Penicillin-bindende Protein PBP2a codiert. Die Affinität zu beta-Lactamen ist beim PBP2a viel niedriger als die des zelleigenen *PBPs*, was dazu führt, dass das *PBP2a* bei hoher Methicillin-Konzentration noch funktioniert, währenddem die zelleigenen *PBPs* inaktiviert werden. Resistenzen gegen Antibiotika können auch durch Mutationen entstehen.

Um das *PBP2a* und somit das *mecA*-Gen in den Stämmen nachzuweisen, wurden folgende Schritte unternommen:

Vorgehen:

Stämme: CHE 482 , BB583, beide induziert.

Mit einem Plastikstab wurde eine kleine Menge Bakterien eines Stammes in je eine mit 4 Tropfen Extraktionslösung vorbereitete Eppendorf-Tube gegeben und während 3 min auf 95° erhitzt. Danach auf Raumtemperatur abgekühlt und mit der Zugabe eines Tropfens einer neutralisierenden Lösung für 5 min bei 4500 rpm zentrifugiert. Auf einer Testkarte wurde die Latex Agglutination vorbereitet: Zuerst ein Tropfen eines Sensitiv-Latex, welcher mit PBP2a-Antikörper beschichtet ist, dann ein Tropfen Kontroll-Latex und 50 µl des Überstandes der Suspension.

Bildete sich eine Agglutination, haben sich die PBP2a-Antikörper mit den PBP2a verbunden, was einen positiven Nachweis der Resistenz ergab.

Resultate:

BB 583 ergab keine Agglutination: PBP2a- Nachweis negativ.

CHE 482 ergab Agglutination: Dieser Stamm verfügt über PBP2a und ist somit ein MRSA.

(BB255 ist sensitiv auf alle Antibiotika und BB270 ist ein typischer MRSA und verfügt daher über PBP2a)