

AGARDIFFUSIONSTEST

ZIEL:

Mittels Agardiffusionstest soll das Resistenzverhalten von Testkeime gegenüber verschiedener Antibiotika und deren unterschiedlichen Konzentrationen untersucht werden.

PRINZIP:

Ein Antibiotikum wird auf eine mit einem Testkeim vorbereitete Agarplatte aufgebracht. Das Antibiotikum diffundiert in den Nährboden und wenn der Testkeim sensitiv ist, kann er nicht anwachsen und es bildet sich ein Hemmhof um das Antibiotikum.

MATERIALIEN:

Testkeim
sterile Ringer- oder NaCl-Lösung
Agarplatten (Bsp. Caso-Agarplatten)
sterile Papierscheibchen oder Pasteurpipetten
Antibiotika
Alkohol, Pinzette, Sampler und Spitzen

DURCHFÜHRUNG:

I. Herstellen eines Bakterienrasens (2 Möglichkeiten)

1. Möglichkeit:

- a.) Von einer frischen Bakterienkultur werden 2-3 Kolonien mit einer Impföse von einer Testkeimplatte abgenommen und in 2ml steriler Lösung (Ringerlösung, NaCl) verrieben, so dass eine ganz schwache Trübung zu beobachten ist.
- b.) Von dieser Suspension werden 100µl in 10ml sterile Lösung (Ringerlösung, NaCl) gegeben und auf dem Schüttler gut vermischt.
- c.) 3ml von der 10ml Bakteriensuspension werden auf einer Agarplatte ausgegossen. Um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension über die ganze Platte zu erreichen, ist die Petrischale leicht zu rotieren. Die restliche Flüssigkeit wird mit dem Sampler wieder abgesaugt und die beimpfte Platte für 30min bei 37°C (Temperatur abhängig vom Testkeim) inkubiert.
- d.) Nach der Inkubationszeit wird die Restflüssigkeit durch Schrägstellung der Platte gesammelt und mit dem Sampler abgesaugt.

2. Möglichkeit:

- a.) Am Vortag eine ONC (Over Night Culture) mit dem Testkeim ansetzen. Einen Kolben mit 20-50ml flüssigem Nährmedium vorbereiten.
- b.) Am Tag des Versuches ca. 2-5ml ONC in den Kolben pipettieren. Danach weiter bei Möglichkeit 1 Punkt c.



links: Kontrollplatte mit Bakterienrasen
rechts: Bakterienrasen nicht angewachsen

II. Beschriftung der Platten:

- Testkeim, Antibiotikum mit Konzentration, Menge des Antibiotikums

III. Vorbereitung der Platten für das Antibiotikum

1. Möglichkeit mit Papierscheibchen

- a.) Auf die so vorbereitete Platte werden, ca. 2cm vom Plattenrand entfernt, in einem Abstand von etwa 3cm mit einer Pinzette (ohne den Agar zu berühren) die Papierscheibchen aufgelegt und leicht angedrückt. Insgesamt 4 Testblättchen pro Platte.
- b.) Die Papierscheibchen werden mit dem Antibiotikum beschichtet. (20µl, 50µl, 100µl je nach Interesse)



Vorbereitung der Agarplatten für die Papierscheibchenmethode

2. Möglichkeit mit Stanztechnik

- a.) Anstatt Papierscheibchen aufzulegen, werden mit sterilen Pasteurpipetten Löcher aus dem Agar gestanzt (verkehrte Seite der Pipette verwenden). In diese Löcher wird dann die Antibiotikumlösung hinein pipettiert.



Vorbereitung der Agarplatten für die Stanztechnik

Antibiotikaverdünnungen:

Beispiele für sinnvolle Verdünnungen.

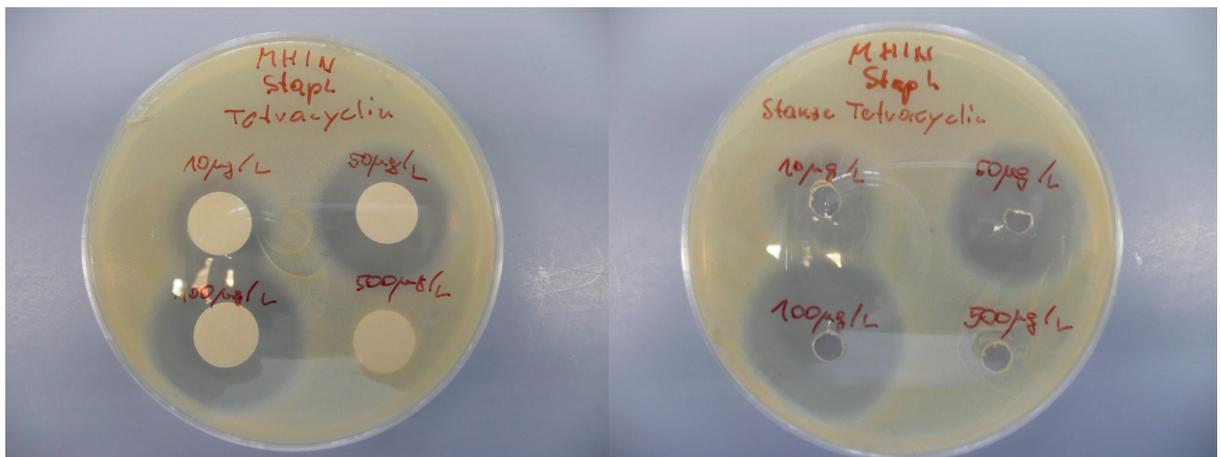
<u>Antibiotikum</u>	<u>Konzentration $\mu\text{g/ml}$</u>
Penicillin G	5, 10, 50, 100
Ampicillin	5, 10, 50, 100
Tetracyclin	50, 100, 1mg, 10mg
Cycloserin	50, 100, 1mg, 10mg

IV. Bebrüten

Anschließend werden die Platten bei optimaler Temperatur 24 Stunden bebrütet.

AUSWERTUNG:

- Für jedes Antibiotikum wird der Hemmhofdurchmesser ausgemessen. (Grenze ist dort, wo das Wachstum eindeutig gehemmt bzw. nicht mehr gehemmt wird.)
- Danach wird tabellarisch festgehalten welches Antibiotikum, in welcher Konzentration, gegen welchen Stamm wirkt.



Links: Agardiffusionstest mit Papierscheibchenmethode, Testkeim *Staph. aureus*, Antibiotikum Tetracyclin

Rechts: Agardiffusionstest mit Stanztechnik, Testkeim *Staph. aureus*, Antibiotikum Tetracyclin

ALTERNATIVE UNTERSUCHUNGSMÖGLICHKEITEN**1. Knoblauch**

Auf eine mit einem Bakterienrasen vorbereitete Agarplatte können frische, dünne Knoblauchscheiben aufgelegt werden. Knoblauch hat eine bakterizide Wirkung auf verschiedene Bakterien. Nach der Bebrütung kann ein Hemmhof um den Knoblauch gesehen werden.

2. Milch

Die Papierscheibchen können in Milch getaucht werden und anschließend auf eine vorbereitete Platte aufgelegt werden. Sind hohe Mengen an Antibiotika in der Milch vorhanden, wird sich ein Hemmhof bilden.

3. Essig oder Teebaumöl

Gleich wie bei der Milch vorgehen. Beide Substanzen wirken auf Bakterien. Essig zeigt eine gute Wirkung gegen Staphylokokken.