KSA Kantonsspital Aarau

Detektivarbeit in der Mikrobiologie
Wie findet wir resistente Erreger?

Michael Oberle, IfLM, Mikrobiologie

Detektivarbeit in der Mikrobiologie

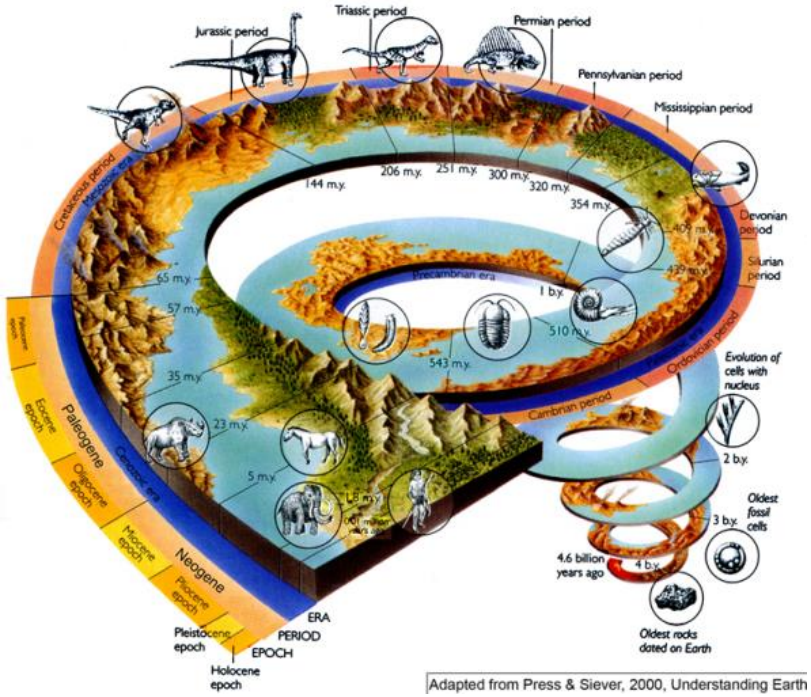
- Was bedeutet 'Resistenz' und wie entsteht sie?
- Wer sind die üblichen Verdächtigen? → Eine kurze Übersicht.
- Mit welchen Methoden erwischen wir diese Verdächtigen im Labor?
- Worauf beruht unsere Erkenntnis/ unser Wissen?
- Kriminal-Fälle
- Fazit

1. Was bedeutet „Multiresistenz“?

Resistenz bedeutet, dass Bakterien gegenüber bestimmten Antibiotika unempfindlich geworden sind – das Medikament wirkt nicht mehr.

Multiresistenz liegt vor, wenn ein Erreger gegen mehrere verschiedene Antibiotikaklassen resistent ist. Das macht die Behandlung deutlich schwieriger.

Resistenzentwicklung lange vor unserer Zeit



Adapted from Press & Siever, 2000, Understanding Earth

Ca. 0.001 Mia

Ca. 0.5 Mia

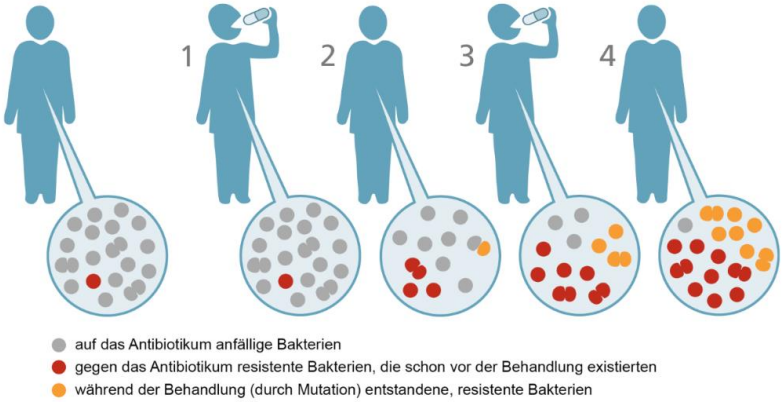
Ca. 3.5 Mia

Ca. 4.5 Mia

🧪 2. Woher kommt diese Resistenz – und warum betrifft uns das?

Antibiotikaresistenzen nehmen weltweit zu und entstehen vor allem durch:

- **Über- und Fehlgebrauch** von Antibiotika
- **Unvollständige Therapien**
- **Antibiotikaeinsatz in der Tierzucht**



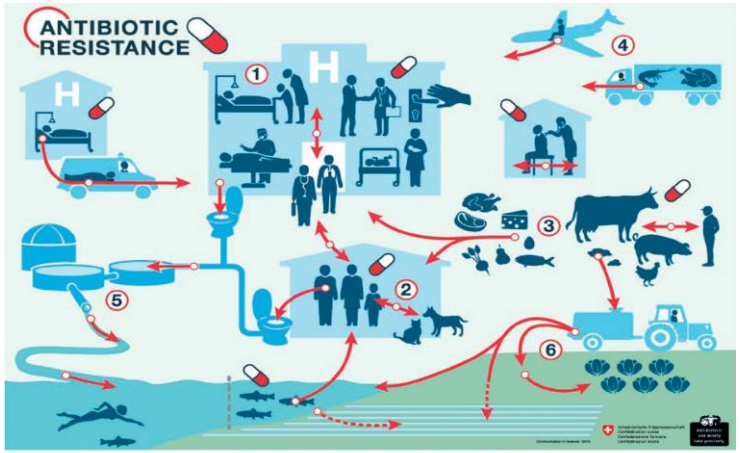


Abbildung 1: Ursachen und Übertragungswege von antibiotikaresistenten Bakterien [2].

Bundesamt für Gesundheit, BAG; Wie entstehen Antibiotikaresistenzen?

3. Die üblichen Verdächtigen

MRSA
Methicillin-res.
S. aureus

ESBL
Extended-
Spectrum-
Betalaktamasen

Penicillinase
spaltet
Penicilline

VRE
Vancomycin-
resistente
Enterokokken

Carbapenemase
-bildende Keime
spaltet
Carbapeneme

The Usual Suspects 1995; Columbia/TrtiStar Film Distributors

3. Bekannte Resistenzmuster – eine Einordnung

- **Penicillinase** – Enzym, das Penicilline spaltet
- **ESBL** – Extended-Spectrum-Betalaktamasen
- **Carbapenemase-bildende Keime** – Enzym, das Carbapeneme spaltet

→ Enzyme

- **MRSA** – Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*
- **VRE** – Vancomycin-resistente *Enterokokken*

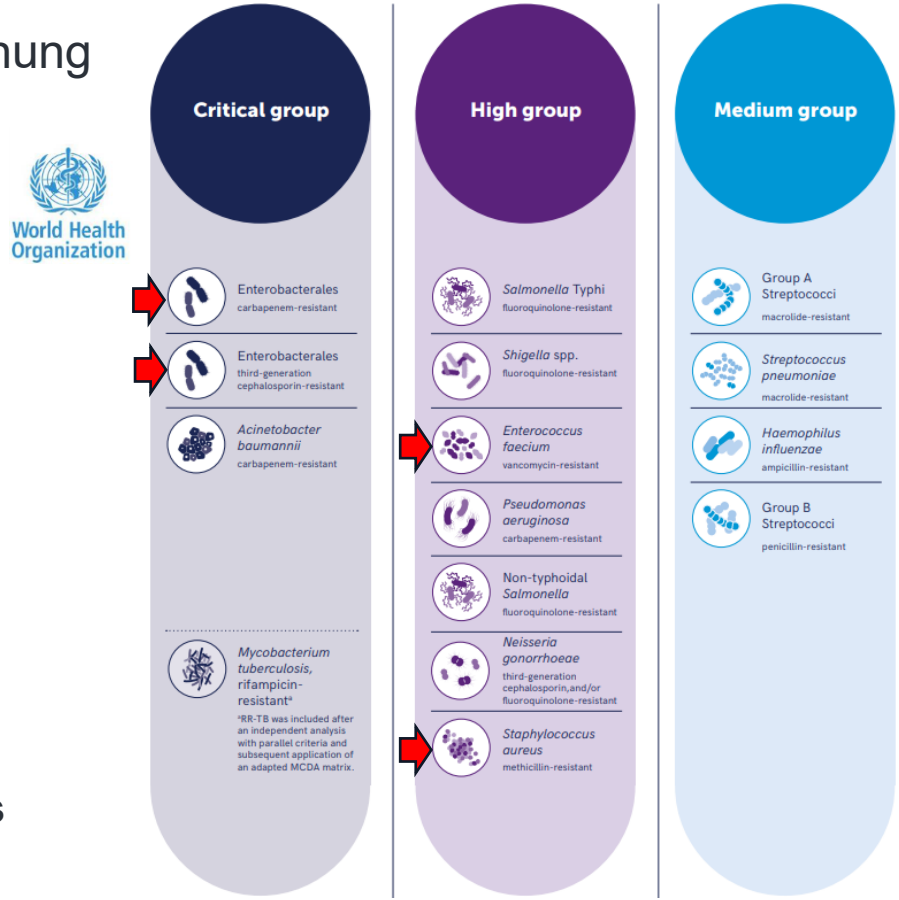
→ Mutationen

3. Resistente Erreger - Globale Bedrohung

WHO Fact Sheet

- Biggest threats to global health, food security, and development.
- Affect anyone, of any age, in any country.
- Misuse of antibiotics is accelerating resistance.
- Ineffective antibiotics → ineffective treatment
- Longer hospital stays, higher medical costs, increased mortality.

Eidgenössischen Fachkommission für biologische Sicherheit:
Multiresistente Bakterien als **grösstes biologisches Sicherheitsrisiko** in der Schweiz bezeichnet.



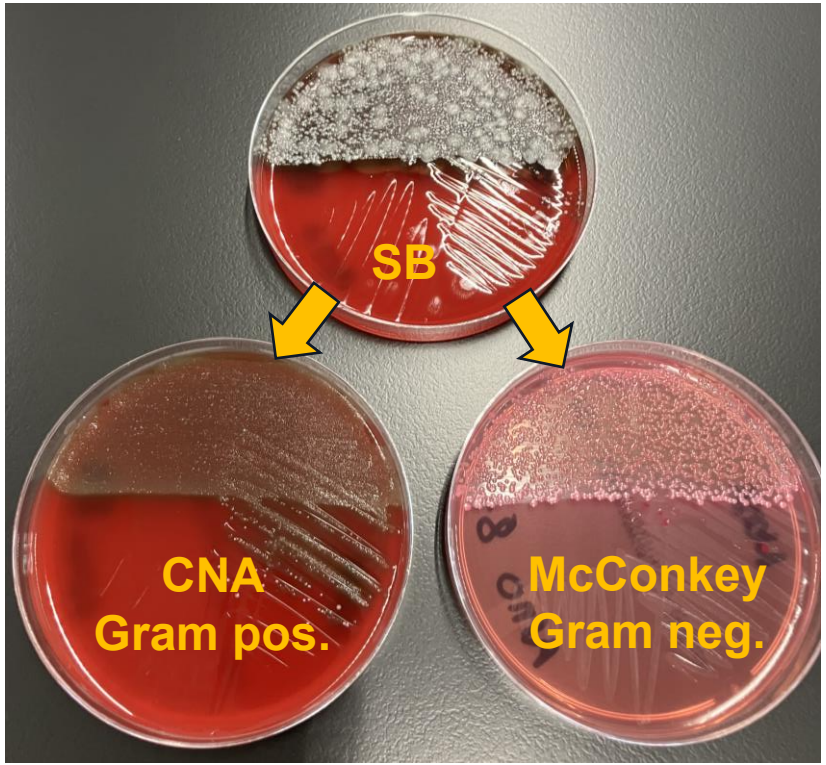
WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024

KSA

4. Wie kommen wir den Verdächtigen auf die Spur?

1. Anzucht auf Nährmedien

- Anreichern der Bakterien aus dem Probenmaterial
- Einsatz verschiedener Nährmedien:
  - Unterschiedliche Stoffe
  - Antibiotika-Zusatz (Selektiv-Agar)

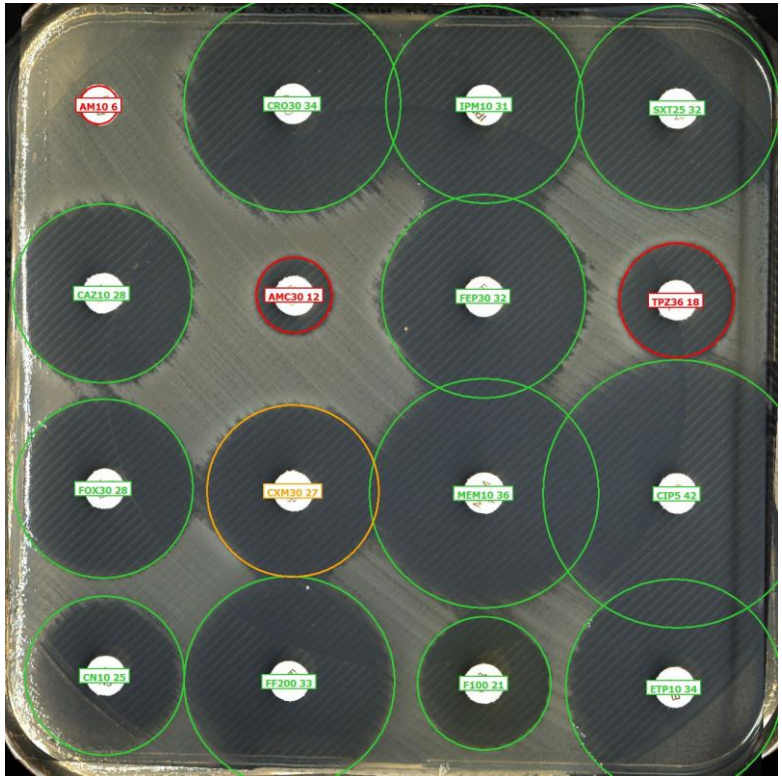


4. Wie kommen wir den Verdächtigen auf die Spur?

1. Anzucht auf Nährmedien
2. Antibiotika-Resistenztestung

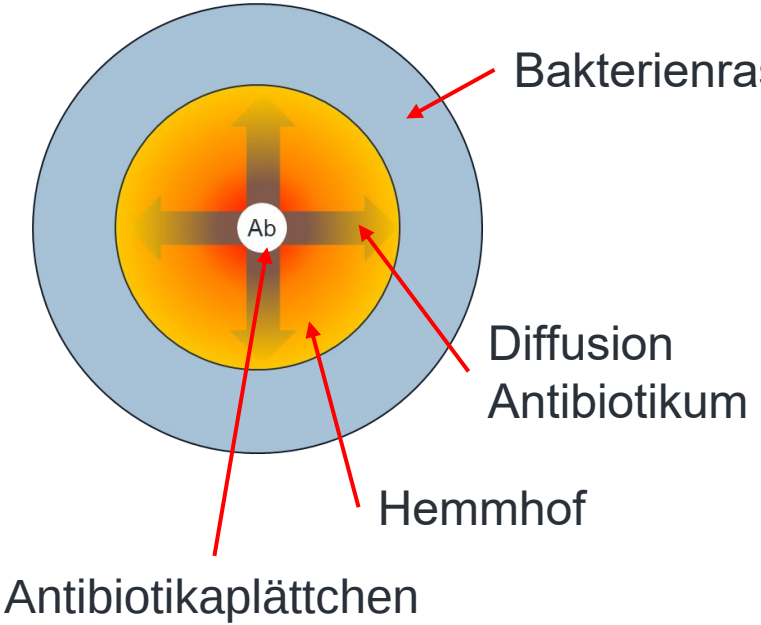
Antibiogramm:

1. Zu testender Keim wird ausgestrichen
2. Antibiotika-Plättchen auf beimpfte Agarplatte
3. Inkubation (35°C, ca. 20h)
4. Hemmhöfe messen/ interpretieren



5. Resistenztestung – Disk-Diffusion

Antibiotika diffundieren in den Agar und bilden ein Gradient um das Plättchen mit sinkender Konzentration.



Hemmhof abhängig von:

- Agardicke
- Keimspezies und -menge
- Antibiotikawahl und -konzentration

→ Standardisierung (WHO 1961)

5. Resistenztestung – ein kurzer historischer Rückblick

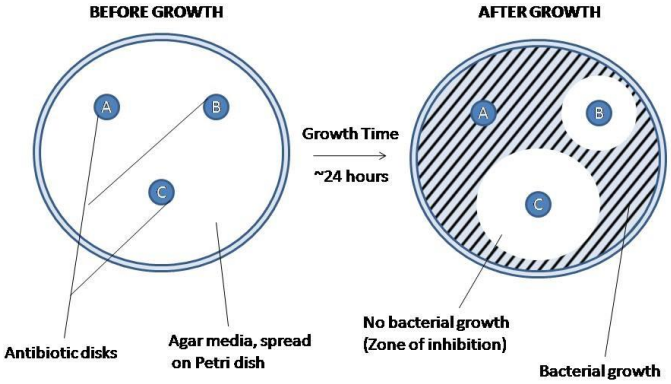
- Entdeckung von Penicillin (A. Flemming, 1928) → schnelle Entwicklung von Resistenzen

Kurz nach Zulassung von Antibiotika für die Behandlung werden Resistenzen nachgewiesen.

- Z.B. Penicillin:
  - 1942 Zulassung
  - 1946 Residenzen nachweisbar

5. Resistenztestung – Disk-Diffusion

- **1950er Jahre**: Disk-Diffusionsmethode in den USA verbreitet.
- **Keine Standards**: Unterschiedliche Medien, Inokulum, Inkubationszeiten, Temperaturen und Konzentrationen.
    - Interpretation: Hemmzone (vorhanden/nicht vorhanden), Tests mit 2–3 Konzentrationen desselben Mittels.
- Problem: Viele Varianten des Verfahrens, zahlreiche Protokolle → Verwirrung.



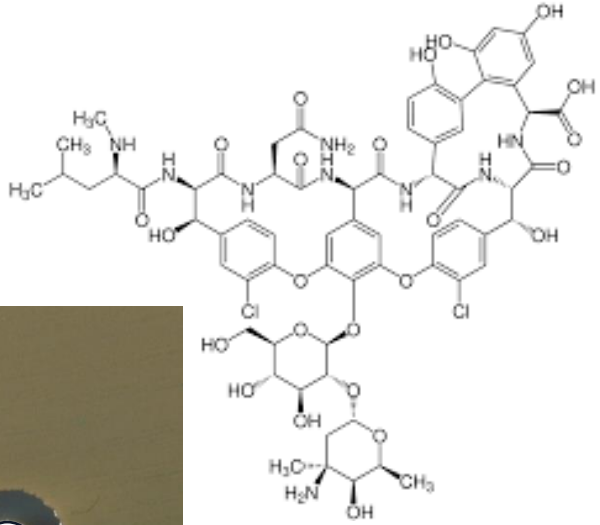
- **Kirby & Bauer** überprüften die Literatur über die Antibiotikatestung → Veröffentlichung des Agar-Diffusionstests.
- 1961: **WHO gründet ein Komitee für die Standardisierung** → Einführung des "Kirby-Bauer-Agar-Diffusionstests"

E. Matuschek1, D. F. J. Brown2 and G. Kahlmeter; 2013
International Journal of Antimicrobial Agents, 2011-10-01Jahrgang 38, Ausgabe 4

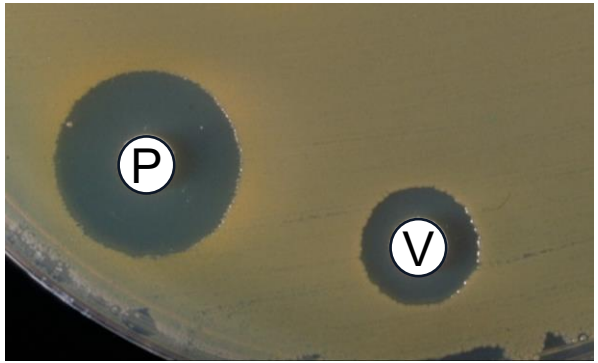
5. Resistenztestung – Disk-Diffusion

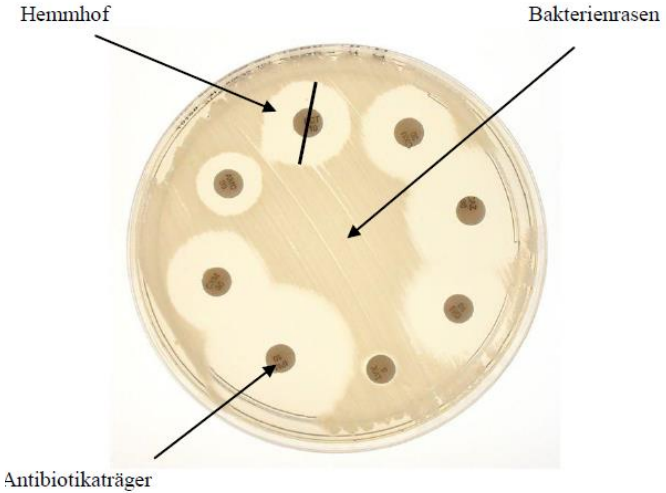
Penicillin

$C_{16}H_{18}N_2O_4S$



Vancomycin

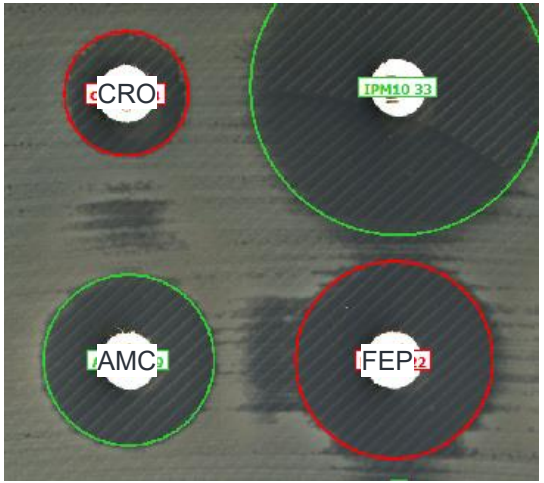




6. Kriminalfall Nr. 1 - ESBL

Resistenztestung von E. coli
ESBL-Bildner?

Antibiogramm	[1]
Ampicillin	R
Amoxicillin-Clavulan	E
Amoxicillin-Clavulan unkomplizierte HWI	E
Piperacillin-Tazobactam	R
Cefuroxim	R
Cefuroxim unkompl. HWI	R
Ceftriaxon	R
Ceftazidim	R
Cefepim	R



AMC	Amoxicillin - Clavulansäure
CRO	Ceftriaxon (3. Gen. Cephalosporin)
FEP	Cefepim (4. Gen. Cephalosporin

ESBL-Facts:

- Resistent gegen Penicilline und Cephalosporine
- >700 Gene bekannt
- Plasmid-vermittelte Resistenz
- Reservoir der Resistenz ist in Darmbakterien
- Spezifischer Inhibitor: Clavulansäure

6. Kriminalfall Nr. 2 - Carbapenemase

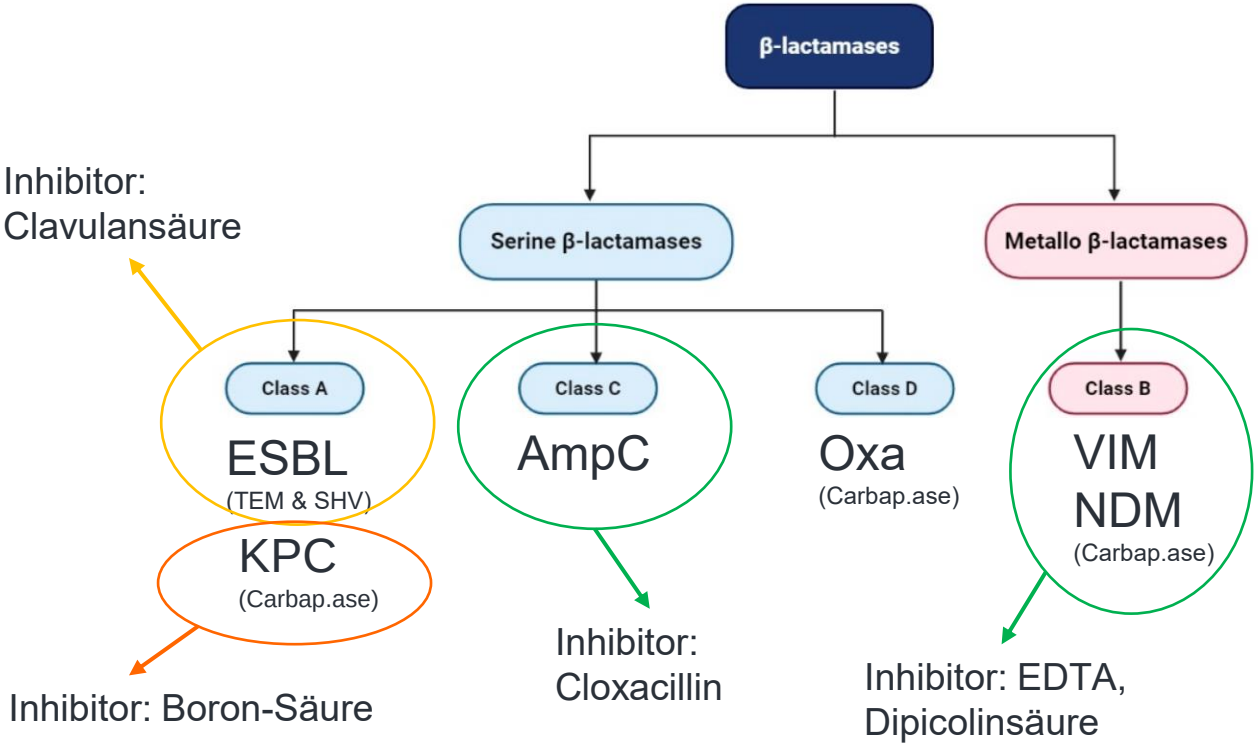
***P. putida* – Carbapenemase-Bildner?**

- ips 81088 (2024)
- Pat.
- Verkehrsunfall.
- Längerer stationärer Aufenthalt
- MRGN
  - *K. pneumioniae* ESBL
  - *E. coli* ESBL
  - *C. freundii* KPC-2
  - *K. pneumoniae* NDM-5
  - *E. hormaechei* NDM-1

Table for results' interpretation.

Bacterium	Zone difference against Imipenem 10 µg (IMI10)				β-lactamase
	IMPBO	IPCX4	IM+DP	IM10E	
Ps. aeruginosa		≥5 mm			No carbapenemase production
	≥4 mm	≤3 mm			KPC
			≥5 mm or ghost zone	≥8 mm	MLB

6. Kriminalfall – Einsatz von spezifischen Inhibitoren



ROSCO → Verdacht auf Carbapenemase → Synergismus mit EDTA und Dipicolinsäure → MBL

⚠ 6. Kriminalfall – Überstellung des Verdächtigen zur weiteren Abklärung ans NARA

Schnelltests:

Carba NP	Negativ
Immunologischer Carbapenemase-Test	Negativ

Molekulare Abklärung:

Andere b-lactamasen

PCR TEM	Negativ
PCR SHV	Negativ
PCR VEB	Negativ
PCR PER	Negativ
PCR BEL	Negativ
PCR GES	Negativ

Abschluss:

Ergebnis Keinen Nachweis von Carbapenemase

Überproduktion der natürlichen Cephalosporinase.
Reduzierte Membranpermeabilität (Porinverlust, Resistenz gegen Imipenem)
Die Resistenz gegen Meropenem ist wahrscheinlich mit der Überexpression der Effluxpumpe verbunden.

***P. putida* – Whole Genom Sequencing**

- HMB-1 wurde gefunden
  - Alle gängigen Tests waren negativ!
  - Einsatz der Inhibitoren erfolgreich!

6. Kriminalfall Nr. 3 - MRSA

Resistenztestung von S. aureus

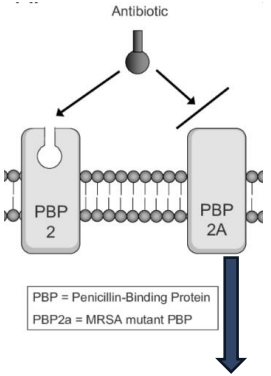
Zust.	Antibiotikum	MHK	HZonemm	Interne Ergebni...	HZ...
	Cefoxitin (FOX)	0.0000-0.0000	22-22	RESISTENT	18
	Oxacillin/Flucloxacillin (...	0.0000-0.0000	0-0	RESISTENT	13
	Penicillin (P)	0.1250-0.1250	26-26	RESISTENT	13
	Ampicillin (AMP)	0.0000-0.0000	0-0	RESISTENT	11
	Amoxicillin-Clavulan (A...	0.0000-0.0000	0-0	RESISTENT	0

PBP 2a Schnelltest: negativ

Assay	Assay Version
Xpert MRSA NxG	2

Test Result: MRSA NOT DETECTED

???



Schnelltest wird positiv

Modeling Antibiotic Resistance in Bacterial Colonies Using Agent-Based Approach; 2011

🧠 Fazit: Detektivarbeit mit großer Verantwortung

Resistenztestung ist wie kriminalistische Spurensuche: Jede Probe erzählt eine Geschichte – unsere Aufgabe ist es, sie richtig zu lesen und daraus die richtigen Schlüsse zu ziehen. Nur so können wir resistente Keime sicher identifizieren und helfen, deren Ausbreitung einzudämmen.