Mechanismus der Aminoglykosidresistenz in Mycobakterien

VerfasserInnen:
Claudine Bommer, claudinebommer@hotmail.com
Gregor Piontek, pion17@gmx.ch
Sira Alonso Bardon, sial@gmx.de

Betreuer:
Peter Sander, psander@immv.unizh.ch

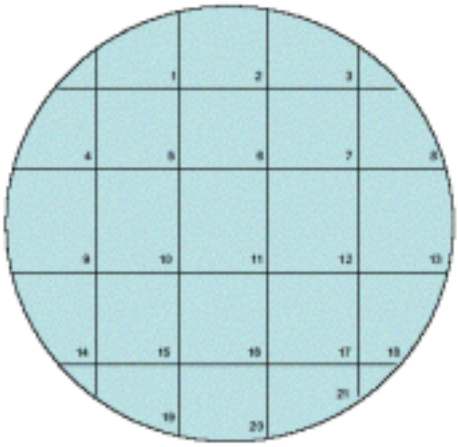
Einleitung:

Im Kurs sehen und brauchen wir verschiedene Methoden, um die Antibiotikaresistenz verschiedener Mycobakterien festzustellen. Dabei lernen wir auch Resistenzmechanismen kennen. Wir hatten drei Experimente: Bei Experiment 1 verfolgten wir das Ziel eine Bakteriensuspension so auszuplatten, dass einzelne Kolonien erkennbar werden.
Experiment 2: Wir überprüfen die Resistenzen verschiedener Bakterienstämme, indem wir sie auf Agarplatten pipettieren, denen Antibiotika beigemengt sind.
Experiment 3: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration eines Antibiotikums auf zwei Bakterienstämme.

Vorgehen:

Experiment 1: Wir führten einen Vereinzelungsausstrich durch. Dabei wurde mit einer sterilen Oese Bakterien entnommen und ein erster Strich aufgetragen, danach wurde die Oese wieder sterilisiert. Eine zweite Ausbreitung wurde dann gemacht, wobei die sterile Oese durch die ersten Ausbreitungsstriche geführt wurde. In einem dritten Schritt wurde der gleiche Vorgang wiederholt, wiederum mit einer sterilen Oese. Die fertige Platte wurde mit Parafilm verschlossen und eine Woche bei 37^{o}C inkubiert.

Experiment 2: Zuerst wurde von den sechs Bakterienstämme nA-F eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dabei mixte man 100 µl der Bakteriensuspension mit 900 µl Nährmedium. Daraus wurden wieder 100µl Suspension genommen und mit 900µl Nährmedium verdünnt, und bei einem dritten Schritt wurde der gleiche Vorgang wiederholt. Das führte man mit allen sechs Stämmen durch. Wir hatten sieben Agarplatten, denen sechs verschiedene Antibiotika beigefügt waren, zur Verfügung. Auf die Rückseite der Platten zeichneten wir ein Gittermuster ein und nummerierten die Felder durch. Auf jedes Feld kam nachher ein Tropfen (ca. 2µl) Bakteriensuspension, also auch von den drei verschiedenen Verdünnungen. Die mit Parafilm verschlossenen Agarplatten inkubierten wir während einer Woche bei 37^{o}C.

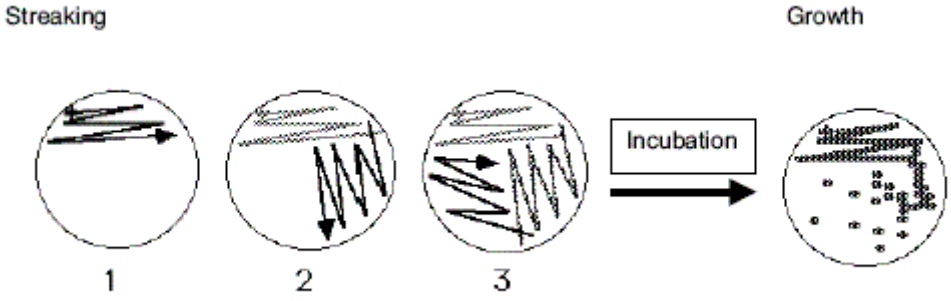


Beispiel einer vorbereiteten Agarplatte (Gitter)

Experiment 3: 24 Reagenzgläser wurden mit 1ml Nährmedium gefüllt und mit A1-A12 beziehungsweise B1-B12 beschriftet. Ins erste Reagenzglas wurde 1ml Nährmedium zugefügt, welches 400µg/ml Kanamycin enthielt. Dann wurde gut gemixt und wiederum 1ml Suspension entnommen und ins nächste Reagenzglas gegeben. Diese Prozedur wurde bis zu Reagenzglas10 wiederholt, danach wurde 1ml entnommen und verworfen, so dass alle gleich hoch gefüllt waren. In die Reagenzgläser A1-A11 wurde dann je 50µl Bakteriensuspension (Verdünnung 1:100) des Stammes G und in B1-B11 gleichviel des Stammes H beigemengt. Die Reagenzgläser wurden während einer Woche bei 37°C inkubiert.

Ergebnisse:

Experiment 1: Diese Skizze ist eine Veranschaulichung zur Vorgehensweise im 1. Experiment. Alle Kolonien sahen gleich aus, es gab keine sichtbaren Mutationen.



Versuchsanordnug

Experiment 2: Nachdem wir auf jedem Feld Bakteriensuspension aufgetragen hatten, konnten wir nach einer Woche Inkubationszeit eine Tabelle erstellen, in die eingetragen wurde, ob ein Bakterium gewachsen ist oder nicht.

Stamm	Nährmedium	Sm	Kan	Par	Gm	Am	Tob
A	+	O	O	O	O	O	O
B	+	+	O	O	O	O	O
C	+	+	+	+	O	O	O
D	+	+	O	O	+	O	O
E	+	+	O	O	O	O	O
F	+	+	+	+	+	+	+
	Kontrolle						

Tabelle zur Kontrolle der Resistenz der Mycobakterien auf unterschiedliche Antibiotika (O=kein Wachstum bzw. + = Wachstum)

Experiment 3: In dieser Tabelle sind unsere Ergebnisse des Experiments 3 nach einer Woche Inkubationszeit aufgetragen. (Reagenzglas 11 und 12 dienten zur Kontrolle) Durch die Trübung im Reagenzglas konnten wir Wachstum feststellen.

Stamm	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konz. µg/ml	200	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78	0.39	+	steril
G	O	O	O	O	O	O	O	+	+	+	+	steril
H	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	steril

Tabelle zur Kontrolle des Wachstums (O=kein Wachstum, + = Wachstum)

Diskussion:

Experiment 1: Da alle Kolonien der Bakteriensuspension gleich ausgesehen haben, schliessen wir, dass in der Suspension nur ein Bakterienstamm vorgekommen ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die verschiedenen Mutationen die gleiche Morphologie aufweisen.

Experiment 2: Stamm A ist allen Antibiotika gegenüber sensitiv, während Stamm B, durch eine Mutation (rpSL) im ribosomalen Protein S12, gegen Streptomycin resistent ist. Stamm C ist eine „Weiterentwicklung" von Stamm B: Zusätzlich zur Mutation rpSL, bildet Stamm C Phosphatanhänge welche an Kanamaycin und Paromomycin angehängt werden und diese unschädlich machen (Mutation aph). Stamm D und E sind ebenfalls „Weiterentwicklungen" von Stamm B. Im ersten Fall bildet Stamm D Resistenz gegen Gentamycin, was auf eine Übertragung von Aminoacyltransferase zurückzuführen ist. Stamm E unterliegt einer Modifikation der ribosomalen RNA (Mutation Arrn: hyg). Stamm F hat die Mutation ArrnB::hyg, welche an Stelle 1408 die Base G statt A enthält und dadurch die Sensitivität gegenüber einer ganzen Gruppe von Antibiotika verliert.
Stamm C und F sind also kreuzresistent ,das heisst, dass eine Mutation eine Resistenz gegen eine ganze Gruppe von Antibiotika bewirkt.

Experiment 3: Reagenzglas 11 war jeweils zur Kontrolle, um zu sehen ob die Bakterien ohne Antibiotika wachsen und Reagenzglas 12 war die sterile Kontrolle. Da Stamm H in allen Reagenzgläsern wächst, gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder ist dieser Stamm resistent oder aber,

die minimale Hemmkonzentration ist grösser als 200 µg/ml. Weitere Experimente wären nötig, um das herauszufinden. Stamm G hingegen wächst ab einer Konzentration von 1.56 µg/ml oder wird bei einer Konzentration von 3.125 µg/ml noch inhibiert. Zur Bestimmung der genauen minimalen Hemmkonzentration sind wiederum weitere Experimente nötig, andere Gruppen hatten leicht unterschiedliche Resultate.

Anhang:

Alle Bilder stammen aus der Kursanleitung des pdf-Dokuments von der Webseite:
http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_04/pdf/25mycobacteria03.pdf
Die Tabelle wurde an Anlehnung der Kursanleitung und des Kurses selber erstellt.

Folgende Buchkapitel behandeln die Themen dieses Experiments:
10. Auflage von Brock - Biology of Microorganisms (BBOM): 20.6, 20.7, 20.9, 20.12, 24.3, 30.5, 12.24, s. 202, s. 339.