

3. PRINCIP

Med dette antibiotikasæt kan man isolere celler fra halsen, komme dem i kulturmedium og udvælge en type bakterier (f.eks E.coli). Effekten af antibiotika på bakteriens vækst kan så undersøges. Antibiotika som anbringes på agar-agar (i form af impregnerede plader) vil diffundere ud med en koncentrationsgradient. En væksthæmmende zone vil opstå omkring pladen, størrelsen af zonen afhænger af bakteriekoloniens følsomhed overfor det givne antibiotika. Man kan på denne måde finde frem til det mest effektive antibiotika mod en given bakterie.

BEMÆRK. I løbet af forsøget skal der inkuberes to gange i ovnen ved 37 °C.

4. ØVELSESVEJLEDNING

Forsøget skal udføres under fuldstændig sterile forhold for at undgå udefrakommende forurening. Det anbefales derfor at forsøget udføres i nærheden af en tændt bunsenbrænder.

a) Forberedelse af petriskåle.

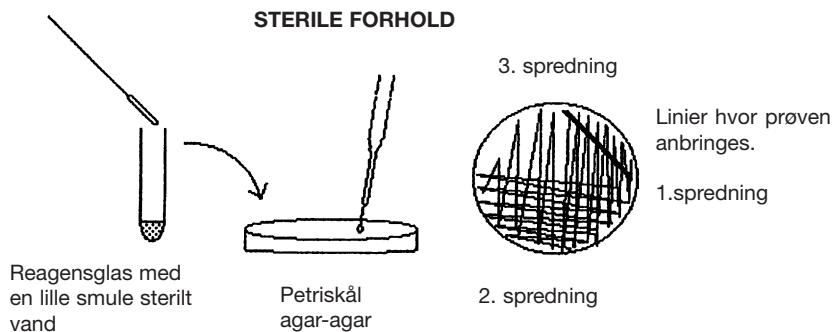
Flere timer før brug placeres flasken med agar-agar nærningsmedium i det kogende vandbad eller mikrobølgeovn indtil agar-agar mediet bliver flydende.

Fordel agar-agar mediet i de 10 petriskåle (ca. 18 mL eller 4 mm tykt). Udfør dette så tæt på bunsenbrænderen som muligt. Lad agar-agar mediet afkøle før bakterierne tilføres. Begge typer petriskåle i a) og d) forberedes evt. samtidigt.

b) Udtagning af bakterieprøve.

Proven tages ved at bruge en steril vatpind, f.eks bagerst i halsen. Prøven kommes i en lille smule steril destilleret vand og spredes så ud på agar-agar mediet i petriskålen v.hj.a af en sterilspreder, hvis spids er opvarmet og afrundet i flammen fra bunsenbrænderen.

Vatpind med bakterieprøve



Linier hvor prøven
anbringes.
1.spredning

3. spredning

2. spredning

c) Identifikation af kolonier fra samme gruppe

Petriskålene kommes i varmeskabet 18-24 timer ved 37 °C, (skålene skal være lukkede og anbragt på hovedet).

Forskellige kolonier af samme bakterier (Escherichia coli) kan let identificeres ved at bruge et binokulær mikroskop.

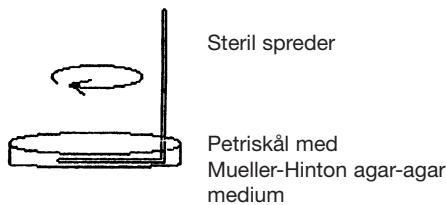
Kolonier af Escherichia er, efter vækst på agar-agar medium, typisk 2-3 mm i diameter, meget mørkviolette ofte med metallisk udseende og har en uigennevnelig midte der dækker $\frac{3}{4}$ af overfladen.

Nogle kolonier (1-10) udtages med en steril pode-nål og kommes i en lille smule steril vand.

d) Dyrkning af kolonier under tilstedeværelse af antibiotikaplader

Mueller-Hinton agar-agar mediet fordeles i 10 petriskåle. Begge typer petriskåle i a) og d) forberedes evt. samtidigt.

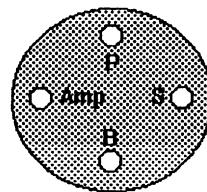
Det sterile vand indeholdende bakterierne identificeret i c) spredes ud i en petriskål med Mueller-Hinton agar-agar medium. Dette medium er specielt velegnet til at undersøge cellers følsomhed overfor antibiotika.



4 plader impregneret med antibiotika placeres i en cirkel på Mueller-Hinton agar-agar mediet i petriskålen v.hj.a en steril (alkoholflamberet) pin-cet.

Antibiotikapladerne placeres ca. 15 mm fra petriskålens kant, sorg for at der er god kontakt, men pas på ikke at ødelægge agar-agar mediet.

Der anbringes en af hver af de 4 antibiotikaplader i petriskålen, f.eks på følgende måde:



Petriskål med
Mueller-Hinton
agar-agar medium

Petriskålene lukkes og placeres på hovedet i varmeskab ved 37 °C i 18-24 timer.

e) Forsøgsresultat

Under inkubation i ovnen vokser bakterierne. Denne vækst kan forstyrres af tilstedeværelsen af antibiotika, bakterierne kan ødelægges eller deres vækst kan hæmmes.

For E. colis vedkommende har de 4 antibiotikatyper, der bruges her, større eller mindre effekt på bakteriens vækst.

Jo mere effektiv antibiotikuet er mod bakterien jo større er den klare zone omkring antibiotikapla-den. Koncentration af antibiotika aftager væk fra pladen.

Effekt af de 4 antibiotikatyper i faldende rækkefølge Ampicillin > Streptomycin > Penicillin > Bacitracin.

f) Resumé af øvelsesgangen

Sterilt arbejde.



Forberedelse af petriskåle med vækstmedium*



Udtag celleprøve



Opløs celleprøven i sterilt destilleret vand



Celleprøven spredes ud på vækstmediet i petriskålen



Luk petriskålen og placer den på hovedet i varmeskabet ved 37 °C i 18-24 timer



Identificer ens cellekolonier (E.coli) ved at bruge binokulær mikroskop



Udtag 1-10 E.coli kolonier med steril podenål



Opløs kolonier i sterilt destilleret vand



Spred prøven ud på Mueller-Hinton mediet i petriskålen*



Placer antibiotikaplader på Mueller-Hinton mediet med steril pincet



Luk petriskålen og placer den på hovedet i varmeskabet ved 37 °C i 18-24 timer



Observer den væksthæmmende zone omkring antibiotikapladerne



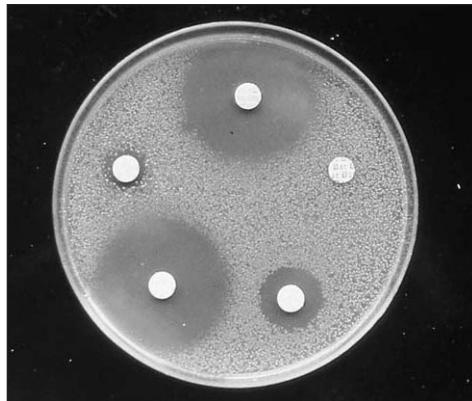
Forklar resultatet

* Begge typer petriskåle forberedes evt. samtidigt.

Antibiotika øvelsessæt

21.12.10

Aa 7798.00



1. MATERIALE CHECKLISTE

Sættet består af følgende:

- 2 x 10 sterile petriskåle – 90 mm diameter.
- 1 flaske agar-agar næringsmedium (225 mL) klar til brug.
- 1 flaske Mueller-Hinton agar-agar medium (225 mL) klar til brug.
- 10 sterile vatpinde.
- 10 sterile spredere.
- 10 sterile podenåle.
- Små plader impregneret med antibiotika 10 stk af hver af Ampicillin - AMP, Streptomycin - S, Penicilin – P, Bacitracin – B.

Sættet indeholder materiale nok til 10 elever eller elevgrupper.

N.B: Flaskerne med medium og antibiotika-pladerne skal opbevares i køleskab.

2. NØDVENDIGT MATERIALE

- Sterilt destilleret vand.
- Reagensglas.
- Vandbad med kogende vand.
- Inkubator (varmeskab med termostat).
- Binokulær mikroskop.
- Bunsenbrænder.
- Pasteurpipetter.
- Pincet.