

Testning af bakteriers antibiotika resistens.

Denne lille tekst kan fungere som inspiration til undervisere i udskolingen eller gymnasiet og skal ses som en lille 'how to' i forhold til anvendelse af antibiotikatabletter og resistensundersøgelse hos bakterier.

Indledning og lidt teori: Bakterier kan udvikle resistens mod antibiotika, hvilket har alvorlige konsekvenser i forbindelse med behandling af infektioner.

En simpel måde at undersøge resistens hos bakterier, er ved at dyrke dem på agarplader hvor man har placeret tabletter, der indeholder antibiotika. Antibiotika fra tabletterne vil ved diffusion sprede sig ud i agaren. Er bakterierne følsomme over for en tablets antibiotikum, vil der dannes en klar zone uden om tabletten uden bakterievækst, en såkaldt hæmningszone. Er bakterierne resistente vokser de helt tæt ind til tabletten. Metoden kalder man **agardiffusionsmetoden**.



Sikkerhed: Under alt arbejde med antibiotika og bakterier skal eleverne bære kitler og handsker, og man skal være opmærksom på at der kan være nogle elever, der kan være allergiske overfor antibiotika af forskellig type.

Efter podning med bakterier på agarpladerne skal de forsegles med tape og håndteres så man undgår at væsker indeholdende bakterier løber ud af petriskålene. Dvs. når man skal måle hæmningszonen gøres det enten via petriskålens låg eller bund, men uden at vende

eller tilte petriskålen. Tapen må ikke fjernes igen og skålen må ikke genåbnes.

Spilder man bakterieholdigt materiale på sig selv eller andre, skal man først vaske stedet med kold vand og sæbe, og bagefter enten vaske hænder i en Rodalon opløsning eller spritte dem af. Tøj skal vaskes ved mindst 60 °C.

Efter øvelsen pakkes alle petriskålene med bakteriekulturer i et dobbelt lag plasticpose (2 poser) hvor der bindes knuder for, og deponeres i en spand der kan forsegles og sendes til forbrænding. Denne spand kan også anvendes til brugte poddepinde, vatpinde etc. samt petriskåle med vækst.

Man kan med held give eleverne et par stykker A3 papir som arbejdsbord for at huske dem på at det her er potentielt farligt at arbejde med. Husk at vaskehænder og spritte borde af efter endt arbejde.

Materialer:

Bakterier
016610 Petriskåle Ø90 mm
800940 PCA agar / 800738 Kødpepton agar
048550 Sterile engangsvatpind og / eller
048601 Sterile øjepodenåle
Fysiologisk saltvand (0,9%), sterilt (Små ampuller beregnet til kontaktlinser kan fint anvendes her)
Antibiotikatabletter (779850, 779852, 779853, 779854, 779855, 779856, 779859)
050610 Drigalskispatel
014490 Lille engangspipette eller automatpipette med spidser
005210 Spritbrænder
827000-4 Sprit og eller Rodalon
086071 Handsker
078690 Pincet
053970 Kanylespand
591200 Tape
A3 papir
Lineal /144000 Skydelære
067020 Varmeskab eller en papkasse man kan lukke

Forberedelse: Hav støbte petriskåle med enten PCA eller kødpepton agar parat. Der kan være maks. 3 antibiotikatabletter på en petriskål med en diameter på 9 cm. Det kan være en god ide til de udskolingselever eller elever med en lidt dårlig hånd-øje koordination ikke at lave agarlaget i petriskålen for tyndt. Drigalskispatten kan være et svært instrument at håndtere.

Høstning af bakterier: Generelt er der bakterier overalt, så der er nok indsamlingsmuligheder. Der er to hovedregler ved indsamling af bakterier.

- **Tørre overflader:** Vil man undersøge bakterier fra tørre overflader, toiletsæder, mobiltelefonastatur, tastatur, dørhåndtag etc. så skal bakterierne indsamles med en våd vatpind. Man gør en vatpind fugtig med fysiologisk saltvand og så svaber man overfladen man vil høste bakterier fra grundigt. For at overføre de høstede bakterier fra vatpinden til en tom petriskål, tager man en handske på, kommer et par ekstra dråber fysiologisk saltvand på vatpinden og klemmer væske fra vatpinden over i den tomme petriskål. Man skal ca. bruge 1 dråbe til podning på agaren, så 3 dråber vil være nok til en petriskål med agar. Sæt låg på den tomme petriskålen og gem den til bakterievæsken skal bruges.
- **Fugtige overflader.** Er overfladen man vil høste bakterier på kun lidt fugtig, kan man igen samle bakterierne ind med en våd vatpind og få de bakterier man samler overført til en petriskål ved at komme ekstra fysiologisk saltvand på vatpinden og klemme væsken fra vatpinden ud og over i en tom petriskål. Læg igen låg på til bakterievæsken skal bruges. Et eksempel på en overflade

der er lidt fugtig, kunne være indersiden af et håndvask afløb.

Er overfladen våd som eks. inden i en mundhule, kan man 'skrabe' spyt eller lign væske af med en øjepodenål og på den måde overføre materialet til en tom petriskål. Spyttet/væsken skal sidde som en dråbe inde i øjet på podenålen, så den kan duppes af på bunden af den tomme petriskål. Det kan også her være en god ide, lige at spæde mængden af spyt (eller andet materiale) op med 50% fysiologisk saltvand. Læg låget på petriskålen til bakterievæsken skal bruges.

Er mediet man ønsker at undersøge bakterier fra helt flydende tager man nogle dråber fra det det rene medie. Har man fornemmelse for at der er mange bakterier i væsken, kan det være en god ide at spæde op med 50% fysiologisk saltvand. Læg låget på petriskålen til bakterievæsken skal bruges.

Øvelsen: Når bakterier er indsamlet og opslemmet i et par dråber fysiologisk saltvand (3 dråber væske i alt er nok til én petriskål), er man klar til at sprede bakterier ud på en agar i en petriskål.

1. Tag petriskålen med agar og skriv navn på bunden af skålen helt ude langs skålens kant. Sæt skålen til side til den skal bruges.
2. Steriliser Drigalskispatten ved hjælp af spritbrænderen. Det er især nede i trekanten spatlen skal varmes i ca. 20 sekunder. Behold spatlen i hånden og vent til den er helt afkølet. En varm Drigalskispattel dræber alle bakterier den rører ved, og kan oven i købet fordampe væsken indeholdende bakterier så de bliver luftbårne og der opstår fare for at man indånder dem.

3. Tag låget af petriskålen med agar. Kom 1 god dråbe af den bakterieholdig væske over midt på agaren i petriskålen.
4. Fordel væsken ved at skubbe den rundt over agarens overflade med Drigalskispatlen. Sørg for ikke at røre petriskålens kant med spatlen. (Grunden til dette er at den bakterieholdige væske så lægger sig som en rand langs skålens kant, hvad der giver meget bakterievækst langs kanten – altså lang væk fra antibiotikatabletterne).
5. Læg **ikke** Drigalskispatlen ned – bliv ved med at have den i hånden.
6. Sæt låg på den podede petriskål og vent ca. 5 min. så væsken får tid til at 'sætte sig' på agaren.
7. Steriliser igen Drigalskispatlen grundig inden den lægges på underlaget. Igen kan det være en god ide lige at vente til den er blevet kold.
8. Overfør nu 3 forskellige antibiotikatabletter med en pincet til agaren i den podede petriskål. Tabletterne skal gerne placeres med 12-13 mm fra skålens kant og samtidig så langt fra hinanden som muligt, så hver tablet skaber sit eget lille område med hver deres type medikament, og eventuelle hæmningszoner ikke løber ind i hinanden.

Man kan med succes lave en skabelon til at hjælpe eleverne med at sigte.

Skabelonen er et stykke papir med en cirkel med 9 cm i diameter hvori man har tegnet 3 cirkler med hver 1 cm i diameter så 'kravene' beskrevet ovenover er opfyldte. Eleverne kan så placere den podede petriskål oven over cirklen med Ø9 cm og sigte efter de små cirkler når antibiotikatabletterne skal placeres.

9. Tape petriskålene til og sæt den ind i et varmeskab ved ca. 30 – 35 °C. Skålen skal stå med bunden ned, ellers falder tabletterne af agaren. Hvis de høstede

bakterier er fra varmblodede væsner så er den optimale temperatur for vækst hen mod de 35 °C, men bakterie der er høstet fra overflade er 30 °C nok. Lad petriskålene stå i varmeskabet i 2-3 dage inden aflæsning. Det er en god ide at hold lidt øje med hvor massiv vækst der er på agaren og time afslutning af øvelsen derefter.

10. Har man ikke et varmeskab til rådighed, så kan man komme petriskålene ind i en god solid papkasse og lade den stå et sikkert sted i et lokale med stuetemperatur. Der skabes et mikromiljø i papkassen så bakterierne nok skal vokse. Det tager dem oftest bare 1-3 dage længere. Når man vurderer at der er tilstrækkelig bakterievækst på agaren aflæses øvelsen.
11. Tag handsker på og tag petriskålene ud af varmeskabet/papkassen og sæt dem igen på arbejdsbordet af A3 papir. Petriskålen må ikke åbnes eller tiltes, men skal holdes vandret. Brug lineal eller skydelære til at måle afstanden fra tablettens kant til opklaringszones yderkant. Enheden der måles i er mm. og et udtryk for hæmningszonens størrelse.

Resultatvurdering: Hæmningszonen måles fra tablettens kant til bakterievæksten, og angives i mm.



- Hæmningszoner mellem 0 – 2 mm: bakterien har meget høj resistens for antibiotikummet
- Hæmningszone mellem 3 - 5 mm: angiver at bakterien har høj resistens for antibiotikummet
- Hæmningszoner mellem 6 -9 mm: angiver at bakterien har lav resistens for antibiotikummet
- Hæmningszoner over 10 mm: bakterien er følsom overfor antibiotikummet

For viden om de enkelte antibiotikum typer se herunder.

Antibiotikadata

Ampicilin:

Tilhører penicillin gruppen. Anvendes mod både gram positive og gram negative bakterier. Er anvendt siden 1961. Virker ved at nedsætte krydsbindingerne mellem de molekyler der danner cellevæggen, så cellerne ikke kan dele sig.

Chloramphenicol:

Bredspektret antibiotikum, der virker både på nogle gram positive og nogle gram negative bakterier. Virker bakteriostatisk (dvs. sænker antallet af bakterier). Hæmmer proteinsyntesen i forlængelsestrinnet ved at forhindre peptidbindinger. Anvendes meget i udviklingslande. Anvendes ikke længere i mange lande til andet end øjenbetændelser og multiresistente bakterier.

Penicillin:

Anvendes fortrinsvis til gram positive bakterier. Virker ved at nedsætte krydsbindingerne mellem de molekyler der danner cellevæggen. Det ældste anvendte penicillinstof. Anvendt siden 1942.

Erythromycin:

Tilhører gruppen af macrolid antibiotika – dvs. det indeholder en makrocyclisk lacton ring. Virker ved at hæmme proteinsyntesen ved at hæfte sig til ribosomerne. Virker bakteriostatisk overfor især gram positive bakterier, men har virkning på nogle gram negative stave.

Streptomycin:

Et bredspektret antibiotikum der virker mod gram negative bakterier. Virker ved at hæmme proteinsyntesen. Er bakteriocid (dvs. bakteriedræbende).

Tetracyclin:

Bredspektret antibiotikum, dannet af Streptomyces svampe. Virker ved at hæmme proteinsyntesen ved at bindes til ribosomerne. Anvendes mod både gram

negative og gram positive bakterier.
Anvendt siden 1978.

Neomycin:

Et antibiotikum der opdages i 1949. Virker mod gram negative bakterier og mod nogle gram positive bakterier. Virker bl.a. mod bakterier der er streptomycin resistente. Anvendes hos mennesker kun til gastro-intestinal infektioner – altså infektion i mave-tarm området. Produces i nogle Streptomyces svampe

Antibiotika der virker ved at påvirke bakteriens cellevæg virker oftest kun på en gramtype, mens stoffer der virker på etc. proteinsyntesen sagtens kan virke på begge gramtyper.

Flere oplysninger kan findes på:

<https://pro.medicin.dk/>

Bakteriocid og bakteriostatisk. Bakteriocid betyder bakteriedræbende mens bakteriostatisk betyder at stoffet forhindrer at der bliver flere bakterier, hvorfor antallet af bakterier falder, når nogle bakterier dør af naturlige årsager. Årsagen til at bakteriostatika virker, er at når bakteriers antal holdes enten konstante eller falder så har immunforsvaret en chance for at bekæmpe infektionen. Det interessante ved bakterieinfektioner er at bakterierne rent faktisk koordinerer deres 'angreb' på kroppens celler. De taler sammen og venter til de er mange nok inden de går i aktion. Vil man vide mere om det interessante emne kan man se Bonnie Basslers TED Talk om emnet her: [Bonnie Bassler: How bacteria "talk" | TED Talk](#)

Gramfarvning deler bakterier i to grupper. Dem hvor overfladen bliver rødlig (de gram negative) og dem der farver overfladen blålig (de gram positive). Oftest vil alle underarter i en bakterie familie have samme gramreaktion. Et antibiotikum kan virke specifikt på gram positive eller gram negative bakterier, eller på begge typer. Dette skyldes oftest at antibiotikumet enten virker på molekyler i selve cellevæggen eller at det kun kan trænge ind i en bakterie med en bestemt type cellevæg.

Bredspektret: ordet henviser til at medikamentet kan anvendes mod flere forskellige arter af bakterier. Et stof kan være bredspektret og kun virke på gram negative eller gram positive bakterier, men det kan også være bredspektret og virke på både gram negative og gram positive bakterier.