

Testing av antibiotikaresistens hos bakterier.

Denne teksten er ment som inspirasjon for lærere på grunnskole- og videregående nivå. Det gir en praktisk veiledning for bruk av antibiotikatabletter og testing av bakterieresistens.

Innledning og teori:

Bakterier kan utvikle resistens mot antibiotika, noe som får alvorlige konsekvenser i forbindelse med behandling av infeksjoner.

En enkel måte å undersøke resistens hos bakterier på er å dyrke dem på agarplater der tabletter som inneholder antibiotika er plassert. Antibiotika fra tablettene vil spres ut i agaren ved diffusjon. Dersom bakteriene er følsomme for en tablett antibiotika, vil det dannes en klar sone rundt tablettene uten bakterievekst, en såkalt inhiberingssone. Hvis bakteriene er resistente, vokser de veldig nær tablettene. Metoden kalles agar-diffusjonsmetoden.



Sikkerhet:

Under alt arbeid med antibiotika og bakterier skal elevene bruke laboratoriefrakk og hansker, og du må være oppmerksom på at det kan være noen elever som kan være allergiske mot ulike typer antibiotika.

Etter inokulering med bakterier på agarplatene må de forsegles med tape og håndteres på en slik måte at man unngår at væsker som inneholder bakterier renner ut av petriskålene. Når man skal måle hemningssonen må det gjøres enten via lokket eller bunnen av petriskålen, men uten å snu eller vippe petriskålen. Tapen må ikke fjernes igjen og lokket må ikke åpnes igjen.

Hvis du søler bakterieholdig materiale på deg selv eller andre, må du først vaske området med vann og såpe eller bruke etanol 93 %. Vask hendene grundig med lunket vann og såpe etterpå. Klær må vaskes på minst 60° C.

Etter øvelsen pakkes alle petriskålene med bakteriekulturer i et dobbelt lag plastpose (2 poser) knytes igjen, og eventuelt legges i en bøtte som kan forsegles og sendes til forbrenning i restavfallet. Denne bøtta kan også brukes til brukte vattpinner, bomullspinner etc. samt petriskåler med vekst. Du kan med hell gi elevene noen A3-papir som arbeidsbord for å minne dem på at dette er potensielt farlig å jobbe med. Husk å vaske hendene og desinfisere bord etter endt arbeid.

Materialer:

Bakterier fra overflater eller lignende
016610 Petriskål i plast Ø 90 mm, pk a 20
800940 PCA - agar i flaske, 250 ml/ 800738
Agar på flaske, kjøttpepton, 250 ml
048550 Bomullspinner i tre, 200 stk og/eller
048601 Podenål i plast med 10 µl øye, pk a 48
Fysiologisk saltvann (0,9%), steril (Små ampuller beregnet for kontaktlinser kan brukes her)
Antibiotikatabletter ulike varianter (779850, 779852, 779853, 779854, 779855, 779856, 778959)
050610 Drigalskispatel, glass
014490 Dråpeteller i plast 1 ml, pk a 500 eller automatisk pipette med spisser
005210 Spritbrenner glass
827000-4 Alkohol
086071 Latekshansker, medium, puddefri, SemperGuard pk a 100
078690 Pinsett i plast, pk a 100

053970 Nålebøtte
 591200 Tape
 A3 papir
 Linjal /144000 skyvelær
 067020 Varmeskap eller en pappeske som kan lukkes

Forberedelse:

Bruk ferdigstøpte petriskåler med enten PCA- eller kjøttpeptonagar. Det kan maksimalt være 3 antibiotikatabletter på en petriskål med en diameter på 9 cm. Det kan være lurt for skoleelever eller elever med litt dårlig hånd-øye-koordinasjon å ikke gjøre agarlaget i petriskålen for tynt. Drigalskispatel kan være et vanskelig instrument å håndtere.

Høsting av bakterier:

Generelt er det bakterier overalt, så det er nok av innsamlingsmuligheter. Framgangsmåten er generelt lik for å samle inn bakterier på overflater som er tørre eller lett fuktige.

- Tørre overflater:

Ønsker du å undersøke bakterier fra tørre overflater, toalettseter, mobiltelefonastaturer, tastaturer, dørhåndtak etc., må bakteriene samles opp med en fuktet bomullspinne.

- Lett fuktige overflater:

På overflate som er lett fuktig for eksempel innsiden av et sluk i en vask, må også bakteriene samles opp med en fuktet bomullspinne.

Du fukter en steril bomullspinne med sterilt fysiologisk saltvann og stryker deretter grundig overflaten du vil høste bakterier fra.

For å overføre de høstede bakteriene fra vattpinnen til en ferdigstøpt petriskål, tar man på seg en hanske (ny for hver gang), tilsetter ca. 3-4 dråper sterilt fysiologisk saltvann på vattpinnen og presser væske fra vattpinnen ned på agaren i den ferdigstøpte petriskålen. Du trenger 1 dråpe til inokulering på agaren.

Legg lokk på petriskålen og oppbevar den til neste trinn.

Hvis overflaten er fuktig, for eksempel inne i et munnhule, kan du 'skrape' spytt eller lignende væske av med en steril podenål og på denne måten overføre materialet til agaren i en ferdigstøpt petriskål. Spyttet/væsken må sitte som en dråpe inne i øyet på podenålen, slik at den forsiktig kan overføres til agaren i den ferdigstøpte petriskålen. Det kan også være lurt å fortynne mengden spytt (eller annet materiale) med sterilt fysiologisk saltvann (2-3 dråper over podenålen). Legg lokk på petriskålen og oppbevar den til neste trinn.

Hvis det er flytende væske du vil undersøke for bakterier, tar du noen dråper. Hvis du har følelsen av at det er mange bakterier i væsken, kan det være lurt å fortynne med fysiologisk saltvann. Legg lokket på petriskålen og oppbevar den til neste trinn.

Øvelsen:

Når bakterier er innsamlet og tilsatt et par dråper fysiologisk saltvann (3 dråper væske i alt er nok til én petriskål), er man klar til at spre bakterier ut på agaren i en petriskål.

1. Ta den ferdigstøpte petriskålen med agar og skriv navnet ditt på bunnen av skålen og hele veien langs kanten. Sett den til side til den skal brukes.
2. Steriliser Drigalski-spatelen med spritbrenneren. Det er spesielt nede i trekanten at spatelen skal varmes opp i ca. 20 sekunder. Ha spatelen i hånden og vent til den er helt avkjølt. En varm Drigalski-spatel dreper alle bakterier den berører, og kan til og med fordampe væsken som inneholder bakterier slik at de blir luftbårne og det er fare for å puste dem inn.
3. Fjern lokket fra petriskålen med agar. Ha 1 god dråpe av den

bakterieholdige væsken (fra bomullspinnen) over midten av agaren i petriskålen.

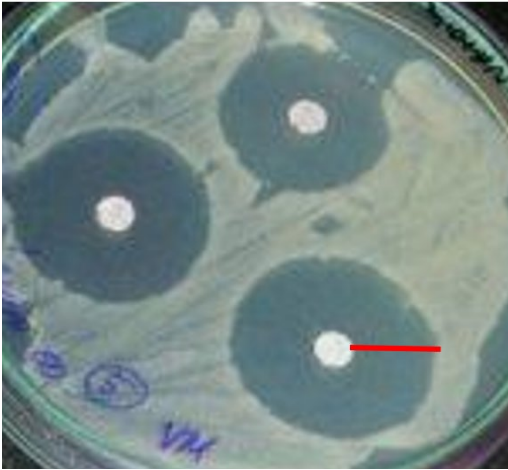
4. Fordel væsken ved å skyve den rundt over overflaten av agaren med Drigalspatelen. Pass på at du ikke berører kanten av petriskålen med spatelen. (Årsaken til dette er at den bakterieholdige væsken da danner en kant langs kanten av skålen, som gir mye bakterievekst langs kanten - dvs. langt unna antibiotikatablettene). NB: Legg **ikke** Drigalskispatalen ned – ha den i hånden.
5. Legg lokk på den inokulerte petriskålen og vent ca. 5 minutter så væsken rekker å 'sette seg' på agaren.
6. Steriliser Drigalspatelen grundig igjen før du skyver den rundt på overflaten. Igjen kan det være lurt å bare vente til den er avkjølt.
7. Overfør nå 3 forskjellige antibiotikatabletter med pinsett til agaren i den inokulerte petriskålen. Tablettene bør fortrinnsvis plasseres 12-13 mm fra skålkanten og samtidig så langt fra hverandre som mulig, slik at hver tablett skaper sitt eget lille område med hver type medisin, og eventuelle hemmingssoner ikke renner inn i hverandre.

Man kan med hell lage en mal for å hjelpe elevene å sikte. Malen er et stykke papir med en sirkel på 9 cm i diameter hvor det er tegnet 3 sirkler på 1 cm i diameter slik at 'kravene' beskrevet ovenfor oppfylles. Elevene kan så plassere den inokulerte petriskålen over sirkelen med Ø9 cm og sikte på de små sirkelene når antibiotikatablettene skal legges på.

8. Tape petriskålene og legg dem i et varmeskap på ca. 30 – 35 °C. Skålen må være riktig vei ellers faller tablettene av agaren. Hvis de høstede bakteriene er fra varmbloedige skapninger, er den optimale temperaturen for vekst rundt 35 °C, men for bakterier høstet fra overflaten er 30 °C nok. La petriskålene ligge i varmeskapet i 2-3 dager før avlesing. Det er lurt å holde et øye med hvor massiv veksten er på agaren og når tiden er inne for å avslutte øvelsen.
9. Har du ikke noe varmeskap tilgjengelig, kan du legge petriskålene i en god solid pappeske og la den stå på et trygt sted (skap) i romtemperatur. Det skapes et mikromiljø i pappesken slik at bakteriene kan vokse. Det tar dem vanligvis bare 1-3 dager lenger. Når du vurderer at det er tilstrekkelig bakterievekst på agaren, noter resultatene fra øvelsen.
10. Ta på hansker og ta petriskålene ut av varmeskapet/pappesken og legg dem tilbake på arbeidsbordet av A3-papir. Petriskålen må ikke åpnes eller vippes, men må holdes vannrett. Bruk en linjal eller skyvelære for å måle avstanden fra kanten av nettbrettet til ytterkanten av klargjøringssonen. Enheten som måles i er osv. og et uttrykk for størrelsen på inhiberingssonen.

Resultatevaluering:

Hemmingssonen måles fra kanten av tablettene til bakterieveksten, og er angitt i mm.



- Hemmingssoner mellom 0 – 2 mm: bakterien har svært høy motstand mot antibiotika.
- Hemmingssone mellom 3 - 5 mm: indikerer at bakterien har høy resistens mot antibiotika.
- Hemmingssoner mellom 6 -9 mm: indikerer at bakterien har lav resistens mot antibiotika.
- Hemmingssoner over 10 mm: bakterien er følsom for antibiotika.

For informasjon om de enkelte antibiotikatypene se nedenfor.

Typer av antibiotika

Ampicillin:

Tilhører penicillingruppen. Brukes mot både grampositive og gramnegative bakterier. Har vært brukt siden 1961. Virker ved å redusere tverrbindingene mellom molekylene som danner celleveggen, slik at cellene ikke kan dele seg.

Kloramfenikol:

Bredspektret antibiotika som virker både på noen gram-positive og noen gram-negative bakterier. Virker bakteriostatisk (dvs. senker antall bakterier). Hemmer proteinsyntesen i forlengelsestrinnet ved å forhindre peptidbindinger. Mye brukt i utviklingsland. Brukes ikke lenger i mange land til annet enn øyeinfeksjoner og multiresistente bakterier.

Penicillin:

Brukes primært for grampositive bakterier. Virker ved å redusere tverrbindingene mellom molekylene som danner celleveggen. Det eldste brukte penicillinstoffet. Brukt siden 1942.

Erytromycin:

Tilhører gruppen makrolidantibiotika – dvs. den inneholder en makrosyklisk laktonring. Virker ved å hemme proteinsyntesen ved å feste seg til ribosomer. Virker bakteriostatisk spesielt mot grampositive bakterier, men har effekt på enkelte gramnegative staver.

Streptomycin:

Et bredspektret antibiotikum som virker mot gramnegative bakterier. Virker ved å hemme proteinsyntesen. Er bakteriedrepende (dvs. bakteriedrepende).

Tetracyklin:

Bredspektret antibiotikum, dannet av Streptomyces-sopp. Virker ved å hemme proteinsyntesen ved å binde seg til ribosomer. Brukes mot både gramnegative og grampositive bakterier. Brukt siden 1978.

Neomycin:

Et antibiotikum oppdaget i 1949. Virker mot gramnegative bakterier og mot noen grampositive bakterier. Jobber bl.a. mot streptomycin-resistente bakterier. Brukes kun til mennesker for gastro-intestinale infeksjoner - dvs. infeksjon i mage-tarmområdet. Produsert i noen Streptomyces-sopp

Bakteriocid og bakteriostatisk. Bakteriocid betyr å drepe bakterier, mens bakteriostatisk betyr at stoffet hindrer flere bakterier i å dannes, og det er grunnen til at antallet bakterier avtar når noen bakterier dør av naturlige årsaker. Grunnen til at bakteriostatika virker er at når antallet bakterier holdes enten konstant eller reduseres, har immunsystemet en sjanse til å bekjempe infeksjonen. Det interessante med bakterieinfeksjoner er at bakteriene faktisk koordinerer sitt 'angrep' på kroppens celler. De snakker sammen og venter til det er nok av dem før de tar grep. Hvis du vil vite mer om det interessante emnet, kan du se

Bonnie Basslers TED Talk om emnet her:

[Bonnie Bassler: How bacteria "talk" | TED Talk](#)

Gramfarging deler bakterier i to grupper. De der overflaten blir rødlig (gramnegativet) og de som farger overflaten blå (grampositivet). Oftest vil alle underarter i en bakteriefamilie ha samme gramreaksjon. Et antibiotikum kan virke spesifikt på grampositive eller gramnegative bakterier, eller på begge typer. Dette skyldes oftest at antibiotikumet enten virker på molekyler i selve celleveggen eller at det kun kan trenge gjennom en bakterie med en bestemt type cellevegg.

Bredspektret: ordet refererer til at medisinen kan brukes mot flere forskjellige bakteriearter. Et stoff 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.

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