

Mechanismus der Aminoglykosidresistenz in Mycobakterien

VerfasserIn: Sabrina Meyer, Stefan Schwager, Lui Unterrassner, Mario Gysi
Betreuer: Peter Sander

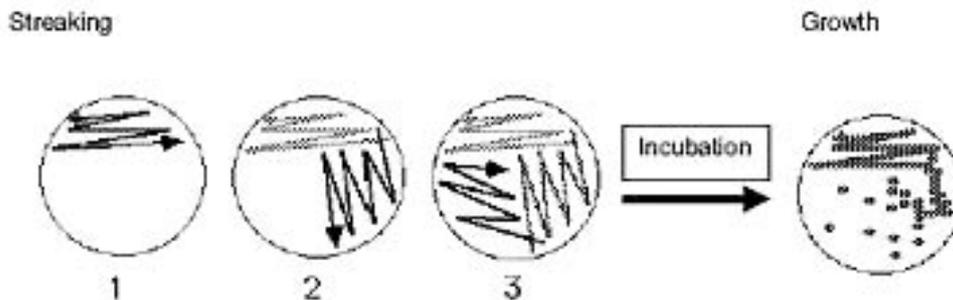
Versuchsbericht

Im Versuch 25 versuchten wir, anhand dreier Versuche die Antibiotikaresistenz verschiedener Mykobakterienmutanten zu bestimmen. Im ersten Versuch lernten wir die Technik des richtigen Ausplattierens kennen, so dass einzelnen Kolonien ersichtlich wurden. Beim zweiten Experiment ging es darum, verschiedene Bakterienstämme auf ihre Antibiotikaresistenz zu untersuchen. Experiment 3 befasste sich mit der minimalen Hemmkonzentration eines Antibiotikums auf zwei verschiedene Bakterienstämme.

Experiment 1, Dreiösenausstrich

Vorgehen: Mit einer sterilen Öse führten wir einen Vereinzlungsausstrich durch, um die charakteristische Morphologie eines bakteriellen Stammes zu erkennen.

Aus einer Bakteriensuspension entnahmen wir mit einer Ösenspitze Bakterien und machten einen ersten Ausstrich. Mit einer neuen Öse verdünnten wir den ersten Ausstrich, indem wir die Öse durch den ersten Ausbreitungsstrich geführt haben. Dies wurde noch ein drittes Mal durchgeführt. Die Platten wurden danach mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 37°C inkubiert.



Auswertung: Die Bakterienstämme sahen flechtenartig, durch die poröse Oberfläche nicht glänzend, leicht gelblich aus.

Wir erfuhren, dass für die Morphologie das Nährmedium, Grösse (Generationszeit), Licht, Temperatur, Feuchtigkeit und pH-Wert eine Rolle spielen.

Experiment 2, Ermittlung des Phänotyps der Antibiotikaresistenz von Mycobakterien

Vorgehen: Als erstes stellten wir mit unseren sechs Bakterienstämmen A-F je eine dreifache Verdünnungsreihe her. Dafür wurde 100 µl Bakteriensuspension mit 900 µl LB-Tween (Nährmedium) gemischt. Dabei erhielten wir eine 1:10 Verdünnung. Für die zweite Verdünnung entnahmen wir aus der ersten wieder 100 µl und gaben sie in 900 µl Nährmedium (1:100fache Verdünnung). Für die 1:1000 fache Verdünnung wurde das Verfahren in einem dritten Schritt wiederholt. Nachdem wir das mit allen 6 Stämmen durchgeführt hatten, pipettierten wir 2 µl jeder verdünnten Bakteriensuspension auf 7 mit

verschiedenen Antibiotika versetzten Agarplatten. Auf die Rückseite der Platten zeichneten wir vorher ein Gittermuster ein und nummerierten die Felder durch. Wie in Experiment 1 wurden die Platten verschlossen inkubiert.

Auswertung: Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, ist Stamm A der Wildtyp und gegen alle Antibiotika sensitiv. Durch eine Punktmutation (SmR) eines ribosomalen RNA codierenden Gens (PSC (S12)) entstand aus Stamm A der Stamm B, welcher gegen Streptomycin resistent ist. Durch eine Transformation von B entstand Stamm C. Transformation ist die Einbringung eines Plasmids, in unserem Fall eines, welches die Antibiotika Karamycin und Paromycin durch Aminoglycosid-Phosphotransferase (aph) inaktiviert. Der Stamm D ist gegen Gentamycin resistent, weil er es durch Aminoglycosid-Adenyl-Transferase (aad) inaktiviert. Bei Stamm E gibt es in der *rrnB* ein Gen, welches Hygromycin inaktiviert. Aus E wurde Stamm F gezüchtet, welcher eine Mutation innerhalb des 16s RNA kodierenden Gens an der Position 1408 (Base Guanin statt Adenin) hat und somit die Sensibillität gegenüber all unseren getesteten Antibiotikas verliert. Eine solche Mutation wird Kreuzresistenz genannt.

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

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

Experiment 3, Ermittlung der kleinsten hemmenden Konzentration durch Verdünnung der Kanamycinbrühe

In Experiment 3 stellten wir eine Verdünnungsreihe von zwei Stämmen G und H mit Kanamycin (Antibiotikum) her. Wir untersuchten sie auf ihr Wachstum und versuchten die minimale Hemmkonzentration von Kanamycin herauszufinden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Konz. [$\mu\text{g/ml}$ kan]	200	100	50	25	12.5	6.25	3.13	1.56	0.78	0.39	Kontr. ohne Antibiotika	Kontr. ohne Stamm
G (50 μl)	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	0
H (50 μl)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0

Wie aus der Tabelle entnommen werden kann, ist die minimale Hemmkonzentration von Kanamycin für Stamm H \gg 200 $\mu\text{g/ml}$. Die Ursache dafür kann in einer Resistenz gegenüber dem Antibiotikum liegen. Für Stamm G ist die minimale Hemmkonzentration $>$ 3.13 $\mu\text{l/ml}$. Reagenzglass 11 war die Kontrolle ohne Antibiotikum und Reagenzglass 12 die sterile Kontrolle ohne Stamm.