



# Antibiogramm nach Kirby und Bauer, DIN 58 940

Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien gegenüber Antibiotika mit Hilfe des Agar-Diffusionstest

***Untersuchungsergebnisse aus dem Praktikum Mikrobiologie (Will) im Mai 2002***

## Prinzip

Im Agar-Diffusionstest wird der zu prüfende Keim auf einen geeigneten Nährboden aufgebracht.

Die Testung erfolgt auf einem festen standardisierten Agar, dem Müller-Hinton-Agar. Die Chemotherapeutika (Erythromycin, Ampicillin, Gentamycin, Penicillin G, Mezlocillin und Trimethoprim- Sulfamethoxazol) werden mit Hilfe von Filterpapierblättchen, die mit dem jeweiligen Präparat beschickt sind, auf die Oberfläche eines zuvor mit dem fraglichen Stamm beimpften Müller-Hinton-Agar ausgelegt.

Aus dem Filterpapier diffundiert das Antibiotikum in den Agar und verhindert das Wachstum der Keime. Dadurch entsteht ein sogenannter Hemmhof. Bei einer bestimmten Beladung des Testblättchens mit einem Antibiotikum ist die Größe des Hemmhofes abhängig von der Empfindlichkeit des Keimes und von den Diffusionseigenschaften des Antibiotikums.

Durch die Diffusion des Wirkstoffes entsteht ein Konzentrationsgradient mit dem höchsten Gehalt am Blättchen und abfallender Konzentration nach außen.

Empfindliche Bakterien wachsen unter Bildung eines kreisrunden Hemmhofes, dessen Durchmesser ein Maß für die Empfindlichkeit des Erregers ist. Ein Bakterienstamm mit hoher Empfindlichkeit wird sich nur in großer Entfernung, d.h. bei niedriger Konzentration des Chemotherapeutikums entwickeln. Ein resisterter Stamm wird ohne Hemmzonenbildung an das Blättchen heranwachsen können.

Stellt man nun eine Korrelation der im Reihenverdünnungstest ermittelten MHK mit der Hemmhofgröße durch die Aufstellung einer Regressionsgeraden her, so ist eine quantitative Auswertung des Agar-Diffusionstestes möglich. Dazu werden die Durchmesser der Hemmhöfe ausgemessen und in Beziehung zur entsprechenden MHK gesetzt. Aufgrund von Erfahrungswerten über die in vivo erreichbare Konzentration eines Antibiotikums weiß man, bis zu welcher MHK noch mit einem Therapieerfolg zu rechnen ist. Dadurch ist es möglich, Grenzwerte für die einzelnen Antibiotika festzulegen, innerhalb derer ein Keim als "resistant" oder "sensibel" angesehen werden kann.



Hemmhöfe um Antibiotikablättchen[1]

### Agardiffusionstest

Der Durchmesser des Hemmhofes hängt von dem verwendeten Antibiotikum, seiner Konzentration im Filterplättchen und der Empfindlichkeit des Keimes ab. Weitere Faktoren sind natürlich die Zusammensetzung des Nährmediums, seine Dicke, Temperatur, etc.

Folgende Antibiotikablättchen werden bei dem Bakterienstamm *Staphylococcus aureus* wie folgt aufgelegt:

| Antibiotikum | Abk. | Konzentration | Wirkung    |
|--------------|------|---------------|------------|
| Penicillin   | P    | 10 µg         | bakterizid |
| Ampicillin   | AM   | 10 µg         | bakterizid |
| Mezlocillin  | MZ   | 75µg          | bakterizid |
| Gentamicin   | GM   | 10 µg         | bakterizid |

|                                  |     |                   |                  |
|----------------------------------|-----|-------------------|------------------|
| Sulfamethoxazol-<br>Trimethoprim | SXT | 1,25 +<br>23,75µg | bakteriostatisch |
| Erythromycin                     | E   | 15 µg             | bakteriostatisch |

Nach entsprechender Beschriftung wird die Platte 24 h bei 37° C inkubiert, die agarhaltige Seite der Petrischale liegt **oben**.

### Auswertung

Es werden für jedes Antibiotikum die Hemmhof-Durchmesser ausgemessen, wobei die Hemmhof-Grenzen dort festzulegen sind, wo das Bakterienwachstum deutlich gehemmt wird.

Anhand der Auswertungstabelle werden die Hemmhof-Ergebnisse interpretiert, d.h. der Keim wird gegenüber den einzelnen getesteten Antibiotika als empfindlich, mäßig empfindlich oder resistent eingestuft.

**Literaturangaben** (die Zahlen in der Tabelle geben den Hemmhofdurchmesser in mm wieder)

| Antibiotikum   | Abk. | sensibel | intermediär | resistent |
|--|------|----------|-------------|-----------|
| Erythromycin   | E    | 17       | 18-20       | 21        |
| Ampicillin<br>- Staphylococcen<br>- Enterobacteriaceae | AM   | 28       | -           | 29        |
|  |      | 13       | 14-18       | 19        |
| Gentamycin   | GM   | 14       | 15-17       | 18        |
| Penicillin G<br>- Staphylococcen<br>- Andere           | P    |          | -           | 29        |
|  |      | 28       | 13-23       | 24        |
|  |      | 12       |             |           |

|                            |     |    |       |    |
|----------------------------|-----|----|-------|----|
| Mezlocillin                | MZ  | 15 | 16-21 | 22 |
| Trimethopimsulfamethoxazol | SXT | 15 | 16-21 | 22 |

### Messergebnisse des Bakterienstammes *Staphylococcus aureus*

Tabelle: Interpretationen Hemmhofgröße

| Antibiotika<br>Abk. | 1.<br>Messung<br>[mm] | 2.<br>Messung<br>[mm] | 3.<br>Messung<br>[mm] | 4.<br>Messung<br>[mm] | Mittelwert | Bewertung |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|-----------|
| E                   | 30                    | 24                    | 28                    | 26                    | 27,0       | Sensibel  |
| AM                  | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0          | Resistent |
| GM                  | 10                    | 12                    | 20                    | 12                    | 13,5       | Resistent |
| P                   | 0                     | 0                     | 0                     | 0                     | 0          | Resistent |
| MZ                  | 17                    | 12                    | 15                    | 12                    | 14,0       | Resistent |
| SXT                 | 44                    | 36                    | 30                    | 37                    | 36,8       | Sensibel  |

Die Auswertung der Hemmhöfe erbringt den Befund, das *Staphylococcus aureus* auf folgende Antibiotika sensibel reagiert:

Erythromycin

Trimethopimsulfamethoxazol

Gegen Ampicillin; Gentamycin, Penicillin G und Mezlocillin ist der *Staphylococcus aureus* Stamm resistent.

Beurteilung

## 1. Penicillin G

Penicillin gehört zu der Gruppe der  $\beta$ -Lactam- Antibiotika und zu den Breitbandpenicilinen, die auch gegen gramnegative Stäbchen wirksam sind. Penicillin G ist unwirksam gegen die getesteten Staphylococcen.

## 2. Ampicillin

Ampicillin ist unwirksam gegen die getesteten Staphylococcen. Es gehört zu der Gruppe der  $\beta$ -Lactam- Antibiotika und zu den Breitbandpenicilinen, die auch gegen gramnegative Stäbchen wirksam sind. Ampicillin kann das Wachstum bestimmter gramnegativer Bakterien verhindern.

## 3. Mezlocillin

Mezlocillin gehört wie Ampicillin zu der Gruppe der  $\beta$ -Lactam- Antibiotika und zu den Breitbandantibiotika. Es ist unwirksam gegen die getesteten Staphylococcen, es wirkt bei gramnegativen Bakterien. Die Anwendung von Mezlocillin ist allerdings eingeschränkt, da die Substanz nicht säurestabil ist und daher nur in Form von Injektionen oder Infusionen verabreicht werden kann. Deshalb erfolgt der Einsatz überwiegend im stationären Bereich.

## 4. Gentamicin

Gentamicin ist wirksam gegen gramnegativen Kokken, es kann die Wirkung von Penicillinen und Cephalosporinen verstärken. Gentamicin gehört zur Wirkstoffgruppe der Aminoglykoside, sie bewirken eine vielfältige Störung der bakteriellen Proteinsynthese. Sie binden an die 30S- Untereinheit der Ribosomen und blockieren damit die Bindung der N-Formylmethionyl-t-RNA, womit der Beginn der Proteinsynthese unterdrückt wird. Zusätzlich wird die Anlagerung der Aminoacyl-t-RNA, an die Ribosomen verhindert und damit die angefangene Eiweißkette nicht verlängert.

Außerdem werden durch die Bindung der Aminoglykoside an die Ribosomen Fehler bei der Transplantation ausgelöst, und dadurch falsche Enzym- und Strukturproteine gebildet. Diese sogenannten Nonsenseproteine führen zu massiven Membranschäden und damit zum Abtöten.

## 5. Erythromycin

Erythromycin gehört zur Wirkstoffgruppe der Makrolid-Antibiotika. Der genaue Wirkungsmechanismus der Makrolide ist die Hemmung der Proteinsynthese durch die Bindung an die 50S- Untereinheiten der Ribosomen.

Das Wirkungsspektrum von Erythromycin ist mit dem Wirkungsspektrum von einigen Penicillinen vergleichbar, wodurch sich sehr ähnliche Anwendungsgebiete ergeben. Daher kann Erythromycin eingesetzt werden, wenn Allergien gegen  $\beta$ -Lactam-Antibiotika bestehen oder wenn Resistenzen die Anwendung von  $\beta$ -Lactamen verhindern.

Erythromycin ist gegen die getesteten Staphylococcen wirksam. Beim Vorliegen von MRSA versagt auch dieses Antibiotikum.

## 6. Trimethoprim- Sulfamethoxazol

Trimethoprim in Verbindung mit Sulfomethazol gehört zu der Gruppe der Sulfonamide. Sulfonamide wirken bakteriostatisch. Sie zählen durch ihre synthetische Herkunft zu den Chemotherapeutika.

Sulfonamide greifen in die Folsäuresynthese der Bakterien ein.

Das Wirkungsspektrum umfasst einige Kokken, wie die Streptokokken, Pneumokokken und Meningokokken, sowie Aktinomyceten und Chlamydien. Die Wirksamkeit gegen gramnegative Stäbchen ist unterschiedlich. Pilze, Rickettsien und Mykobakterien sind resistent.

### Resistenzentwicklung bei Staphylococcen

Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG) führt seit 1975 Untersuchungen über die Resistenz von Bakterien durch. An der Untersuchung sind 30 Labors in Deutschland, Österreich und der Schweiz beteiligt. Untersucht werden etwa 6.000 Bakterienstämme, die jeweils nach der gleichen Testmethodik untersucht werden.

Aus der Analyse der Daten von 1957 bis 1995 ergibt, dass die Resistenzhäufigkeit bei *Staphylococcus aureus* bis Mitte der 80er unverändert blieb, teilweise leicht rückläufig war. Ab 1990 besonders im Jahr 1995 ist eine deutliche Zunahme an Resistzenzen zu verzeichnen. Bei *S. aureus* wurden 1995 bei Überprüfung der Oxacillin-Resistenz 12,9% der Stämme als resistent ermittelt. Der *Staphylococcus epidermidis* war zu 60,2% resistent und der *Staphylococcus haemolyticus* zu 82,7%. [2]

Die zeitliche Entwicklung der Resistenz von *Staphylococcus aureus* kann aus den folgenden Diagrammen entnommen werden.

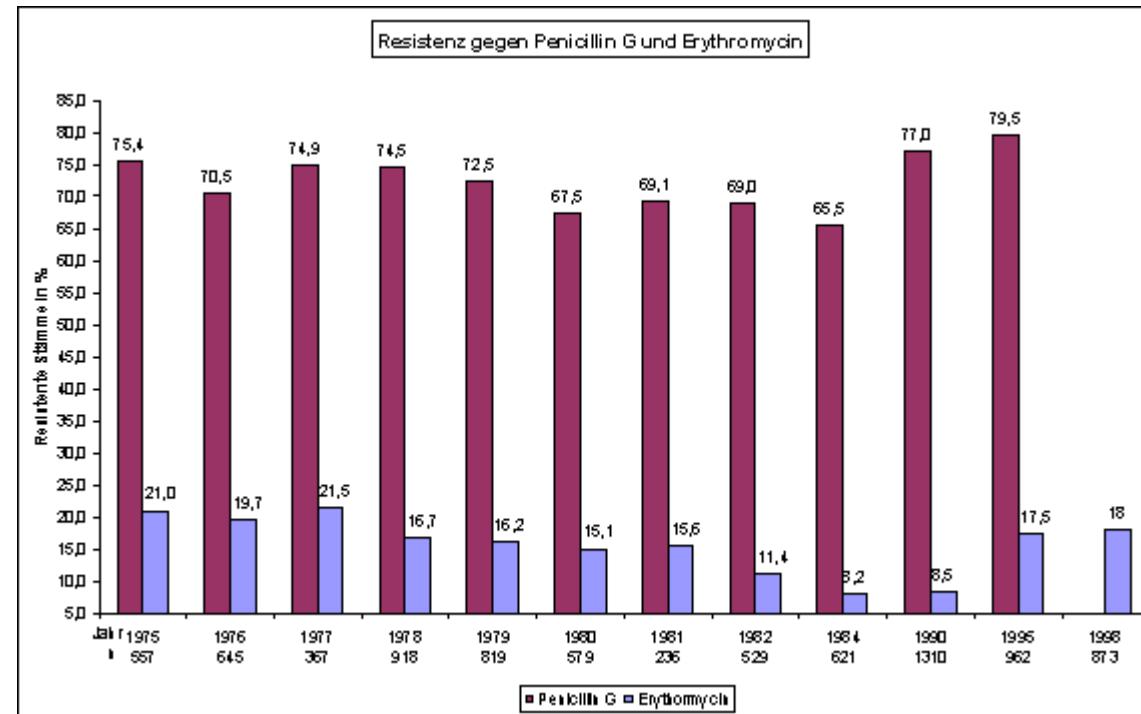


Diagramm 1: Resistenz gegen Penicillin G und Erythromycin; n= Anzahl getesteter Stämme [2,3]

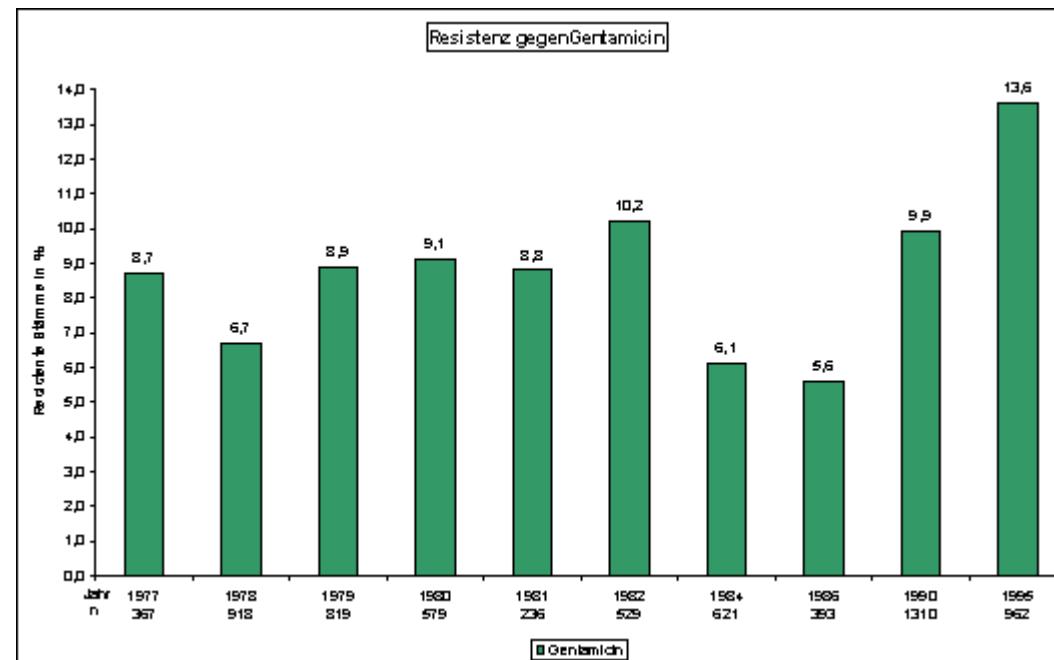


Diagramm 2: Resistenz gegen Gentamicin; n= Anzahl getesteter Stämme

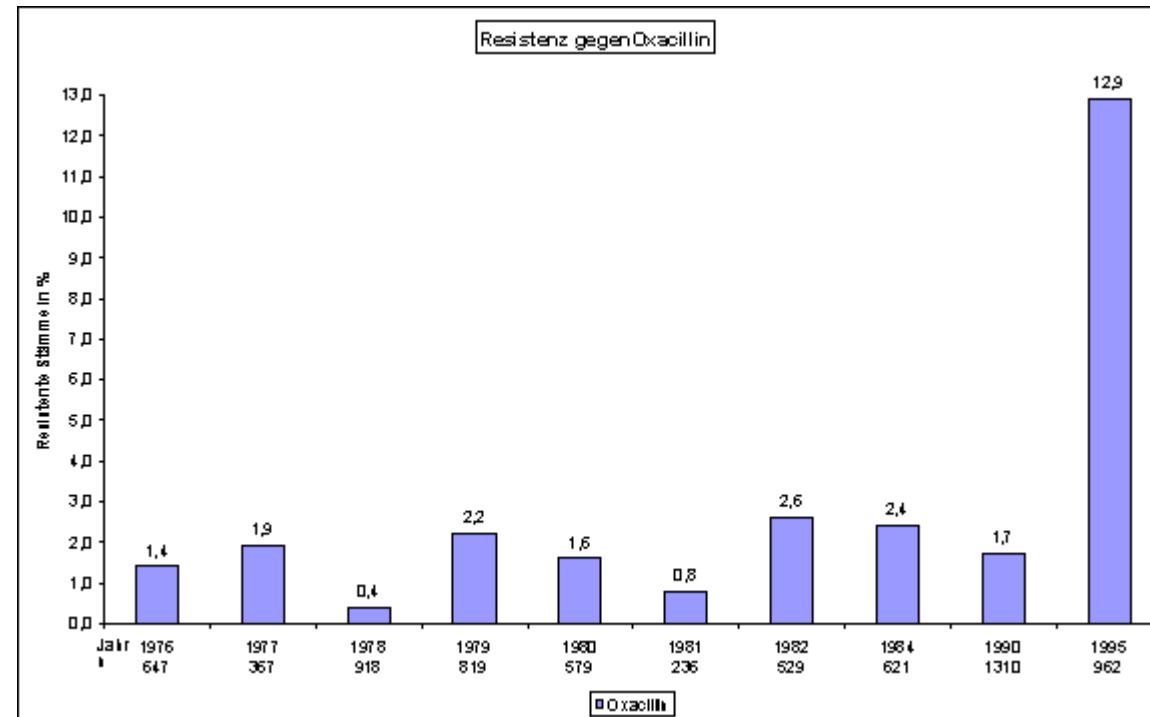


Diagramm 3: Resistenz gegen Oxacillin; n= Anzahl getesteter Stämme

Bei **Penicillin G** ist seit 1957 bis Mitte der achtziger wie bereits oben beschrieben ein Resistenzrückgang von etwa 10% zu sehen. Im letzten Untersuchungsjahr wurde eine Resistenz von knapp 80% diagnostiziert. [2]

Bei **Erythromycin** geht die Resistenzrate von 21 % (1957) auf 8,5 % (1990) zurück. Steigt aber bis 1995 wieder auf 17,5 %.

Bei dem Antibiotikum **Gentamicin** ist von 1977 bis 1982 eine Resistenzrate von 8-10% zu verzeichnen, 1978 sogar von nur 6,7%. In den Jahren 1984 und 1986 war die Resistenzrate zwischen 6,1% und 5,6 %. Diese Rate steigt dann aber bis 1995 auf 13,6 %. [2]

Als besonders kritisch wird die Zunahme der Resistenz gegen **Oxacillin** bewertet. Diese blieb bis 1990 unter 3%. Im Jahr 1995 wurden aber 12,9 % der Stämme von *S. aureus* als resistent ermittelt.

*Staphylococcus aureus*, der gegen Oxacillin resistent ist, gehört zur Gruppe der ORSA (Oxacillin resistenter *Staphylococcus aureus*). Dies ist eher bekannt als MRSA (Methicillin resistenter *S. aureus*). Methicillin ist die alte Bezeichnung von Oxacillin.

Medizinisch ist die MRSA/ORSA durch Parallelresistenzen von Bedeutung => MRSA weisen in der Regel Parallelresistenzen gegen weitere Wirkstoffe auf. Aus diesen MRSA können sich Multiresistente Staphylococcen entwickeln. Die MRSA-Stämme aus dem Jahr 1995 waren bei einer MHK (minimale Hemmkonzentration) von > 6 mg/L 80% gegenüber von Erythromycin und Gentamicin resistent. [2]

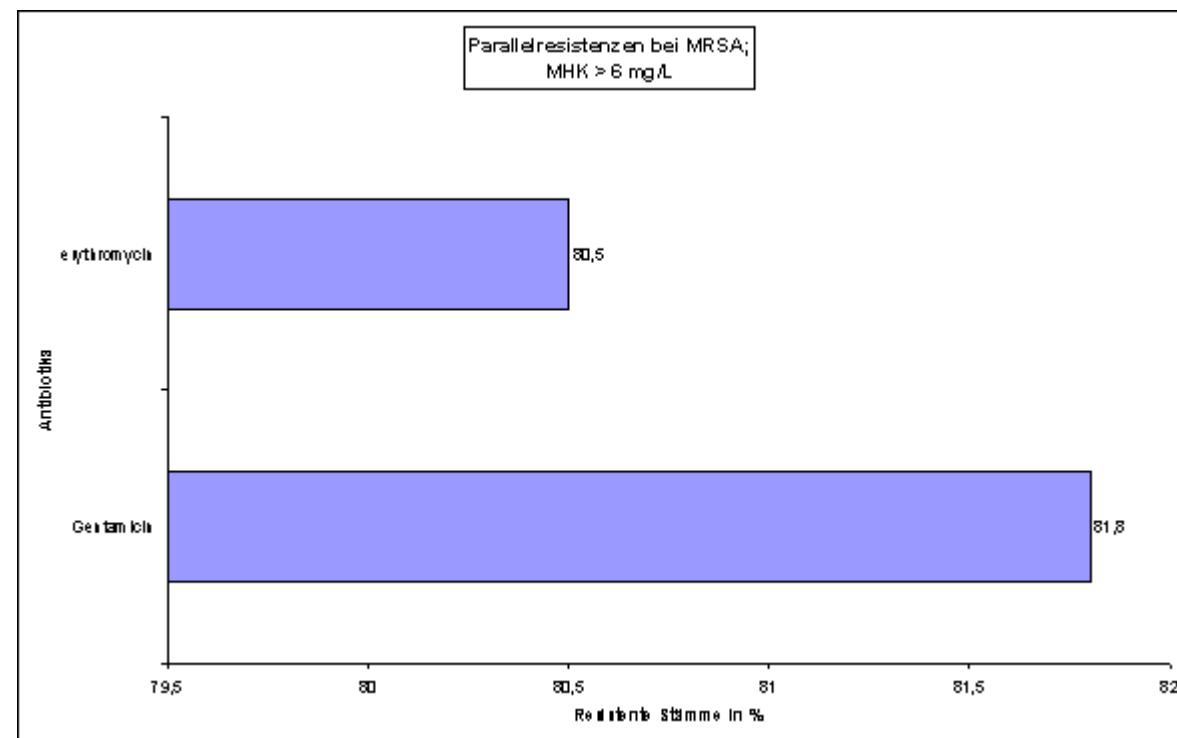


Diagramm 4: Parallelresistenzen zwischen MRSA und untersuchten Antibiotika

### Trimethoprim – Sulfamethoxazol (SXT)

Das Sulfamethoxazol hemmt die Verwendung der p-Aminobenzoesäure und das Trimethoprim die Reduktion der Cihydronfolsäure zu Tetrahydrofolsäure. Durch die Kombination der beiden Wirkstoffe ist die Wirkung teilweise bakterizid und steigert die Wirksamkeit um ein Vielfaches. [4]

Das Trimethoprim wirkt alleine nur auf aerobe Bakterien mit den Ausnahmen:

Clostridien

Treponema pallidum

Tuberkelbakterien

Pseudomonas aeruginosa

Pilze

Durch die Wirkstoffkombination wird das Wirkungsspektrum des Sulfonamids vergrößert.

Die folgenden Bakterien sind resistent oder teilweise resistent

Staphylococcus aureus ( in der Schule sensibel)

Enterokokken

Pneumokokken

Einige Klebsiella-Arten

#### Vergleich der Wirkung der Antibiotika mit anderen Bakterien aus dem Praktikum

Im Praktikum wurde die Wirkung der 6 Antibiotika bei folgenden Bakterienstämmen mit Hilfe des Agardiffusionstestes geprüft:

1. Staphylococcus aureus
2. Escherichia coli
3. Pseudomonas

| Bakterienstamm        | wirksame Antibiotika   | unwirksame Antibiotika |
|-----------------------|--|------------------------|
| Staphylococcus aureus | von den sechs verwendeten Antibiotika wirken lediglich zwei. | MZ, AM, GM, P          |

| SXT und E        |   |                       |
|------------------|---|-----------------------|
| Escherichia coli | von den sechs verwendeten Antibiotika wirken vier.<br><br>SXT, AM, GM, MZ | P,E                   |
| Pseudomonas      | die 6 verwendeten Antibiotika zeigen keine Wirkung                        | E, AM, GM, P, MZ, SXT |

Das Mittel der Wahl bei Staphylococcus aureus ist SXT, ebenso wirkt dieses Antibiotikum bei E. coli.

SXT, das sowohl bei Staphylococcus als auch bei E. coli wirkt, versagt bei den Pseudomonaden. Bei Pseudomonas zeigen alle verwendeten Antibiotika keine Wirkung. Eine Behandlung gegen Pseudomonas ist daher am schwersten in den Griff zu bekommen.

**Erstellt von:** Kathrin Müller, Sebastian Loos, Alexandra Pott, CT 12, Mai 2002

**Bearbeitet von:** Wolfgang Will

### Quellenangaben

- [1] <http://memiserf.medimikro.ruhr-uni-bochum.de/onlineskript/skript2.html> 18.04.2002
- [2] [http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~hafner/chemotherapie\\_journal.pdf](http://www-public.rz.uni-duesseldorf.de/~hafner/chemotherapie_journal.pdf) 27.04.2002
- [3] <http://www.antiinfectives-intelligence.de/honnef2001/kresken.pdf> 28.04.2002
- [4] <http://home.germany.net/100-507533/Antibiogramm/2001/Startseite.htm> 28.04.2002
- 5 <http://www.m-ww.de/pharmakologie/ärzneimittel/antiinfektiva/antibiotika> 18.04.2002
- 6 [http://www-vetpharm.unizh.ch/SKRIPT/pdf\\_data/abcs.pdf](http://www-vetpharm.unizh.ch/SKRIPT/pdf_data/abcs.pdf) 18.04.2002

7. Kayser, F; Bienz, K, Eckert, J.: *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, New York, überarbeitete und erweiterte Auflage, 1992, S. 71; 714; 721; 729