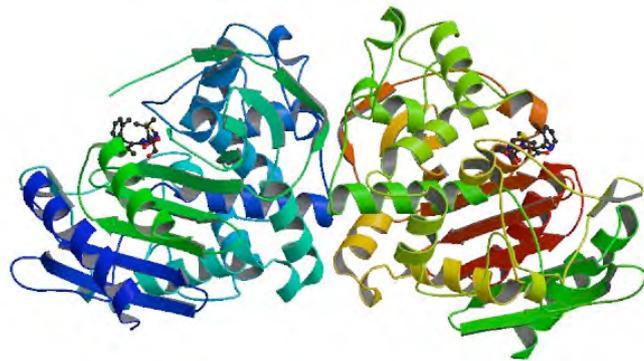


β -Lactamase



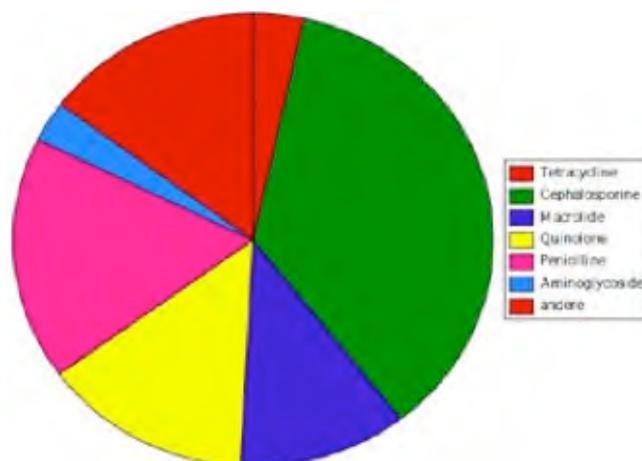
Ein Antibiotikaresistenzmechanismus

Einleitung

- Antibiotika werden durch Bakterien und Pilze hergestellt
 - Entwicklung eines Schutz- bzw. Resistenzmechanismus gegen das eigene AB.
 - Übergang des Resistenzmechanismus auf andere Bakterienarten (häufig durch Plasmide)
- Schutz- bzw. Resistenzmechanismen folgen häufig zwei Grundprinzipien.
 - Antibiotisch wirksame Moleküle können chemisch verändert werden
 - Veränderung der Zielmoleküle (Biosynthesenzyme) dieser Antibiotika, so dass das Antibiotikum nicht mehr gebunden werden kann.

- Antibiotika werden unwirksam durch Verbreitung der Resistenzen in Bakterien.
 - Hoher jährlicher Verbrauch der AB: ca. 40 000 Tonnen
 - Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen wirkt sich erheblich auf die Behandlung von Krankheiten aus.
- Etwa dreiviertel aller angewendeten Antibiotika sind vom β -Lactamtyp.

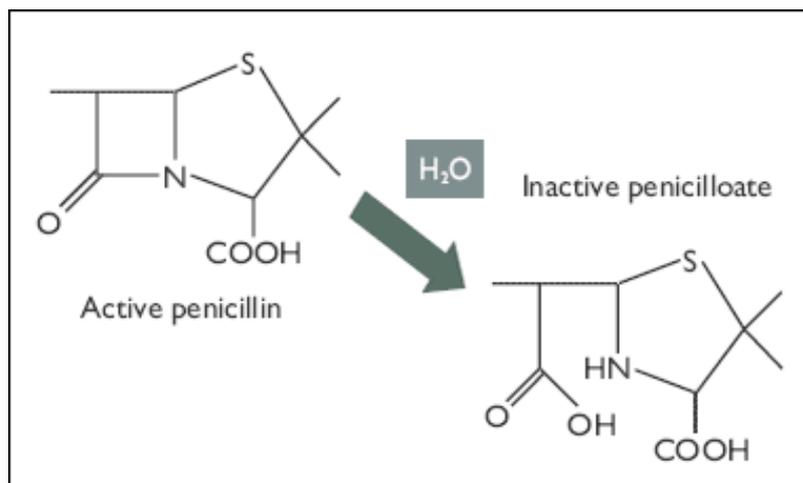
Jährlicher, weltweiter Verbrauch der AB



β -Lactamase

- β -Lactamase ist ein Enzym, welches Penicillin bindet und für die Spaltung des β -Lactamringes verantwortlich ist.
- Ist das *bla*-Gen in den Bakterien vorhanden und wird es dort expremiert, so wird das β -Lactamantibiotikum durch die gebildete β -Lactamase inaktiviert.
- Die β -Lactamase spaltet den β -Lactamring und bildet dabei eine Säure.

Spaltung des β -Lactamringes

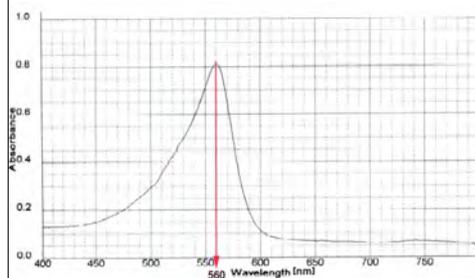


Methoden

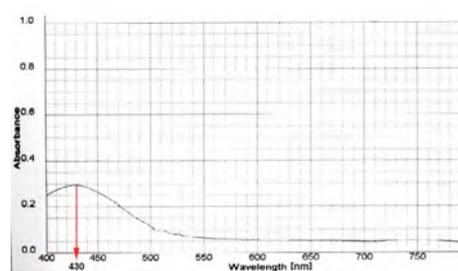
- Optische Dichtemessung
- Titration einer Phenolrotlösung (pH-Indikator) mit Essigsäure
- β -Lactamase-Test
- Inaktivierung der β -Lactamase
- Antibiotikatest in Lebensmitteln
- Molekularbiologische Methoden
 - Plasmidisolierung
 - Transformation des Plasmids in *E. coli*

Ergebnisse

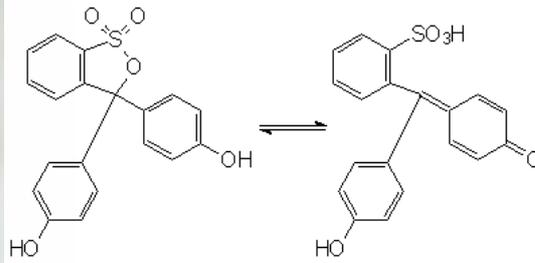
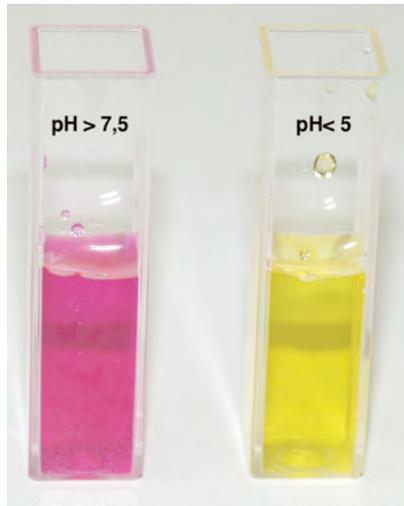
Erstellen eines β -Lactamase-Testsystems



Basischer pH-Bereich (rot)



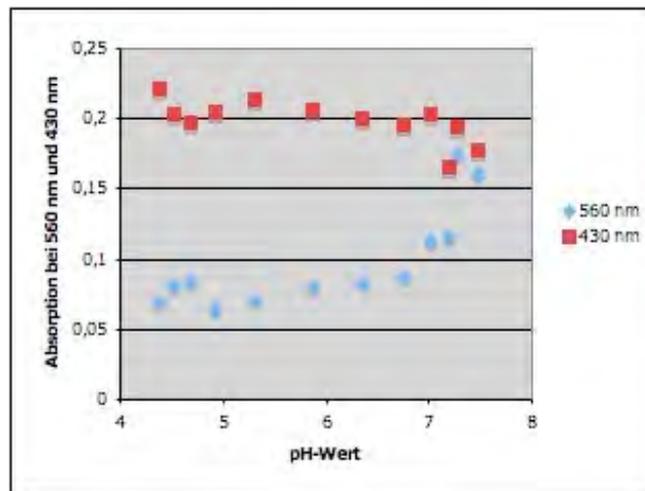
Saurer pH-Bereich (gelb)



Strukturformel von Phenolrot:

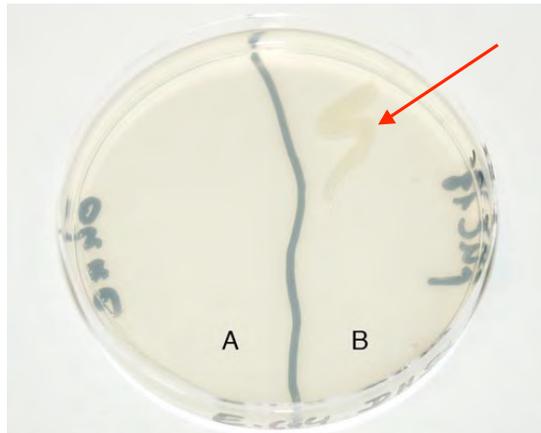
- Links: basisch
- Rechts: sauer

Titrationskurve



Messung der β -Lactamase

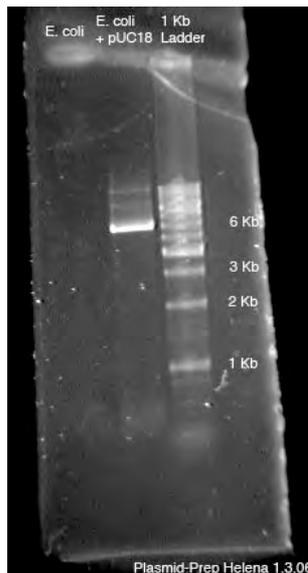
Gram-negative Bakterien



A: *E. coli* ohne pUC18

B: *E. coli* mit pUC18 (Amp^r)

Plasmidisolierung aus *E. coli*

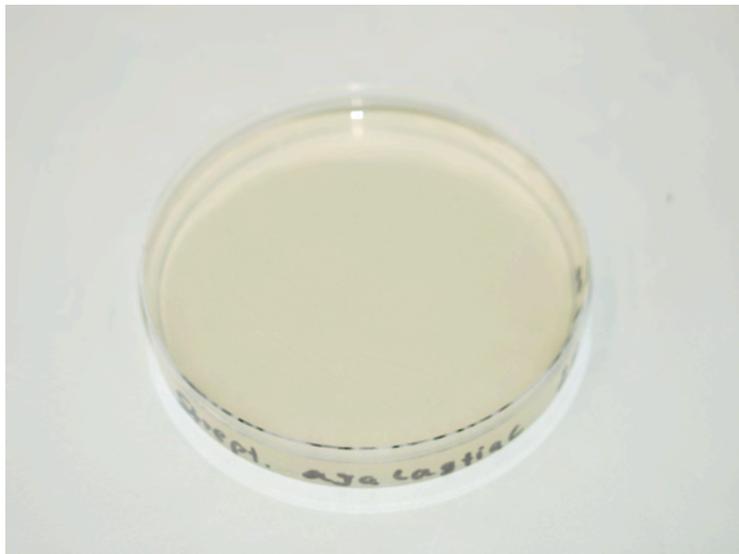


- **Linke Spur:** *E. coli*-Stamm
- **Mittlere Spur:** *E. coli*-Stamm mit pUC18
- **Rechte Spur:** Längenstandard

Gram-positive Bakterien

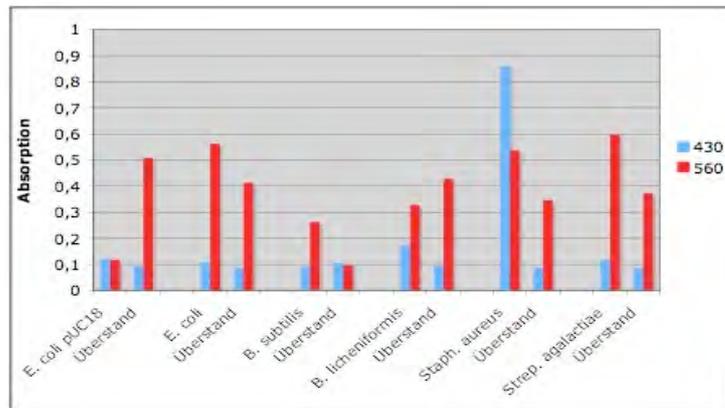


Staphylococcus aureus



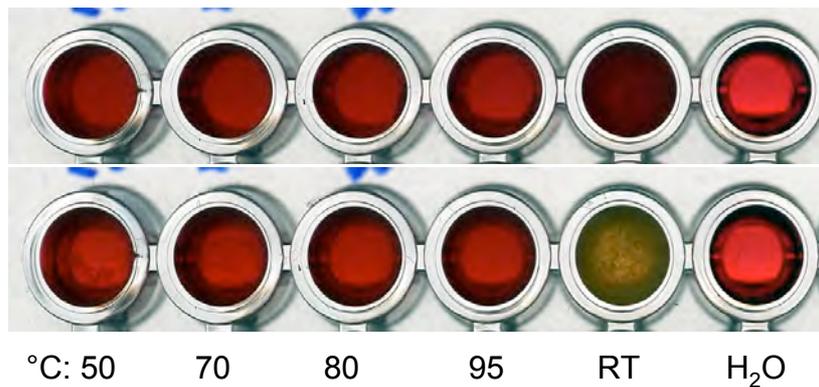
Streptococcus agalactiae

Lokalisation und Eigenschaften



Hohe blaue Balken stehen für eine hohe β -Lactamase-Aktivität.
Hohe rote Balken stehen für keine Ansäuerung des pH-Indikators und damit für keine β -Lactamase-Aktivität.

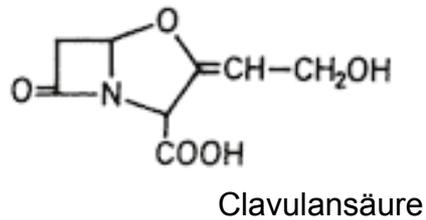
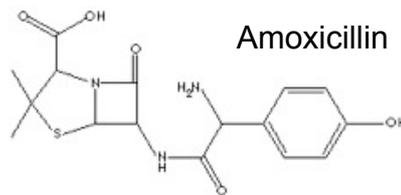
Hitzeinaktivierung



- **Oberer Reihe:** nach Inkubation bei den angegebenen Temp.
- **Untere Reihe:** Nach 50-minütiger Inkubation bei 37°C

Hemmung der β -Lactamasen

- β -Lactamasen werden bei pharmazeutischen Anwendungen durch Inhibitoren gehemmt: Clavulansäure ist gebräuchlich.
- Sie ist eine Lactam-analoge Verbindung, die sehr viel fester an β -Lactamasen bindet als ein β -Lactamantibiotikum.



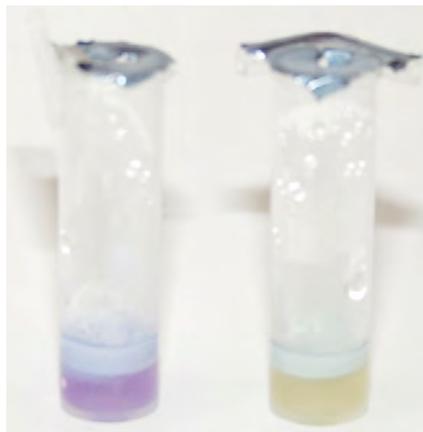
Hemmung bei *E. coli* durch Clavulansäure

Inkubation	Ansatz	$E_{430 \text{ nm}}$ (gelb)
$T_{0 \text{ min}}$	Amoxicillin	0,672
$T_{60 \text{ min}}$		0,753
$T_{0 \text{ min}}$	Amoxicillin + Clavulansäure	0,581
$T_{60 \text{ min}}$		0,479

Hemmung bei *Staphylococcus aureus* durch Clavulansäure

Inkubation	Ansatz	E _{430 nm} (gelb)
T _{0 min}	Amoxicillin	1,078
T _{60 min}		1,169
T _{0 min}	Amoxicillin + Clavulansäure	1,136
T _{60 min}		1,075

Biologischer Nachweis von Antibiotika in Milch

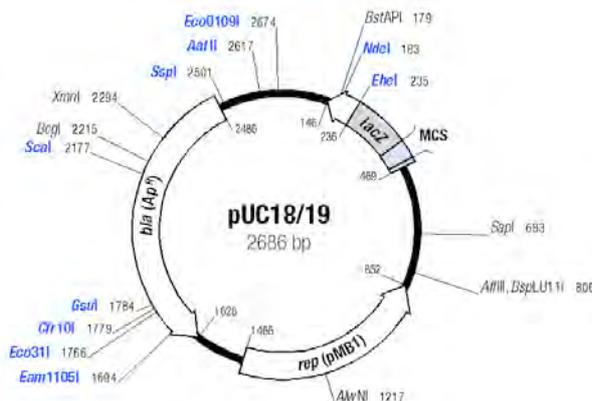


Links Milch mit AB, rechts AB-freie Milch

Zusammenfassung

- Ein Test zum Nachweis von β -Lactamase wurde gefunden.
 - Der Test beruht auf dem Messen eines Farbumschlags des pH-Indikators Phenolrot
- Es wurde eine unterschiedliche β -Lactamase-Aktivität festgestellt.
- Die Hitzeempfindlichkeit und die Hemmung durch Clavulansäure ist ein Beweis dafür, dass β -Lactamase ein Enzym ist.

- Es muss ein *bla*-Gen vorhanden sein, damit die β -Lactamase gebildet wird. Dadurch kann eine Enzymaktivität nachgewiesen werden.

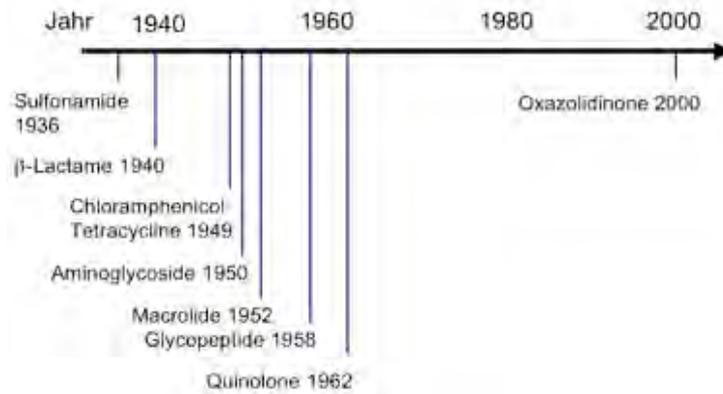


- Die β -Lactamase-Aktivität war in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien an die Zellen gebunden.
- Mit einem Test wurde AB in Lebensmitteln nachgewiesen.
 - Beruht auf der Wachstumshemmung des AB-empfindlichen *Bacillus stearothermophilus*
 - Verbreitung der AB in unserer Umwelt kann durch den Test nachgewiesen werden.

Ausblick

- Die Resistenzbildungen werden durch die große Menge der eingesetzten AB gefördert
 - 20 - 50 % der AB werden in der Humanmedizin unnötig eingesetzt, weshalb der Mensch mitverantwortlich für die Resistenzausbreitung ist
- Verantwortungsbewussterer Umgang mit dem Verbrauch der AB nötig

Einführung neuer AB



Danke für Eure Aufmerksamkeit!

