

Pathogene Staphylokokken in der Nase: Molekulare Diagnostik und Antibiotikaresistenz

Verfasser: Fabienne Klaus
Thomas Hauser
Sarah Nötzli
Sabrina Schäublin

Betreuerin: Prof. Dr. Brigitte Berger-Bächi

Zielsetzung:

Von 4 Stämmen von *Staphylococcus aureus* wurde die Antibiotikaresistenz getestet, indem die minimale Hemmkonzentration sowie die Art der Resistenz bestimmt wurden. In unserem Falle wurden sie auf PBP2a (Synthese eines modifizierten PBP's) sowie auf Penicillinase getestet.

Vorgehen:

Als erstes wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) von den Stämmen BB255, BB270, CHE482, BB583 mit folgenden Methoden bestimmt:

- a) Disk Diffusion: Der Agarnährboden wurde mit einem Wattepinsel, der in eine 0.5 McFarland-Bakteriensuspension getaucht worden ist, homogen bestrichen und mit Papierscheiben, die verschiedene Antibiotika (Ampicillin, Oxacillin, Amoxicillin-Clavulanat, Ciprofloxacin und Bactrim) enthalten, bestempelt und 24 h bei 37 Grad inkubiert. Anhand vom Hemmhofdurchmesser wurde der Resistenzgrad bestimmt.
- b) E- Test: Agarnährböden wurden homogen bestrichen und mit einem Oxacillin-E-Test Streifen versehen. 24 h bei 37 Grad inkubiert. Die MHK wurde auf dem E-Test-Streifen abgelesen.
- c) Mikrobouillon-Verdünnung: Die 0.5 McFarland Bakteriensuspension wurde 1:100 in 2 ml Bouillon verdünnt. Anschliessend wurde eine geometrische Verdünnungsreihe von Oxacillin mit dem Faktor 2, beginnend bei 256 $\mu\text{g ml}^{-1}$ hergestellt und mit der Bakteriensuspension beimpft. 24 h wurde bei 37 Grad inkubiert. Je nach Vorhandensein eines Bodensatzes (Bakterien) konnte die MHK bestimmt werden.

In einem zweiten Schritt wurden die oben genannten Stämme auf Penicillinase und PBP2a getestet:

- d) Nitrocefintest: Mit diesem Test konnte nachgewiesen werden, ob die getesteten Stämme das Enzym Penicillinase enthalten. Getestet wurden nur die Stämme CHE482

und BB583, da die Antibiotikumresistenz dieser Stämme noch unbekannt war. Von beiden Stämmen wurde je eine induzierte und eine uninduzierte Probe in Nitrocefin aufsuspendiert. Nach einiger Zeit war bei den Stämmen, welche das Penicillinase-Enzym enthielten ein Farbumschlag ersichtlich.

- e) PBP2a- Nachweis mit Agglutination-Testkarten: Unter Mixen, Erwärmen und Abzentrifugieren wurden die Stämme mit Hilfe von Extraktionsreagenzien auf Agglutination getestet. Dazu wurden je ein Tropfen Control-Latex und Sensitized-Latex mit 50 µl Testsuspension auf einer Testkarte vermischt.

Auswertung:

Die Auswertung oben genannter Tests ist aus nachfolgenden Tabellen ersichtlich und wird anschliessend noch kurz kommentiert:

Stamm Nr.	E-Test (µg/ml)	Bouillon (µg/ml)	Nitrocefin-Test	PBP2a
255	0.19 / 0.2	4.0	-	-
270	>256.0	>256.0	-	agglutiniert
482	3.0 / 2.0	16.0	induziert	agglutiniert
583	0.125 / 1.5	4.0 / 128.0	-	-

Resistenzbestimmung mittels Disk Diffusion – Hemmhofdurchmesser:

Stamm	BB255		BB270		CHE482		BB583	
	mm	Interpretation	mm	Interpretation	mm	Interpretation	mm	Interpretation
AM-10	40	sensitiv	18	resistent	14	resistent	36	sensitiv
AMC	44	sensitiv	12	resistent	16	resistent	24	sensitiv
CIP-5	36	sensitiv	32	sensitiv	28	sensitiv	30	sensitiv
SXT	26	sensitiv	30	sensitiv	0	resistent	30	sensitiv

Stamm BB255 war ein empfindlicher *Staphylococcus aureus* und zeigte somit kaum Resistenz in den Tests. Die Durchmesser bei der Resistenzbestimmung mittels Disk Diffusion, wiesen bei allen 4 verschiedenen Antibiotika auf Sensitivität hin.

Stamm BB270 war ein Methicillin resistenter *S. aureus*. Er zeigte bei der Disk Diffusion bei Ampicillin und Amoxicillin-Clavulanat Resistenz und bei Ciprofloxacin und Bactrim

reagierte er sensitiv. Es handelt sich um eine konstitutive Expression von *mecA* und er produziert PBP2a.

Stamm CHE 482 ist nach unseren Erkenntnissen resistent gegen Ampicillin, AMC und Bactrim. Er verfügt über PBP2a und das Enzym Penicillinase, beide sind induzierbar durch Beta-Lactame.

Stamm BB583 zeigt keine Resistenzmechanismen, es gab weder einen Farbumschlag (keine Penicillinase) noch konnte eine Agglutination (kein PBP2a) beobachtet werden. Es muss sich um eine Mutante handeln, denn beim Bouillon-Test zeigte er doch eine gewisse Resistenz gegenüber Oxacillin, die vermutlich auf anderen Proteinen beruht.