

## Medizinische Mikrobiologie Antibiotikaresistenz bei *Staphylococcus aureus*

Verfasserinnen: Luzia Gafner  
Marianne Heberlein  
Claudia Bader

Betreuerin: Brigitte Berger-Bächi, [bberger@immv.unizh.ch](mailto:bberger@immv.unizh.ch)

*Staphylococcus aureus* ist ein Besiedler der Haut und der Schleimhäute bei 10% der gesunden Bevölkerung. Bei Wunden oder Abwehrschwächen, kann es trotzdem zu Infektionen kommen. Es gibt zwei Typen von Resistenzen: - Penicillinase  
- PBP2a

### Vorgehen

Mit verschiedenen Experimenten bestimmten wir den Mechanismus und den Grad der Oxacillin Resistenz verschiedener Stämme. Diese Stämme waren BB255, BB270, CHE482 und BB583.

1. Resistenzbestimmung mittels Disk Diffusion

Agarplatten wurden mit einem Wattepinsel mit einer 0,5Mc Farland Bakteriensuspension homogen bestrichen und dann mit Antibiotikaplättchen bestempelt. Danach wurden sie 24h bei 37 Grad inkubiert.

Anhand des Hemmhofdurchmessers wurde der Grad der Sensitivität oder der Resistenz gemessen.

2. MHK Bestimmung mittels E-Test

Erneut wurden Agarplatten homogen mit der Bakterienlösung bestrichen. Anschliessend wurde ein Oxacillin-E-Test aufgelegt, anhand dessen nach 24h Inkubation bei 37 Grad, die minimale Hemmkonzentration abgelesen werden konnte.

3. MHK Bestimmung mittels Microbouillon-Verdünnung.

Die Mikrotiterplatte wurde in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit Antibiotika mit dem Faktor 2 beschickt. Begonnen haben wir bei 256 µg Oxacillin pro ml, die stärkste Verdünnung betrug 0,25 µg pro ml. Es wurden auch eine Wachstumskontrolle und eine Sterilitätskontrolle durchgeführt. Wieder wurde unter denselben Bedingungen inkubiert. Darauf konnte wieder die minimale Hemmkonzentration, diesmal anhand des Niederschlags, bestimmt werden.

### MHK Bestimmung mittels Microbouillon- Verdünnung

Verdünnung in µg/ml

		256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25		
	A													
BB255	B										x	X		
	C													
CHE482	D											X		
	E													
BB270	F	x	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	G													
BB583	H						x	x	X	X	X	X		

Aus obiger Tabelle kann man die MHK der einzelnen Stämme ablesen.

BB255	1µg/ml
CHE482	0,5µg/ml
BB270	> 256 µg/ml und
BB583	16 µg/ml

**Nitrocefintest = Nachweis der Penicillinase**

Mit den Resistenzplatten der Stämme CHE482 und BB583 wurde der Nitrocefintest durchgeführt. Induzierte und nichtinduzierte Bakterien wurden mit Nitrocefin resuspendiert, wobei ein Farbumschlag nach rot eine Beta- Lactamase Aktivität anzeigte.

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

Wir benutzten die Stämme CHE482 induziert, CHE482 nicht induziert und BB583. Wir gaben eine Öse voller Bakterien zu 4 Tropfen einer vorgegebenen Extraktionslösung, erhitzen 3min auf 95 Grad und kühlten das Ganze danach mit Eis ab. Nach der Zugabe einer neutralisierenden Lösung zentrifugierten wir die Suspension für 5min bei 4500rpm. Auf Testkarten gaben wir zuerst einen Tropfen mit PBP2a Antikörper beschichteten Sensitiv- Latex auf alle geraden Felder und dann einen Tropfen Control-Latex auf alle ungeraden Felder. Daraufhin gaben wir 50µl des Überstandes dazu. Eine Agglutination zeigte PBP2a an.

Protokoll PBP2a und Penicillinase

Stamm	Agglutination PBP2a (min)	Nitrocefintest Farbumschlag
CHE482 uninidiziert	-----	+
CHE482 induziert	++	+++
BB582 induziert	-----	-----

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

Stamm	BB255	BB255	BB270	BB270	CHE482	CHE482	BB583	BB583
	mm	Inter-pretation	mm	Inter-pretation	mm	Inter-pretation	mm	Inter-pretation
AM-10	49	s	11	r	15	r	24	r
Ox-1	40	s	----	r	15	s	10	r
AMC30	42	s	16	r	23	s	33	s
CIP-5	25	s	30	s	33	s	33	s
SXT	30	s	30	s	-----	r	33	s
OxacillinMHK nach E-Test								
µg/ml	0,15		>256		0,75		2	
OxacillinMHK nach Microbouillon-dilution								
µg/ml	0,75		>256		<0,5		16	

## Diskussion

Resistenz Strategien:           Modifikation des Antibiotikums durch Abbau und Modifikation  
Modifikation des Zielmoleküls  
Modifikation, neues unempfindliches Zielmolekül  
Blockierung des Zutritts  
Permeabilitätsbarriere und Export

Resistenzbestimmung:       Phänotypisch: Resistenzhöhe  
genotypisch: Gen, Resistenzmechanismus  
biochemisch: Genprodukt, Enzym

Beta-Lactam Antibiotika sind potente Inhibitoren der Zellwandsynthese. Jene Enzyme, die die Glykanketten der Bakterienzellwand vernetzen (Transpeptidasen) binden an Antibiotika mit Beta-Lactam Ringen. Die Enzyme können nach der Bindung an den Beta-Lactam-Ring die Transpeptidase Reaktion nicht mehr katalysieren. Dadurch wird die Zellwand zwar gebildet, aber nicht mehr vernetzt. Ausserdem stimuliert der Antibiotika PBP-Komplex die Freisetzung von Autolysinen, die die bestehende Zellwand verdauen, was zur Lyse führt. Die Zellwand kann dem osmotischen Druck wegen fehlenden Vernetzungen nicht mehr standhalten. Die Bakterien erlangen Resistenz dank des *mecA* Gens, das für ein zusätzliches Penicillin bindendes Protein codiert, genannt PBP2a. Die Affinität zu Beta-Lactamen ist viel kleiner als jene der zelleigenen PBPs wodurch PBP2a auch bei hohen Methicillinkonzentrationen noch funktioniert bei denen zelleigene PBPs inaktiv sind. Die Penicillinase zerschneidet das Antibiotika.

## Diskussion der einzelnen Stämme

BB255 reagiert auf alle Antibiotika sensitiv.

BB270 hat eine Resistenz entwickelt gegen Ampicillin, Oxacillin und AMC. Er ist ein typischer MRSA und besitzt daher PBP2a.

CHE482 ist resistent gegen Ampicillin und Bactrim. Er verfügt über Penicillinase und über PBP2a. Er ist genotypisch ein MRSA dies kann phänotypisch aber nicht festgestellt werden. Dieser Stamm ist als Drogen MRSA bekannt.

BB583 ist resistent gegen Ampicillin und Oxacillin, besitzt aber keine Penicillinase und kein PBP2a. Er wächst schlecht und hat trotzdem eine gewisse Resistenz entwickelt, durch Mutationen.