

15a. Antibiotika-Resistenz bei Staphylokokken

VerfasserInnen: Andrea Glaser, Satu.Glaser@access.unizh.ch
 Anna Furrer, anna_furrer@gmx.ch
 Tanja Scherrer, tanja_scherrer@gmx.ch
 Susana Franco, mfranco@dplanet.ch

Betreuerin: Brigitte Berger-Bächi, bberger@immv.unizh.ch

Es gibt 4 Möglichkeiten, die Resistenzmechanismen von Bakterien nachzuweisen:

1. Messen der Resistenzhöhe
2. Nachweisen des Enzyms des Resistenzmechanismus
3. Nachweisen des Proteins des Resistenzmechanismus
4. Nachweisen der DNA-Sequenz des Resistenzgens

Wir haben mit den Stämmen

BB255 empfindlicher *Staphylococcus aureus*
 BB270 Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*
 BB1621 klinisches Isolat "Drogenklon"
 BB1685 klinisches Isolat "BORSA"
 BB935 multiresistenter MRSA

die ersten drei Nachweise durchgeführt.

Staphylococcus aureus ist ein Bakterium, das beim Menschen auf der Haut, den Schleimhäuten und im Genitaltrakt vorkommt. Ungefähr 10% der Menschen haben dieses Bakterium ohne aber krank zu werden.

Messen der Resistenz durch Hemmhofbestimmung mit verschiedenen Antibiotika

Für diesen Nachweis haben wir den Stamm BB935 (multiresistenter MRSA) gebraucht.

Wir haben eine 0.5 McFarland Suspension in physiologischer NaCl hergestellt und damit MH-Platten bestrichen. Dann wurden die Antibiotikaplättchen aufgestempelt. Nach der Inkubation während 24h bei 37°C haben wir die Hemmhöfe gemessen.

<i>Antibiotikum</i>	<i>Interpretation des Hemmhofes nach NCCLS [mm]</i>			<i>Durchmesser des Hemmhofs in mm</i>	<i>Interpretation</i>
	Resistent	intermediär	sensitiv		
Ampicillin	<28	--	>29	12	resistent
Oxacillin	<10	11-12	>13	15	sensitiv
Gentamycin	<12	13-14	>15	6	resistent
Tetracyclin	<14	15-18	>19	8	resistent
Erythromycin	<13	14-22	>23	6	resistent
Ciprofloxacin	<15	16-20	>21	25	sensitiv

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mittels E-Test und mittels Microbroth-Dilution

E-Test

Wir haben pro Stamm eine MH-Platte mit einer 0.5 McFarland Bakteriensuspension bestrichen und dann einen Oxacillin-E-Test Streifen aufgelegt. Nach Inkubation von 24h bei 37°C konnte man die minimale Hemmkonzentration (MHK) ablesen.

Microbroth-Dilution

Wir haben eine 0.5 McFarland Lösungen 1:100 in 2 ml Bouillon verdünnt und damit die Mikrotiterplatte beschickt, in der wir eine Verdünnungsreihe vom Antibiotikum mit dem Faktor 2 vorgelegt haben. Die Verdünnungsreihe ging von 16-0.03 Mikrogramm Oxacillin pro ml.

<i>Stämme</i>	<i>E-Test [Mikrogramm/ml]</i>	<i>Bouillon-Dilution [Mikrogramm/ml]</i>	<i>Interpretation</i>
BB255	0.13	1	sensitiv
BB270	>256	>16	resistent
BB1621	1	2	sensitiv
BB1685	0.25	0.25	sensitiv

Interpretation nach NCCLS: MIC von Oxacillin [Mikrogramm/ml] für

S. aureus: resistent > 4
 sensitiv < 2

Nachweis von PBP2a durch MRSA Screen (PBP2a Agglutination)

PBP2a ist ein Penicillin-Bindeprotein, an das beta-Lactame nicht binden können. Es ist ein sehr wirksamer Resistenzmechanismus gegen alle Arten von beta-Lactame.

Blutplatten

positiv Kontrolle: BB270 (konstitutive PBP2a Synthese)
negativ Kontrolle: BB255

Blutplatten mit Cefoxitin-disk

BB1621
BB1685

Wir haben einige Bakterien aller Stämme aus der Randzone (induzierte Bakterien) genommen und in einem Eppendorf tube mit 4 Tropfen **Extraction-Reagent 1** getan. Diese Suspensionen haben wir 3 min lang bei 99°C erwärmt und dann in Eis abgekühlt. Dadurch wurde die Zellwand der Bakterien aufgebrochen. Danach haben wir es mit **Extraction-Reagent 2** neutralisiert und zentrifugiert. Den Ueberstand, in welchem sich die Proteine der Bakterien befinden, haben wir mit **Sensitized-Latex** und mit **Control-Latex** vermischt.

Auf dem **Sensitized-Latex** befinden sich Latex-Kügelchen mit Antikörpern, die PBP2a binden und dadurch eine Agglutination verursachen. Im **Control-Latex** befinden sich nur Latex-Kügelchen ohne Antikörper.

<i>Stamm</i>	<i>Agglutination [min]</i>	<i>Bemerkung</i>
BB270	Nach 0.5 min	konstitutive PBP2a Produktion
BB255	keine Agglutination	kein PBP2a
BB1621	Nach 0.5 min	induzierte PBP2a Produktion
BB1685	keine Agglutination	kein PBP2a

Im **Stamm BB270** wird das PBP2a konstitutiv exprimiert, d.h., dass das Protein immer exprimiert wird. Der Stamm BB270 ist resistent gegen Oxacillin und allen anderen Betalactame, es ist ein Methicillin-resistenter *S. aureus* (MRSA), da er das *mecA* Gen trägt, das für PBP2a kodiert.

Im **Stamm BB1621** wird das PBP2a nur exprimiert, wenn ein induzierendes Antibiotikum vorhanden ist, in diesem Fall wurde Cefoxitin verwendet. Im Resistenztest war dieser Stamm Oxacillin empfindlich, da das PBP2a durch Oxacillin nicht schnell genug induziert werden konnte um genügend hohe Resistenz zu vermitteln. Stamm BB1621 gilt dennoch als MRSA, da er ebenfalls das *mecA* Gen besitzt, das für PBP2a kodiert.

Durch Mutation der eigenen PBP kann ebenfalls eine, aber nur sehr niedrige, beta-Lactam Resistenz erworben werden.

Es gibt noch einen weiteren Resistenzmechanismus, der auf Penicillinase, ein Enzym, das Penicillin inaktivieren kann, beruht. Dieses Enzym wird in Anwesenheit von Penicillin produziert (induziert) und vermittelt Resistenz gegen Penicillin, nicht aber gegen die Penicillinase-festen Penicilline, wie Methicillin, Oxacillin und weitere.

Stamm BB1685: hat Penicillinase.

Resistent gegen Penicillin, aber empfindlich auf Methicillin.

Stamm BB1621: hat Penicillinase und PBP2a.

Resistent auf Penicillin. Und wenn induziert, kann der Stamm resistent auf Methicillin u.a. werden.

15b. Antibiotikaresistenz bei *Staphylococcus aureus*

Verfasser: Alex Butschi, s0170327@access.unizh.ch
 Johann Almendinger, s0170031@access.unizh.ch

Betreuerin: Brigitte Berger-Bächi, bberger@immv.unizh.ch

1. Ziel des Experiments

1. Bestimmung der Resistenz eines multiresistenten Bakterienstammes zu verschiedenen Antibiotika.
2. Bestimmung der Minimalen-Hemm-Konzentration (MHK) von Oxacillin an vier verschiedenen Stämmen.
3. Nachweis der Penicillinase: β -Lactamase in resistenten Stämmen und damit in Zusammenhang:
4. Nachweis des resistenten Penicillin bindenden Proteins PBP2a

2. Verwendete *Staphylococcus aureus* Stämme

BB255 empfindlicher *Staphylococcus aureus*
 BB270 Methicillin resistenter *S. aureus* (typischer MRSA)
 BB1621 klinisches Isolat "Drogenklon"
 BB1685 klinisches Isolat "BORSA"
 BB935 multiresistenter MRSA

3. Methoden

a) Disk Diffusion am Stamm BB935

Eine MH-Platte wurde mit dem Stamm BB935 bestrichen und mit sechs verschiedenen Antibiotikaplättchen bestempelt. Nach 24h Inkubation bei 37°C wurde der Hemmhofdurchmesser gemessen.

Tabelle 1: MHK verschiedener Antibiotika für Stamm BB935

Abkürzung	Antibiotikum	Interpretation des Hemmhofs nach NCCLS [mm]			Ø Hemmhof [mm]	Interpretation
		resistent	intermediär	sensitiv		
AM-10	Ampicillin	≤ 28	-	≥ 29	15	resistent
Ox-1	Oxacillin	≤ 10	11-12	≥ 13	13 Kolonien im Hof	resistent
GM-10	Gentamycin	≤ 12	13-14	≥ 15	8	resistent
TE-30	Tetracyclin	≤ 14	15-18	≥ 19	8	resistent
E-15	Erythromycin	≤ 13	14-22	≥ 23	-	resistent
CIP-5	Ciprofloxacin	≤ 15	16-20	≥ 21	30	sensitiv

b) Bestimmung der MHK durch E-Test und Microbroth-Dilution

Die Minimale-Hemm-Konzentration ist diejenige Konzentration von Antibiotika (hier: Oxacillin), die gerade benötigt wird, um einen Stamm an seinem Wachstum zu hemmen.

E-Test: Beim E-Test wird ein Oxacillin-E-Test Streifen auf eine MH-Platte, wie in a), mit dem jeweiligen Stamm bestrichen und inkubiert. Die vorgefertigten Streifen sind mit verschiedenen Oxacillin-Konzentrationen beschichtet, die von einem Ende des Streifens zum anderen kontinuierlich abnehmen. Die MHK liess sich am Schnittpunkt des Hemmhofs mit dem E-Test Streifen ablesen.

Microbroth-Dilution: Im Versuch wurde eine lineare Verdünnungsreihe von Oxacillin mit dem Faktor 2 hergestellt.

Die grösste Verdünnung von Oxacillin wo *S.aureus* nicht mehr wuchs entsprach der MHK. Die MHK [$\mu\text{g/ml}$] sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Oxacillinresistenz-Bestimmung mittels E-Test und Bouillondilution [$\mu\text{g/ml}$]

<u>Stämme:</u>	BB255	BB270	BB1621	BB1685
E-Test	0.125	>256	1.5-1.0	0.5
Bouillon-Dilution	0.25	>16	0.5	1

Interpretation:

Beim Stamm BB270 konnte die Hemmkonzentration nicht bestimmt werden → die Werte sind höher als die vorgelegte Oxacillinkonzentration! Er ist resistent gegen Oxacillin. Beim Stamm BB255 ist die MHK klein → empfindlicher Stamm. Bei BB1621 und BB1685 liegen die MHK etwas höher als bei BB255.

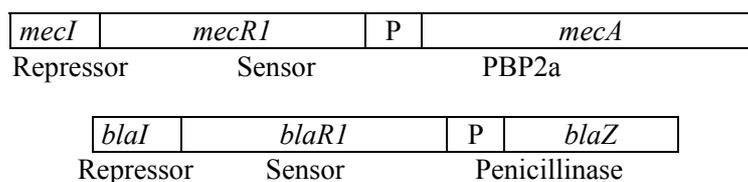
c) Nachweis der β -Lactamase Aktivität → Nitrocefin-Test und evtl. Vorhandensein von PBP2a → Agglutinationstest

Nitrocefin-Test: In diesem Test wurden die beiden klinischen Isolate BB1621 / BB1685 auf das Vorhandensein der β -Lactamase getestet. Es wurde jeweils mit Cefotoxin induzierte und nicht induzierte Stämme in Nitrocefin resuspendiert. Ein Farbumschlag nach rot zeigt β -Lactamase Aktivität an.

Ergebnis: Die Cefotoxin induzierten Stämme zeigten einen Farbumschlag nach rot. Sie tragen somit das β -Lactamase-Gen und sind dadurch resistent. Beim Stamm BB1621 war ein rascher Farbumschlag erkennbar, bei BB1685 etwas langsamer.

Auch die PBP2a Expression wurde zusammen mit β -Lactamase induziert (siehe Figur 1).

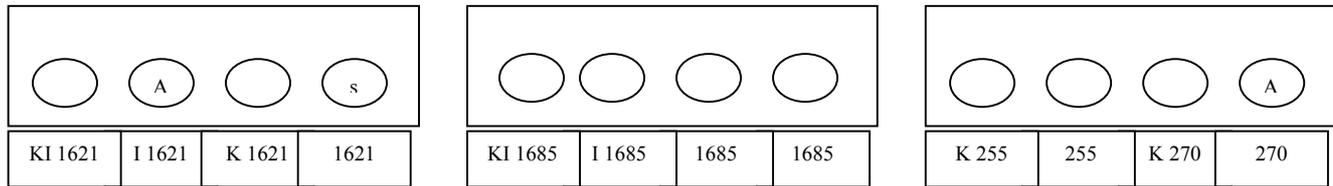
Figur 1: Genorganisation der Methicillin-Resistenzdeterminante und der β -Lactamase



Der Nitrocefin-Test zeigt, dass BB1621 und BB1685 beide das β -Lactamase Gen tragen, die Frage ist nun, ob sie auch das *mecA* Gen für PBP2a im Genom tragen. Der folgende Test schafft Klarheit.

Agglutinationstest: Hier werden Latexkügelchen die mit PBP2a spezifischen Antikörper beschichtet sind verwendet. Wenn nun eine Bakteriensuspension das *mecA* Gen exprimiert, werden die Antikörper an PBP2a binden \Rightarrow sichtbare Agglutination (siehe Figur 2)

Figur 2: Agglutination von PBP2a



K : Kontrolle ohne Latexkügelchen mit dem spezifischen Antikörper

I : Cefotoxin induzierter Stamm

A : Agglutination hat stattgefunden \Rightarrow PBP2a im Genom vorhanden

s : schwache Agglutination \Rightarrow der uninduzierte Stamm BB1621 zeigt auch schwache Agglutination

4. Interpretation:

Beim Stamm BB1621 induziert das Cefotoxin die *mecA* bzw. *blaZ* Expression. Der Stamm trägt an seiner Zellwand einen Cefotoxin erkennenden Sensor (MecR1; BlaR1) der bei einer Bindung mit dem Antibiotika ein Signal (Zn-Peptidase) freilässt. Die Zn-Peptidase spaltet nun den Repressor (MecI; BlaI), der auf dem Promotor des Operons (β -Lactamase Gen; *mecA*; s. Skizze oben) sitzt \Rightarrow Das Operon ist frei zur Transkription.

Beim Stamm BB270 handelt es sich um eine konstitutive Expression von *mecA*, d.h. der Repressor ist entweder inaktiv oder nicht vorhanden.

5. Antworten zu den Fragen

a) Wie kommt eine konstitutive Expression von *mecA* (PBP2a) zustande?

1. Entweder ist kein Repressor für den Promotor mehr vorhanden, oder er ist mutiert.
2. Der Promotor ist mutiert, so dass der zwar vorhandene Repressor nicht mehr binden kann.

b) Kann Penicillin auf ruhende Staphylococcen wirken?

Penicillin kann nicht an ruhenden Zellen wirken, denn:

Penicillin inhibiert PBP, das die Quervernetzung des Peptidoglycans in der Bakterienzellwand katalysiert. In ruhenden Zellen werden keine neuen Zellwände gebildet, und somit muss kein Peptidoglycan vernetzt werden. \Rightarrow PBP wird in diesem Stadium nicht gebraucht.

6. PBP / PBP2a im Vergleich

- β -Lactam-Antibiotika inhibieren PBP \Rightarrow keine Vernetzung der Zellwand. Das Bakterium stirbt.
- Wenn das Resistenzgen *mecA*, das PBP2a codiert, vorhanden ist, wird ein zusätzliches Enzym für die Vernetzung gebildet. Dies lässt sich nicht mehr von β -Lactam-Antibiotika inhibieren.