

Forsøgsvejledning - Agardiffusionstest

Bakterier, vira og antibiotikaresistens

Formål

At undersøge resistens hos bakterien *E.coli* over for forskellige typer af antibiotika ved hjælp af agardiffusions-metoden.

Teori

Man kan måle om en bestemt bakterie er resistent over for et antibiotikum ved at dyrke den i laboratoriet. Bakterien tilsættes sammen med en antibiotikatablet til et vækstmedie, også kaldet en agarplade. Denne plade indeholder næring (mad), som bakterierne kan leve af og på den måde formere sig til milliarder af bakterier. Efter et par dage på pladen vil bakterierne vokse frem i små kolonier (en bakterie, der har delt sig til mange). Er bakterierne følsomme over for det tilsatte antibiotikum, vil der dannes en zone uden om antibiotikatabletten uden bakterievækst. Denne zone uden bakterievækst kaldes en *inhiberingszone*, og den er et mål for, hvor godt et antibiotikum hæmmer en bakterie. Er bakterierne resistente vokser de helt tæt op af antibiotikummet, fordi de ikke påvirkes af det.

I dette forsøg skal I undersøge resistens hos bakterien *E.coli* ved at udplade bakterien på en LB-agarplade og tilsætte forskellige typer antibiotika. Efter et par dages inkubation kan I måle inhiberingszoner for de anvendte antibiotika og undersøge bakteriens resistensniveau.

Sikkerhed

Brug laboratoriekittel og beskyttelsesbriller.

Forsøget **agardiffusionstest** inkluderer en *E. coli* kultur og forskellige antibiotika. Brug handsker når disse materialer benyttes. Neutraliser *E. coli* med 70% ethanol ved spild. Brug handsker og pincet for at placere antibiotikadisks på agarpladen. Ved kontakt med huden af antibiotika, skyl med vand i flere minutter. Ved kontakt med huden af *E. coli*, vask med vand og sæbe. Ved kontakt med øjnene af *E. coli* og antibiotika, skyl øjnene i mindst 15 minutter (fjern eventuelle kontaktlinser).

Materialer

- Forskellige antibiotikadisks (udleveres af læreren)
- LB-agarplade
- Kultur af *E.coli* bakterier udpladet på agarplade (udleveres af læreren)
- Podenål
- Drigalski-spatel eller L-formet spreder
- Reagensglas
- Destilleret vand
- 200 µL pipette + pipettespidser (evt. kan engangspipetter bruges)
- Tape til lukning af plader

Fremgangsmåde

Dag 1

1. Skriv dato og gruppenummer i bunden af LB-agarpladen og lav en skitse over pladen på et stykke papir.
2. Med en podenål overføres et par bakteriekolonier fra den udleverede agarplade med *E. coli* bakterier til et reagensglas med ca. 2 mL destilleret vand. Der røres forsigtigt, men grundigt rundt i reagensglasset.
3. Til LB-agarpladen fra punkt 1 overføres nu 200 μ L (0,2 mL) af blandingen fra punkt 2 ved hjælp af en pipette.
4. Væsken spredes forsigtigt hen over pladen med en drigalski-spatel. Læg låget på og lad pladen tørre helt.
5. Placer de udleverede antibiotikadisks med størst mulig afstand til hinanden på agarpladen. Notér på skitsen hvilke antibiotikadisks, der er placeret hvor.
6. Låg sættes på LB-agarpladen og lukkes evt. med parafilm eller tape. Vigtigt: Herefter må de IKKE åbnes igen.
7. Pladerne inkuberes i plastikposer med bunden nedad ved 30° C ind til næste dag. Ved lavere temperaturer skal pladerne stå et par dage mere.

Dag 2

Tjek om bakterierne bliver påvirket af de forskellige antibiotika ved at måle inhiberingszoner.

Hvis bakterien er modtagelig, er der et område omkring antibiotikatabketten uden bakteriekolonier, en inhiberingszone. Mål radius af eventuelle inhiberingszoner med en lineal og udfyld nedenstående skema.

Der måles fra kanten af disken til kanten af inhiberingszonen. Vigtigt: Låget må IKKE åbnes.

Antibiotikum	Radius af inhiberingszone [mm]

Spørgsmål

1. Er bakterierne resistente over for et eller flere af de testede antibiotika? Er de lige følsomme over for alle de antibiotika, der virker hæmmende?
2. Hvorfor er det vigtigt at kunne undersøge, om en bakterie er modtagelig over for et antibiotikum? Og hvad kan man bruge denne type undersøgelse til i praksis?
3. Hvornår er en bakterie multiresistent? Hvorfor kan multiresistente bakterier være særligt problematiske?